

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie.
Spécialité Biotechnologie microbienne.



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Isolement de souches bactériennes à partir des selles de poulet et étude de leur activité antibactérienne à l'égard de *Salmonella enterica* sérotype Enteritidis.

Présenté par :

Belbachir Kahina & Boudjema tinhinane

Soutenu le : **Dimanche 19 Septembre 2021**

Devant le jury composé de :

M^r TOUATI A.

M^{lle} MAIRI A.

M^r BENDJEDDOU K.

Pr.

MCB

MCA

Président

Examinatrice

Promoteur

Année universitaire : 2020 / 2021

Remerciements

C'est sans doute l'occasion pour chaque étudiant de se remémorer les moments qui ont ponctué son parcours étudiant, ainsi que les personnes qui l'ont accompagné et encouragé.

Tout d'abord nous tenons à remercier **Monsieur Bendjeddou K.** pour son encadrement pédagogique, ses conseils, ainsi sa disponibilité.

Nous remercions ainsi toutes l'équipes pédagogiques, l'ensemble des professeurs qui ont contribué à notre apprentissage, plus particulièrement **Monsieur Touati A**
et **Madame Mairi A.**

Un très grand merci pour nos amis pour leur soutien .

Dédicaces

A nos parents, pour leurs sacrifices déployés à notre égard, pour leur patience, leur amour et leur confiance. Qu'ils trouvent dans ce modeste travail, le témoignage de notre profonde affection et de notre attachement indéfectible ; nulle dédicace ne puisse exprimer ce qu'on leur doit.

A nos frères et sœurs et tous nos amis pour chaque mot reçu, chaque geste d'amitié, à chaque main tendue et pour toute attention témoignée.

Sommaire

Page

Table des figures

Liste des tableaux

1	Introduction	1
2	Les salmonelles et la salmonellose chez le poulet	4
2.1	Historique	4
2.2	Définition et taxonomie	4
2.3	Principales caractéristiques des salmonelles	7
2.4	L'industrie avicole	9
2.4.1	Salmonellose et aviculture	10
2.4.2	Transmission de salmonelles	11
2.4.3	Les antibiotiques dans le secteur de la production des animaux	12
2.4.4	Risque de présence de résidus d'antidotiques dans les produits de volailles	14
3	Les bactéries lactiques, peuvent-elles être une alternative aux antibio- tiques pour l'alimentation animale ?	15
3.1	Les probiotiques et leurs effets positifs sur la santé de l'hôte	15
3.2	Les probiotiques et l'alimentation animale	17
3.3	Les bactéries lactiques	20
3.3.1	Généralité :	20
3.3.2	Principales caractéristiques :	20
3.3.3	Taxonomie des bactéries lactiques :	21

3.4	Pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques :	22
3.4.1	Production des acides organiques :	22
3.4.2	Les bactériocines :	22
4	Matériel et méthodes	25
4.1	Origine des souches	25
4.1.1	Souches tests	25
4.1.2	Souches cibles	25
4.1.3	Prélèvement des échantillons	25
4.1.3.1	Echantillons de selles	25
4.1.3.2	Echantillons de merguez	26
4.1.4	Isolement des souches	26
4.1.4.1	Isolement des souches tests	26
4.1.4.2	Isolement des salmonelles :	26
4.1.5	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne	28
4.1.5.1	Technique de double couche :	28
4.1.5.2	Purification des souches actives :	28
4.1.5.3	Test des spots :	29
4.1.5.4	Technique des disques d'agar :	29
4.1.6	Production de substance(s) antibactérienne(s) sur milieu liquide . .	29
4.1.7	Identification préliminaire des souches tests :	30
5	Résultats et discussion	31
5.1	Résultats	31
5.1.1	Isolement des souches	31
5.1.1.1	Souche test :	31
5.1.1.2	Souches cibles :	31
5.1.2	Mise en évidence de l'activité antibactérienne	32
5.1.2.1	Technique double couche :	32
5.1.2.2	Tecnique des spots :	32
5.1.2.3	Test des disques agar :	33
5.1.2.4	Test des puits :	34
5.1.3	Test d'identification préliminaire des souches tests	37

5.1.3.1	Coloration de Gram :	37
5.1.3.2	Test de Catalase :	37
5.2	Discussion	41
6	Conclusion	43

Référence bibliographiques

Liste des figures

1 Relations phylogénétiques entre les <i>Gammaproteobacteria</i> . Les principaux groupes phylogénétiques basés sur des comparaisons de séquences d'ARNr	6S 6
2 Production mondiale des produits d'élevage animal.	10
3 Familles d'antibiotiques détectées dans les aliments d'origine animale	14
4 Mécanismes d'inhibition des agents pathogènes par les probiotiques . . .	19
5 Test des spots des isolats actifs vis-à-vis <i>Salmonella</i>	33
6 Test des disques d'agar des isolats actifs vis-à-vis <i>Salmonella</i>	33.
7 Zones d'inhibition des surnageants concentrés des isolats actifs à l'égard de <i>Salmonella</i> Enteritidis	35
8 Zones d'inhibition des surnageants non concentrés des isolats actifs à l'égard de <i>Salmonella</i> Enteritidis	35
9 Histogramme présentant les diamètres des zones d'inhibitions des isolats actifs à l'égard de <i>Salmonella</i> Enteritidis	36

Liste des tableaux

I. Principaux caractères biochimiques du genre <i>Salmonella</i>	8
II. Caractéristiques différentielles des sous espèces de <i>Salmonella</i>	9
III. Proportions des sérotypes de salmonelles dans divers spécimens de volailles... ..	11
VI. Les bactérie les plus fréquemment isolées dans les produits alimentaires d'origine animale	12
V. Bienfait des probiotiques sur la santé de l'hôte.	16
IV. Genres des probiotiques utilisés	18

INTRODUCTION

La salmonellose est la cause la plus fréquente de gastroentérite dans le monde, avec des conséquences parfois graves. Elle résulte généralement de la consommation de produits avicoles contaminés. En effet, l'appareil digestif du poulet est colonisé par des bactéries, y compris des salmonelles, dès les premières heures de vie de l'animal. Ces pathogènes communs peuvent survivre et passer par toutes les étapes de production des volailles (Vinueza-Burgos *et al.*, 2019). La contamination des denrées alimentaires avicoles aura lieu le plus souvent au cours de la transformation de ces produits, cette contamination résulte de trois voies possibles : contamination de la chair de l'animal par son propre microbiote intestinal, contamination de la chair par un autre animal abattus le même jour et contamination par la flore résiduelle de l'abattoir (Shang *et al.*, 2019).

Les antibiotiques sont utilisés dans le domaine de l'élevage intensifs des poulets pour prévenir les infections bactériennes ainsi que stimuler la croissance de ces animaux. Cependant, la restriction de l'utilisation des antibiotiques dans l'alimentation des volailles est un problème mondial controversé, parce que ces antibactériens permettent, d'un côté le contrôle opportun des infections dans les fermes avicoles ainsi que la stimulation de la croissance des poulets de chair, mais d'un autre coté l'exposition aux antibiotiques peut entraîner l'émergence et la propagation de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques chez les animaux et les humains. Selon une étude publiée par Mellor *et al.* (2019), les infections causées par ces germes devraient causer 10 millions de décès humains d'ici 2050 si les tendances actuelles de l'utilisation des antibiotiques se poursuivent. En effet, plus

de 100.000 cas d'entérocolite dans l'Union Européen sont attribués à des infections à *Salmonella* non typhique, où *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium était le sérotype le plus fréquent (EFSA, 2017), pour cela l'Union européenne a interdit complètement l'utilisation d'antibiotiques en tant que stimulateurs de croissance dans les aliments pour animaux depuis janvier 2006. Aux États-Unis, la FDA (Food and Drug Administration) à interdit, à son tour, l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance à partir de 2017.

Il est donc clair que l'utilisation des antibiotiques dans les aliments des volailles n'est pas une solution idéale, donc la recherche d'une alternative est devenue une nécessité. Dans cette optique, de nombreuses études ont fait l'objet de recherche sur les alternatives possibles aux antibiotiques comme l'utilisation des bactéries probiotiques, des agents modulateurs de l'immunité, des polypeptides antimicrobiens, des bactériophages et leurs lysines...etc.(Chenget *al.*, 2014).

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude, qui a pour objectif le criblage de souches bactériennes douées d'activité anti-*Salmonella*, elle est divisée en deux parties : la première partie visera l'isolement de souches de *Salmonella*, ainsi que l'isolement de souches bactériennes douées d'activité anti-*Salmonella* à partir de selles de poulets de ferme, et la deuxième partie aura pour but l'évaluation de l'activité anti-*Salmonella* des isolats obtenus.

PATRIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

LES SALMONELLES ET LA SALMONELLOSE CHEZ LE POULET

1 Historique

Le premier bacille typhoïde fut observé pour la première fois en (1880) par le médecin bactériologiste allemand Karl Joseph Eberth lors d'une observation de coupes histologiques de sections de rate et de ganglions lymphatiques mésentériques d'un patient décédait de la fièvre typhoïde (Le Minor *et* Popoff, 1987). Ultérieurement, d'autres bacilles furent isolés de patients présentant les mêmes symptômes de fièvre typhoïde, mais étant différents du premier bacille de salmonelles sur le plan sérotypique, ils étaient considérés comme des espèces différentes. Subséquemment, le genre *Salmonella* a été créé par l'épidémiologiste américain Theobald Smith en 1884 en l'honneur du vétérinaire américain Daniel Elmer Salmon. En 1896, Widal a mis en évidence la diversité antigéniques des espèces de *Salmonella* à l'aide d'un nouveau test nommé sérodiagnostic (Brown JH, 1935 ; Tindall *et al.* 2005).

2 Définition et taxonomie

Jusqu'à 1989, le genre *Salmonella* contenait plus de 2000 espèces différentes (Chabonelle *et al.*, 1989), cependant, l'hybridation ADN-ADN a montré que ce genre ne comporte que trois espèces différentes, le reste est considéré comme des sous espèces voir des serovars

LES SALMONELLES ET LA SALMONELLOSE CHEZ LE POULET

de ces trois taxons. Ces trois espèces sont : *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* et *Salmonella subterranea* (Shelobolina *et al.*, Nov 2004).

La Position taxonomique actuelle des salmonelles est comme suit :

- Domaine : *Bacteria*
- Phylum : *Proteobacteria*
- Classe : *Gammaproteobacteria*
- Ordre : *Enterobacteriales*
- Famille : *Enterobacteriaceae*
- Genre : *Salmonella*

Le Bergey's Manuel (2004) subdivise la classe des *Gammaproteobacteria* en 14 ordres et 28 familles dont fait partie les salmonelles . La (Figure 01) illustre les relations phylogénétiques entre les principaux groupes des *Gammaproteobacteria*.

Le genre *Salmonella* contient plus de 2500 sérovars, la majorité sont classé dans l'espèce *Salmonella enterica*, cette espèce est subdivisée selon ses caractéristiques biochimiques (Tableau I) en six sous-espèces contenant 2557 sérovars (Grimont, 2014), ces sous-espèces sont :

- *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (99 sérovars),
- *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (336 sérovars),
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (1531 sérovars),
- *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* (73 sérovars),
- *Salmonella enterica* subsp. *indica* (13 sérovars),
- *Salmonella enterica* subsp. *salamae* (505 sérovars).

Les sérovars de l'espèce *S. enterica* sont différenciées grâce à leurs formules antigéniques de antigène somatique O (Lipopolysaccharide : LPS) et l'antigène flagellaire (antigène H) suivant un schéma appelé schéma de white-kauffmann-Le Minor, mis en œuvre depuis 1934 (Grimont 2014).

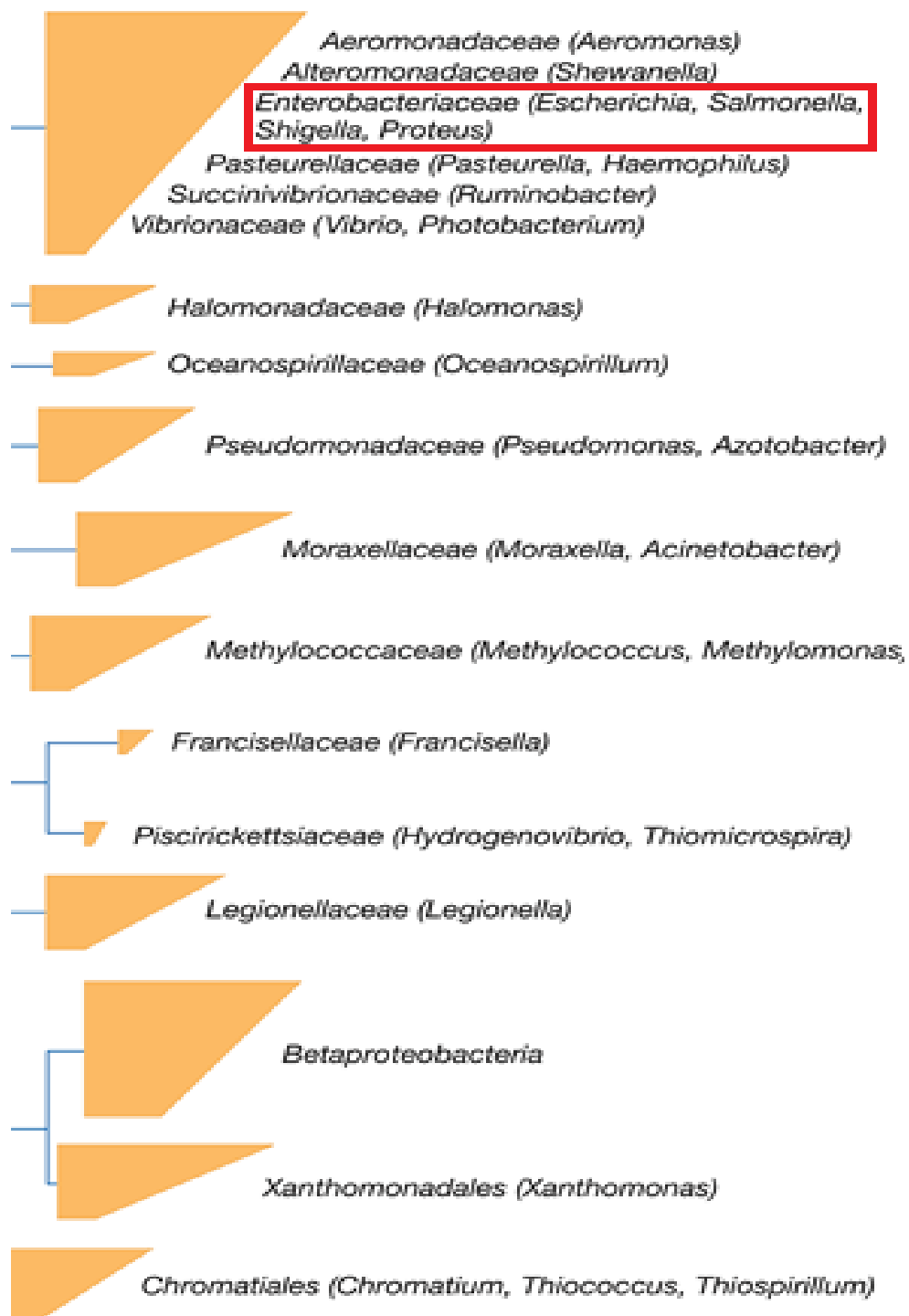


FIGURE 1 – Relations phylogénétiques entre les *Gammaproteobacteria*. Les principaux groupes phylogénétiques basés sur des comparaisons de séquences d'ARNr 16S. (Willey *et al.*, 2018)

3 Principales caractéristiques des salmonelles

- **Caractères morphologiques et cultureux :**

Les salmonelles apparaissent sous le microscope optique sous forme de bâtonnets à Gram négatif mobiles à une ciliature péritriche. Elles sont aérobies /anaérobies facultatives, mésophiles avec un optimum de 37°C, mais certaines souches peuvent se développer à des températures comprises entre 5°C à 47°, leur pH de croissance est compris entre 4.5 et 9 avec un optimum de 7.

Les salmonelles donnent sur le milieu ordinaire des colonies blanchâtres circulaires limitées par un bord régulier de diamètres entre 1.5 à 3 mm (le Minor *et* Veron, 1989). Sur le milieu SS (*Salmonella/Shegella*), elles donnent des colonies incolores avec ou sans centre noir selon la production ou non de l'H₂S (selon les sérovars), sur gélose SMID₂, elles donnent des colonies roses pâles à mauves, tandis que sur gélose Hektoen elles donnent des colonies de couleur vert à bleu-vert avec ou sans centre noir (Delarra C, 2007).

- **Caractères biochimiques :**

Les principaux caractères biochimiques permettant l'identification du genre *Salmonella* sont regroupés dans le Tableau I.

LES SALMONELLES ET LA SALMONELLOSE CHEZ LE POULET

TABLEAU I – Principaux caractères biochimiques du genre *Salmonella* (Humbert *et al.*,1998).

Caractères	Réactions
Glucose	+
Lactose	V
Mannitol	+
Citrate	+
Saccharose	-
Sulfure d'hydrogène H ₂ S	V
Réduction de nitrate en nitrite (nitrate réductase)	+
Décarboxylation de la lysine (LDC)	+
Décomposition de l'urée	-
Indole	-
β-galactosidase	V
Oxydase	+
Tryptophane désaminase	-
Catalase	V

V = variable selon l'espèce ou sérovars

La quasi-totalité des salmonelles d'intérêt médicale et vétérinaire sont classées dans les six sous-espèces de *S. enterica* (Reeves *et al.*, 1989). Les clés de différenciations de ces sous-espèces sont regroupées dans le Tableau II.

LES SALMONELLES ET LA SALMONELLOSE CHEZ LE POULET

TABLEAU II– Caractéristiques différentielles des sous espèces de *Salmonella*
(Le Minor *et* Popoff, 1987 ; Reeves *et al.*, 1989).

Espèce	<i>S. enterica</i>					
Sous-espèce	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>
Caractère dulcitol	+	+	-	-	-	D
ONPG(2h)	-	-	+	+	-	D
Malonate	-	+	+	+	-	-
Gélatinase	-	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	-
Culture sur KCN	-	-	-	-	+	-
L(+)-tartrate(a)	+	-(a)	-(a)	-(a)	-(a)	-(a)
Galacturonate	-	+	-	+	+	+
γ – <i>Glutamyltransferase</i>	+	+	-	+	+	+
β – <i>glucuronidase</i>	D	D	-	+	-	D
Mucate	+	+	+	-(70%)	-	+
Salicine	-	-	-	-	+	-
Lactose	-	-	-(75%)	+(75%)	-	D
Lyse par le phage O1	+	+	-	+	-	+
Totale des sérovars	1531	505	99	336	73	13

(a)=d-tartrate , (*) = typhimurium d, Dublin- , (+) = 90% ou plus de résultats positifs, (-) = 90 %ou plus de résultats négatifs , D = résultats différents suivant les sérovars.

4 L'industrie avicole

Au cours des dernières décennies, la demande des consommateurs en produits carnés a significativement augmenté (Figure 2). Afin de répondre à cette demande de plus en plus accrue, les industries de la production animale ont renforcé leur production (OCDE/FAO, 2018). Toutefois, l'élevage intensif d'animaux s'est accompagné par l'utilisation abusive de stimulateurs de croissance, en particulier les antibiotiques, pour augmenter le rendement de l'élevage. Néanmoins, l'utilisation excessive de ces antibactériens dans l'élevage animal

augmenté le risque d'exposition de l'homme à diverses infections par le bais de consommation des produits contenant des résidus d'antibiotiques.

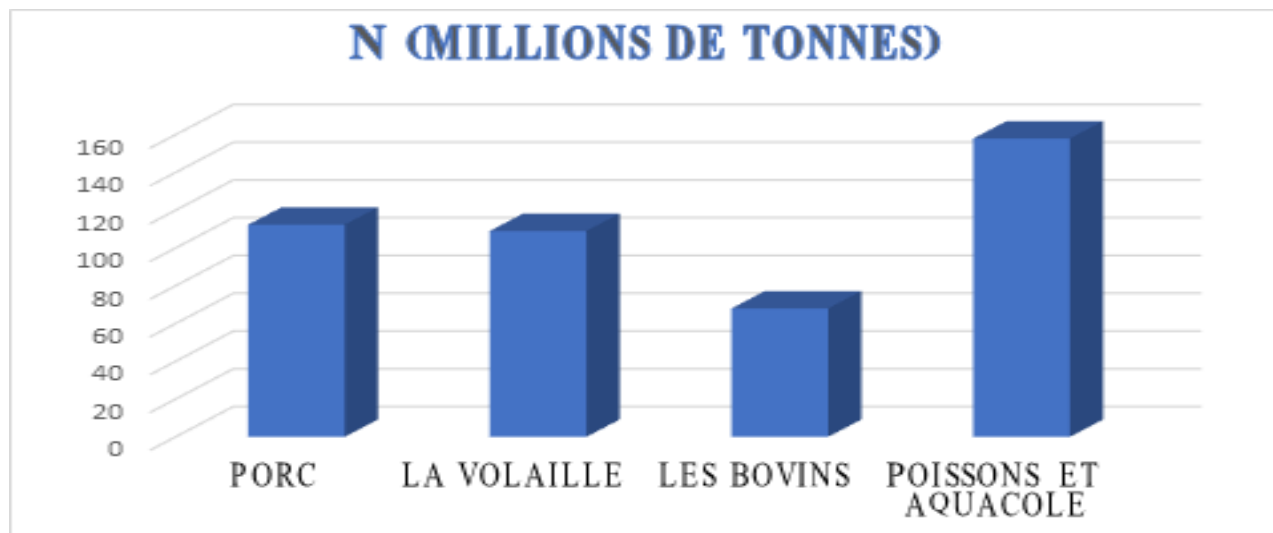


FIGURE 2 – Production mondiale des produits d'élevage animal. (OCDE/FAO, 2018).

4.1 Salmonellose et aviculture

Les Salmonelles sont présentes naturellement dans le microbiote intestinal des volailles et des mammifères en particulier le porc. Ces bactéries sont la cause commune de maladies d'origine alimentaire appelées salmonelloses, elles sont considérées comme le pathogène alimentaire le plus important responsable de toxi-infections digestives chez les humains et les animaux. La salmonellose est devenue une préoccupation majeure pour la santé publique dans le monde, c'est l'une des zoonoses les plus importantes, elle est généralement acquise par exposition alimentaire, également, elle est favorisée par le contact direct avec les animaux infectés (Sonalika *et al.* 2020).

Les produits de volailles contaminés, en particulier la viande mal cuite et les œufs crus (Tableau III), ont été signalés comme des sources importantes de salmonellose d'origine alimentaire. Les principaux sérovars de *Salmonella* associés à cette maladie chez l'homme sont *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium qui sont non seulement connus pour infecter les volailles, mais aussi comme agent potentiel de la gastro-entérite humaine (Res *et al.* 2018).

LES SALMONELLES ET LA SALMONELLOSE CHEZ LE POULET

TABLEAU III – Proportions des sérotypes de salmonelles dans divers spécimens de volailles (Res *et al.* 2018).

Source	Taux annuel n (%)						Total n(%)
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	
Viande	122 (79.2)	221 (81.5)	71 (38.2)	75 (100)	48 (62.3)	15 (100)	552 (71)
Sang	-	21 (7.7)	115 (61.8)	-	2 (2.6)	-	138 (17.7)
Fèces	19 (12.3)	14 (5.2)	-	-	27 (37.1)	-	60 (7.7)
Œuf	13 (8.4)	15 (5.5)	-	-	-	-	28 (3.6)
Total	154	271	186	75	77	15	778

4.2 Transmission de salmonelles

La transmission des salmonelles peut se faire par consommation de produits alimentaires contaminés par ces bactéries ou par contact direct avec des animaux malades .

Les principales personnes exposées aux salmonelloses sont les éleveurs, les employés d'abattoirs et les vétérinaires puisqu'ils sont en exposition directe et permanente aux infections transmises par les animaux. Ces individus deviennent à leurs tours des porteurs de salmonelles et provoquent la propagation de ses pathogènes dans l'environnement. Ce phénomène s'applique non seulement à l'industrie avicole, mais peut également s'étendre à d'autres industries animales comme le porc les bovins (Tableau VI). En outre, des bactéries résistantes peuvent également être transmises par la consommation de produits animaux, cette transmission n'est pas facile à prouver car le produit est exposé à des bactéries résistantes durant toutes les étapes de transformation des aliments (Mungroo *et Neethirajan* 2014; Vieco-Saiz *et al.* 2019).

TABLEAU VI – Les bactéries les plus fréquemment isolées dans les produits alimentaires d'origine animale (OMSA (OIE), 2006).

Animal	Bactéries *
Volaille	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Salmonella enterica</i>
	<i>Clostridium perfringens</i>
	<i>Campylobacter jejuni</i>
Porc	<i>Streptococcus suis</i>
	<i>Pasteurella multocida</i>
	<i>Escherichia coli</i>
Ruminants	<i>Salmonella abortusovis</i>
	<i>Brucella ovis</i>
	<i>Campylobacter</i>
	<i>Escherichia coli entérotoxigène</i>
Aquaculture	<i>Aeromonas salmonicida</i>
	<i>Vibrio anguillarum</i>
	<i>Pseudomonas spp.</i>
	<i>Streptococcus spp.</i>
	<i>Edwardsiella spp.</i>

*Potentiellement déclarés comme pathogènes ou bactéries Zoonotiques.

4.3 Les antibiotiques dans le secteur de la production des animaux

Les antibiotiques sont largement utilisés dans l'alimentation animale depuis le début des années 1940. L'emploi des antibiotiques dans le domaine vétérinaire a transformé radicalement l'industrie d'élevage, ces antibactériens sont utilisés principalement pour le traitement des infections bactériennes comme moyens de prévention des maladies. Ils sont aussi utilisés comme additif alimentaire pour les animaux afin de favoriser leur croissance et d'augmenter ainsi le rendement de l'élevage. Cette pratique s'avère très rentable du point de vue économique (Mungroo and Neethirajan 2014).

L'utilisation intensive de doses sous-thérapeutiques, administrées dans les opérations d'alimentation concentrée des animaux, augmente le risque du développement de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques. Ceci devient de plus en plus un problème inquiétant de santé publique, car le développement de résistance aux antibiotiques signifie une réduction de l'efficacité de ces médicaments dans le traitement des maladies infectieuses, ce qui augmente le taux de mortalité ou le coût de traitement. On cite comme exemple de danger causé par la résistance au antibiotique, la propagation de *Salmonella* dans la ville de Montevideo aux États-Unis, qui a provoqué l'infection de 245 personnes entre juillet 2009 et mars 2010, cette crise ne se limite pas qu'en Amérique du Nord, elle a causé aussi plus de 25 000 cas de décès en Europe (Sonalika *et al.* 2020).

Plusieurs familles d'antibiotiques sont additionnées dans les aliments des animaux d'élevage (Figure 3) comme : les bêtalactamines (pénicillines et céphalosporines), le chloramphénicol, les tétracyclines, les macrolides, la spectinomycine, les sulfonamides, les nitrofuranes, le triméthoprime, les nitroimidazoles, les polymyxines, les quinolones les macrocycliques et les glycaminosides.

Dans le domaine avicole, les agents antimicrobiens les plus utilisés pour la croissance et le traitement des infections sont les fluoroquinolones (FQ) et les sulfamides (SA) vu leur large spectre d'activité contre les bactéries à Gram négatif et a Gram positif. De ce fait, des résidus d'antibiotiques ont été trouvés dans des échantillons de viande de volailles, ces échantillons contenaient à la fois l'enrofloxacin (0,46 mg/kg) et la doxycycline (16,8 mg/kg). Les limites maximales de résidus (MRL) pour la doxycycline et pour la somme de l'enrofloxacin et de la ciprofloxacine dans le muscle de la volaille sont de 100 mg/kg (Bartkiene *et al.* 2020).

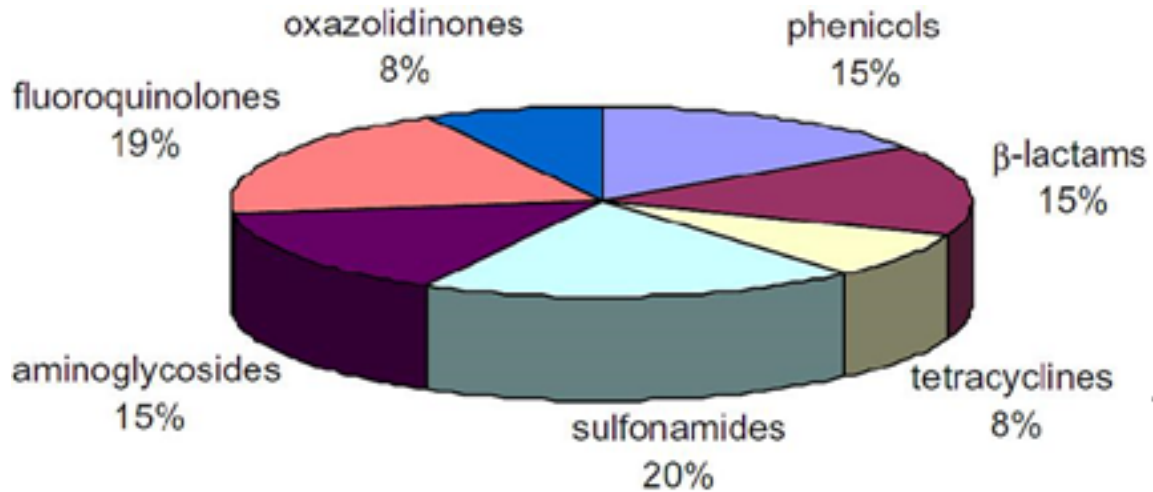


FIGURE 3 – Familles d’antibiotiques détectées dans les aliments d’origine animale (Bartkiene *et al.* 2020).

4.4 Risque de présence de résidus d’antibiotiques dans les produits de volailles

Plusieurs travaux ont montré que les produits avicoles sont une source potentielle de souches de *Salmonella* (Oliveira *et al.*, 2005 ; Singh *et al.*, 2010 ; Velasquez *et al.*, 2018). En effet, les salmonelles sont capables de survivre durant les étapes de transformation des produits de l’industrie avicoles et causer des toxi-infections généralement chez le consommateur, les infections gastro-intestinales humaines causées par *Salmonella* sont associées à la consommation de ces produits (Vinueza-Burgos *et al.*, 2019). Cependant, l’utilisation d’antibiotiques dans l’élevage des volailles pour les protéger contre les infections bactériennes n’est pas une solution adéquate, car elle favorise le développement de souches multi-résistantes aux antibiotiques, de plus les résidus d’antibiotiques peuvent affecter directement la croissance, le métabolisme et le système immunitaire humain (Muhammad *et al.*, 2020). Ces résidus peuvent provoquer l’émergence d’espèces bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques, ce qui présente un sérieux problème de santé publique. Par conséquent, plusieurs pays ont arrêté et interdit l’utilisation des antibiotiques comme stimulateurs de croissance dans l’élevage des animaux (Vieco-Saiz *et al.* 2019). Par ailleurs, trouver une alternative à l’utilisation des antibiotiques dans l’industrie de l’élevage animal est devenu une nécessité majeure.

CHAPITRE 2

LES BACTÉRIES LACTIQUES, PEUVENT-ELLES ÊTRE UNE ALTERNATIVE AUX ANTIBIOTIQUES POUR L'ALIMENTATION ANIMALE ?

1. Les probiotiques et leurs effets positifs sur la santé de l'hôte

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants (bactéries, levures et moisissures) qui procurent des bienfaits sur la santé de l'hôte lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes. Ils sont capables de : coloniser le système digestif de l'hôte, augmenter la flore bénéfique, prévenir la colonisation de l'intestin de l'hôte par des microorganismes pathogènes et assurer une digestion optimale des aliments. Les microorganismes avec la qualité probiotique doivent être dépourvus de tout effet nuisible (cytotoxicité, résistance aux antibiotiques, hémolyses).

En raison de leur potentiel de réduction des maladies entériques chez les volailles, les probiotiques sont considérés comme une bonne alternative à l'utilisation d'antibiotiques, ces bactéries sont potentiellement utilisables comme substituants d'antibiotiques en raison de leurs fonctions multiples. La production d'antimicrobiens (principalement d'acides organiques et de bactériocines) par de nombreuses bactéries lactiques dans l'intestin a conféré à ces organismes un avantage concurrentiel par rapport à d'autres microorganismes

LES BACTÉRIES LACTIQUES, PEUVENT-ELLES ÊTRE UNE ALTERNATIVE AUX ANTIBIOTIQUES POUR L'ALIMENTATION ANIMALE ?

à utiliser comme probiotiques. De plus, la présence de certains *Lactobacillus* dans le tube digestif du poulet a été décrite comme étant d'une grande importance pour la régulation de la composition de la microflore intestinale, le développement de l'immunité de l'intestin et la promotion de la santé des poulets (Fajardo *et al.* 2012). Parmi les probiotiques les plus intéressants, on trouve les bactéries lactiques, ces microorganismes présentent un grand intérêt pour la santé humaine et animale (Tableau v) (Alegre, 2009).

TABLEAU v – Bienfait des probiotiques sur la santé de l'hôte.

Effet des probiotiques	Mécanismes d'activités proposés
Amélioration de la digestion du lactose	-Action de la β – galactosidase bactérienne dans l'intestin grêle
Diminution des allergies alimentaires	-Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité intestinale -Simulation du système immunitaire
Réduction du risque des diarrhées	-Résistance à la colonisation par des agents pathogènes -Stimulation du système immunitaire
Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin	-Modulation de la flore intestinale -Stimulation du système immunitaire
Réduction du cholestérol	-Assimilation du cholestérol -Déconjugaison des sels biliaires
Prévention du cancer du colon	-Simulation du système immunitaire -Production de composés mutagéniques -Modulation des enzymes fécales carcinogéniques -Dégradation des carcinogènes -Élimination des bactéries impliquées dans la production de concéroène :

LES BACTÉRIES LACTIQUES, PEUVENT-ELLES ÊTRE UNE ALTERNATIVE AUX ANTIBIOTIQUES POUR L'ALIMENTATION ANIMALE ?

Actuellement, il est devenu possible d'utiliser les probiotiques comme stimulateurs de croissance non antibiotiques. Les bactéries lactiques offrent divers avantages autant que probiotique potentiel et peuvent être utilisées comme alternatives aux antibiotiques pour la production d'aliments pour les animaux.(Cheng *et al.* 2014)

2. Les probiotiques et l'alimentation animale

Afin de réduire les risques liés à l'utilisation des antibiotiques dans le domaine d'élevage des animaux, il a été suggéré que les probiotiques peuvent être utilisées comme une alternative. Ces probiotiques comportent des bactéries lactiques, des bactéries non lactiques et des champignons (levures et moisissures) (Tableau IV).

**LES BACTÉRIES LACTIQUES, PEUVENT-ELLES ÊTRE UNE
ALTERNATIVE AUX ANTIBIOTIQUES POUR L'ALIMENTATION
ANIMALE ?**

TABLEAU IV– Genres des probiotiques utilisés en élevage (Vieco-Saiz *et al.* 2019).

Animal	Levure	Bactéries		Champignons	Microalgues
		Laboratoire	Non-laboratoire		
Volaille	<i>Candida</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Saccharomyces</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Enterococcidie</i> <i>Weissella</i>	<i>Bacille</i> <i>Bifidobacterium</i>	<i>Aspergillus</i>	-
porc	<i>Saccharomyces</i> <i>Kluyveromyces</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Enterococcidie</i> <i>Weissella</i>	<i>Clostridium</i> <i>Bacille</i> <i>Bifidobacterium</i>	-	-
Ruminant	<i>Saccharomyces</i> <i>Trichorporon</i> <i>Kluyveromyces</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Enterococcidie</i>	<i>Megasphaera</i> <i>Bacille</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Prevotella</i>	<i>Aspergillus</i>	-
Aquaculture	<i>Saccharomyces</i> <i>Debaryomyces</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Enterococcidie</i> <i>Pediococcus</i> <i>Carnobacterium</i> <i>Weissella</i>	<i>Bacille</i> <i>Enterobacter</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Streptomyces</i> <i>Alteromonas</i> <i>Clostridium</i> <i>Roseabacter</i> <i>Eubacterium</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Micrococcidie</i> <i>Psychrobacter</i> <i>Microbacterie</i> <i>Brevibacterium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Tetraselmis</i> <i>Phaeodactylum</i>

LES BACTÉRIES LACTIQUES, PEUVENT-ELLES ÊTRE UNE ALTERNATIVE AUX ANTIBIOTIQUES POUR L'ALIMENTATION ANIMALE ?

En outre, les probiotiques ont diverses propriétés souhaitables dans les élevages avicoles. La phosphatase excrétée par certains probiotiques peut améliorer la digestion du phosphate (Neveling *et al.*, 2020). Aussi, les probiotiques possèdent des propriétés intéressantes comme leur capacité à se fixer aux cellules épithéliales intestinales empêchant l'installation des pathogènes, comme ils permettent l'amélioration de la croissance et du système immunitaire de la volaille (Soomro *et al.*, 2019 ; Mohammadreza *et al.*, 2020 ; Salehizadeh *et al.*, 2020). En plus des propriétés probiotiques susmentionnées, ces microorganismes peuvent inactiver les mycotoxines dans les aliments des animaux (Figure 4) (Haquea *et al.*, 2020).

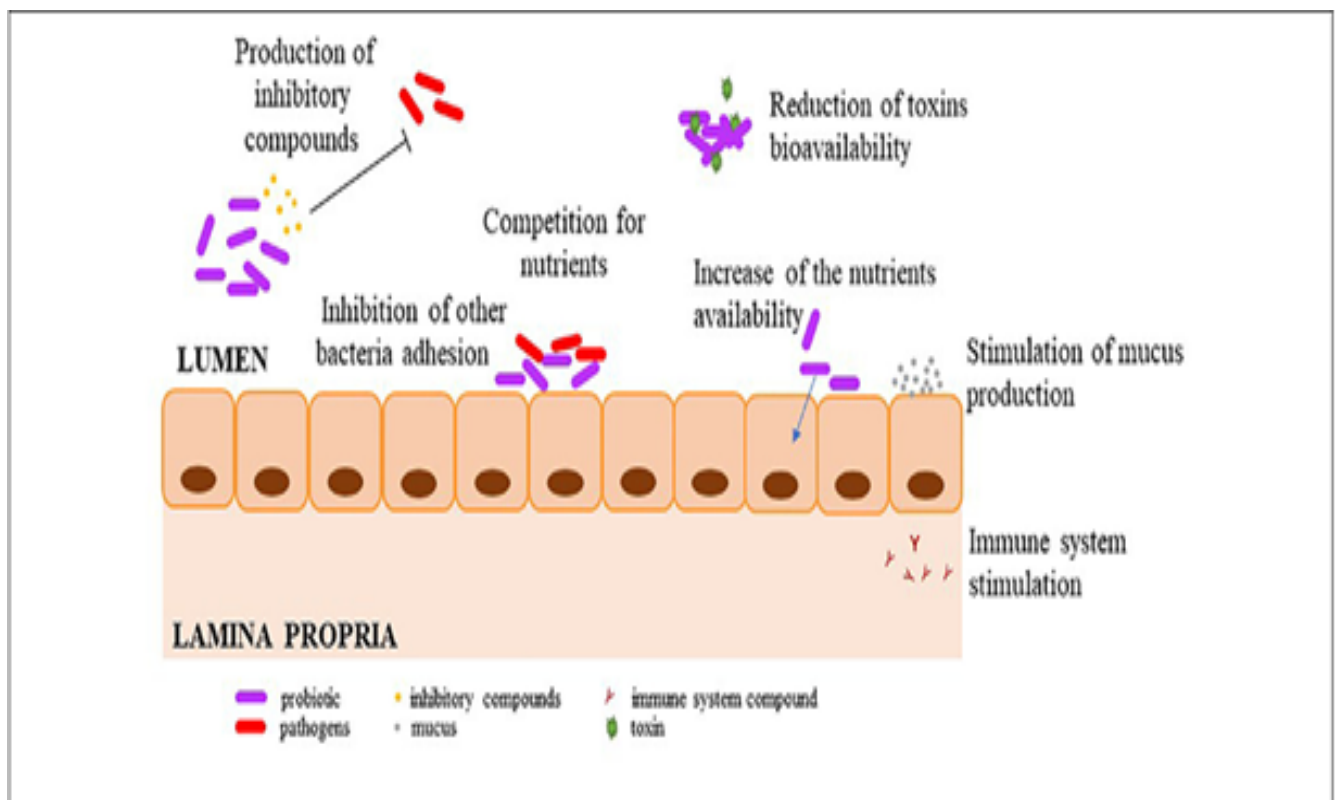


FIGURE 4– Mécanismes d'inhibition des agents pathogènes par les probiotiques (Vieco-Saiz *et al.* 2019).

D'un autre côté, des métabolites produits par les probiotiques connus sous le nom de métabolites post-biotiques sont utilisés en tant qu'additifs pour l'alimentation animale. Ces additifs sont composés principalement de l'acide lactique, de l'acide acétique et éventuellement de bactériocines (Loh *et al.*, 2014).

3. Les bactéries lactiques

Les probiotiques les plus importants sont des bactéries lactiques du fait de leur caractère ubiquitaire, leurs activités antimicrobiennes à large spectre, leur innocuité et leur habilité à cohabiter avec le microbiote indigène de l'hôte (Holzapfel and Wood 2014).

3.1. Généralité :

Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries hétérogènes qui a été défini, pour la première fois, par Orla-Jensen en 1919, ce groupe contient plusieurs genres de bactéries à Gram positif possédant un ensemble de caractéristiques physiologiques et métaboliques en communs. Ces bactéries sont non sporulées et catalase négative, elles sont des hétérotrophes glucidolytiques (peu protéolytiques) ayant un métabolisme exclusivement fermentaire où elles produisent l'acide lactique comme produit majeur de fermentation (au moins 50% des produits finaux de fermentation) (Holzapfel and Wood, 2014).

3.2. Principales caractéristiques :

Les bactéries lactiques sont des bacilles, coccobacilles ou cocci à Gram positif, asporulés, généralement immobiles, anaérobies facultatifs avec absence de nitrate-réductase et de cytochrome-oxydase. Elles ne produisent ni l'indole ni l'hydrogène sulfureux, et seulement quelques espèces hydrolysent la caséine. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et les acides gras (Dellaglio et al., 1994). Elles sont généralement mésophiles mais certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent majoritairement à pH 5,5 – 6,5.

Selon le type de fermentation, les bactéries lactiques peuvent être :

- Homofermentaires stricts : la fermentation du glucose produit uniquement de l'acide lactique et elles sont incapables de fermenter les pentoses.

- Hétérofermentaires stricts : la fermentation du glucose produit majoritairement de l'acide lactique, mais aussi d'autres composés tels que l'acide acétique, l'éthanol et le CO₂ sont produits, elles sont capables de fermenter les pentoses.

LES BACTÉRIES LACTIQUES, PEUVENT-ELLES ÊTRE UNE ALTERNATIVE AUX ANTIBIOTIQUES POUR L'ALIMENTATION ANIMALE ?

- Hétérofermentaires facultatifs : la fermentation du glucose produit uniquement de l'acide lactique et la fermentation des pentoses produits majoritairement l'acide lactique et d'autres composés (acide acétique, l'éthanol et le CO₂) (Dellaglio *et al.*, 1994)

3.3. Taxonomie des bactéries lactiques :

Orla-Jensen a classé les bactéries lactiques, sur la base de leurs morphologies, écologies et propriétés physiologiques, en trois genres : *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium*. Ultérieurement et en se basant sur le type fermentaire et la morphologie cellulaire, il les a classées en huit genres : *Streptococcus*, *Streptobacterium*, *Tetracoccus*, *Thermobacterium*, *Betacoccus*, *Streptobacterium*, *Betabacterium*, *Microbacterium*, *Bacterium bifidum* (Heineman, 1920).

Les bactéries lactiques appartiennent au phylum des *Firmicutes* (à l'exception du genre *Bifidobacterium*) à la classe des *Bacilli*, et à l'ordre des *Lactobacillales*, phylogénétiquement elles sont proches de la classe des *Clostridia* (GC% < 50%) (Bergey's manuel, 2009 ; Bergey's manuel, 2012)

Récemment, l'utilisation de techniques de biologie moléculaire et de chimio-taxonomie ont permis de faire des changements significatifs dans la taxonomie des bactéries lactiques. Par conséquent, les bactéries lactiques sont regroupées dans plus de 30 genres dont 12 sont d'origine alimentaire, il s'agit de : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Tetragenococcus* et . Le genre de *Lactobacillus* est le plus important et comporte environ 80 espèces identifiées, ce genre a connu un changement radical de classification, il est divisé en 23 genres sur la base de la composition cellulaire en protéines membranaires (Zheng *et al.* 2020).

3.4 Pouvoir antimicrobiens des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des microorganismes capables de produire différents composés inhibiteurs tels que : les bactériocines, les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et le dioxyde de carbone. Chez l'hôte, ils peuvent inhiber les microorganismes nocifs avec leur arsenal antimicrobien ou par un mécanisme d'exclusion concurrentiel basé sur la compétition pour les sites de fixation intestinaux et les oligo-nutriments. De plus, les bactéries lactiques sont dotées de fonctions enzymatiques intéressantes (amylases, protéases . . . etc.), qui peuvent améliorer la digestion des aliments ainsi que la stimulation du système immunitaire animal (Vieco-Saiz *et al.* 2019).

3.4.1 Production des acides organiques :

Les propriétés inhibitrices des bactéries lactiques résident, entre autres, dans leur production d'acides organiques, notamment les acides lactique et acétique. L'effet inhibiteur de ces acides est étroitement lié à la diminution de pH du milieu, et à la fraction d'acide non dissociée de l'acide organique, cette fraction étant lipophile peut diffuser passivement à travers la membrane cytoplasmique des bactéries cibles et dissiper le gradient électrochimique des protons, cela provoque une perturbation des systèmes de transport de substrat et la dissipation de la force protomotrice (inhibition de la synthèse de l'ATP) (Ammor, 2004). De plus, la dissociation de l'acide organique dans le cytoplasme de la bactérie cible provoque l'abaissement du pH cytoplasmique ce qui interfère avec les réactions enzymatiques cellulaires des bactéries indésirables (Talon *et al.*, 1980).

3.4.2 Les bactériocines :

La première bactériocine des bactéries lactiques fut découverte en 1928 par Rogers, elle est produite par *Lactococcus lactis*. En 1953, Jacob *et al.* proposèrent le terme générale «bactériocine » pour désigner ces substances antibactériennes, elles furent définies comme étant des antibiotiques protéiques, caractérisés par une activité bactéricide intra-espèce et une fixation sur des récepteurs spécifiques sur la surface des cellules cibles (Dortu, 2009).

LES BACTÉRIES LACTIQUES, PEUVENT-ELLES ÊTRE UNE ALTERNATIVE AUX ANTIBIOTIQUES POUR L'ALIMENTATION ANIMALE ?

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont le plus souvent dépourvues de caractères cytotoxiques et elles sont dotées de fonctions antagonistes ainsi que d'autres attributs bénéfiques (Dridier *et al.*, 2016 ; Chikindas *et al.*, 2018). Les bactériocines des bactéries lactiques sont considérées comme une nouvelle génération d'antibiotiques avec de puissantes activités *in vitro* et *in vivo* (Stern *et al.*, 2008 ; Rihakova *et al.*, 2010 ; Al Atya *et al.*, 2016 ; Jiang *et al.*, 2016 ; Caly *et al.*, 2017 ; Seddik *et al.*, 2017). Contrairement aux antibiotiques traditionnels, les bactériocines ciblent des espèces spécifiques et n'affectent pas d'autres populations au sein du même écosystème. Les combinaisons de bactériocines et d'antibiotiques classiques semblent être une nouvelle option thérapeutique (Naghmouchi *et al.*, 2010, 2011, 2013 ; Al Atya *et al.*, 2016, Bendjeddou *et al.*, 2021). Plusieurs rapports sont publiés sur les principaux avantages et actions synergiques des bactériocines associées à d'autres biomolécules, c'est le cas de la nisine et des bêta-lactames contre *Salmonella enterica* (Singh *et al.*, 2014), de la nisine et de l'acide citrique contre *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (Zhao *et coll.*, 2017), de l'entéroisine AS-48 et l'éthambutol contre *Mycobacterium tuberculosis* (Aguilar-Pérez *et al.*, 2018), de la garvicine KA et le farnésol contre un ensemble de bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Chi *et Holo*, 2018) et de l'entéroisine DD14 et l'érythromycine contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (Bendjeddou *et al.*, 2021)

Cependant, l'administration orale de ces substances est un défi en raison de leur dégradation par les enzymes digestives. Ce cas a été rapporté *in vivo* pour la lacticine 3147 et la nisine (Gardiner *et al.*, 2007 ; Gough *et coll.*, 2018).

PARTIE PRATIQUE

1 Origine des souches

1.1 Souches tests

Les souches tests utilisées pour la réalisation de ce travail sont isolées à partir des selles de poulets.

1.2 Souches cibles

Des essais d'isolement de souches cibles ont été effectués sur des échantillons de selles prélevées dans les mêmes conditions suscitées.

1.3 Prélèvement des échantillons

1.3.1 Echantillons de selles

La moitié des prélèvements est utilisée pour l'isolement des souches tests et l'autre moitié pour l'isolement des souches cibles.

1.4 Isolement des souches

Différentes méthodes et milieux sont utilisés pour l'isolement des souches bactériennes suivant la nature du prélèvement et les souches recherchées.

1.4.1 Isolement des souches tests

Les souches tests sont isolées à partir des selles de poulet. En effet, dix échantillons sont introduits dans un bouillon MRS et incubés pendant 48h. Après incubation, un isolement par des stries serrées est réalisé sur gélose MRS.

1.4.2 Isolement des salmonelles :

Dix échantillons de selles sont introduits, séparément du bouillon sélénite et incubés à 37 °C pendant 24h. Après incubation, l'isolement des salmonelles est effectué sur gélose *Salmonella/Shigella* (S/S), L'incubation est effectuée à 37 °C pendant 24h.

1.5 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

La recherche et la mise en évidence de l'activité antibactérienne ont été réalisées par plusieurs techniques.

1.5.1 Technique de double couche :

Cinq colonies de salmonelles (souche cible) de taille moyenne ont été prélevée à partir d'une culture de 24h sur gélose nutritive, puis mise en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile, 1ml de cette suspension est mis dans 100 ml de gélose Muller Hinton.

Des colonies (souches tests) obtenues sur milieu MRS à différents pH ont été repiquées par des stries serrées sur gélose MRS . Ensuite, une fine couche de gélose Muller Hinton contenant la souche cible (préparée comme susciter) est coulée en surface sur les cultures des souches tests.

1.5.2 Purification des souches actives :

Les colonies présentant une activité antibactérienne à l'égard de la souche de *Salmonella* sont récupérées et repiquées plusieurs fois successif (3 fois minimum) sur gélose MRS afin de les purifier.

1.5.3 Test des spots :

Ce test a pour but de vérifier l'activité antibactérienne des souches tests à l'égard des souches cibles. Les isolats actifs et purs sont cultivés sur bouillon MRS, puis des spots sont déposés sur gélose MRS. Après incubation, une couche fine de gélose Muller Hinton contenant la souche cible préparée par la méthode suscitée, est versée sur les boites contenant les spots puis incubée à 37 °C pendant 24h.

1.5.4 Technique des disques d'agar :

Les spots des isolats actifs sont préparés par la méthode suscitée, des disques sont ensuite déposés sur une gélose Muller Hinton préalablement ensemencée par la souche cible avec la même méthode précédente, les boites sont incubées 24h à 37 °C.

1.6 Production de substance(s) antibactérienne(s) sur milieu liquide

Des colonies des isolats actifs sont cultivées dans le bouillon MRS puis incubé pendant 24 à 48h à 30 °C. Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 8000g pendant 30min à 4 °C afin de récupérer les surnageants. Les surnageants obtenus ont été concentrés à l'aide d'un rotavapor à 40 °C.

*** Test d'activité antibactérienne :**

Une gélose Muller Hinton a été ensemencée avec la souche cible par la méthode suscitée, ensuite des puits de diamètre sont réalisés . Des aliquotes de chaque surnageant concentré et natif sont déposés dans les puits, les boites sont incubées 24h à 37 °C.

1.7 Identification préliminaires des souches tests :

Afin de déterminer l'appartenance des isolats actifs aux groupes des bactéries lactiques, des tests préliminaires sont effectués à savoir la coloration de Gram et le test de catalase.

1 Résultats

1.1 Isolement des souches

1.1.1 Souche test :

L'isolement des souches tests a été réalisés sur dix échantillons prélevés des selles de poulet. Dans le bouillon MRS, les résultats obtenus ont montré l'apparition d'un trouble.

1.1.2 Souches cibles :

L'isolement des souches cibles est effectué sur dix-sept échantillons, dont dix à partir de selles de poulet et sept à partir d'échantillons de merguez.

- **Selles :** Après enrichissement sur bouillon sélénite et ensemencement (en surface par écouvillonnage sur gélose *Salmonella/Shigella* (S/S), des colonies roses caractéristiques d'*Escherichia coli* ont été obtenues, toutefois il a été remarqué l'absence de colonies caractéristiques des salmonelles à savoir des colonies incolore avec centre noir. Ces résultats signifient l'absence de *Salmonella* dans les échantillons utilisés.

Vu les résultats négatifs concernant l'isolement des souches de *Salmonella*, une souche de référence de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis a été utilisée pour la réalisation du reste du travail.

1.2 Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Dans cette étude, des souches tests isolées à partir de selles de poulet sont utilisées pour la recherche de leur effet antibactérien contre *Salmonella* Enteritidis. Pour ce fait, plusieurs techniques sont réalisées.

1.2.1 Technique double couche :

Les tests de sélection de souches actives contre *Salmonella* Enteritidis à partir des selles de poulet ont montré que tous les échantillons étudiés comportent des souches douées d'activité anti-*Salmonella*, cette activité est révélée par la présence de zones d'inhibition autour des colonies des souches tests.

1.2.2 Technique des spots :

Le test des spots a pour but la vérification des résultats obtenus par le test des doubles couches. Après purification des colonies souches actives, ce test a permis de sélectionner 63 souches performantes. Néanmoins, cette activité était faible et elle a donné des petites zones d'inhibition d'environ 2 mm de diamètre (Figure 5).



FIGURE 5 – Test des spots des isolats actifs vis-à-vis de *Salmonella* .

1.2.3 Test des disques agar :

Cette méthode est une technique qualitative permettant la confirmation et l'évaluation de l'effet antagoniste obtenu par le test des spots. Après incubation des disques d'agar 24h à 37°C en contact avec la souche cible, il a été observé l'apparition de petites zones d'inhibition autour des disques ce qui confirme la présence d'activité anti- Salmonelles (Figure 6).

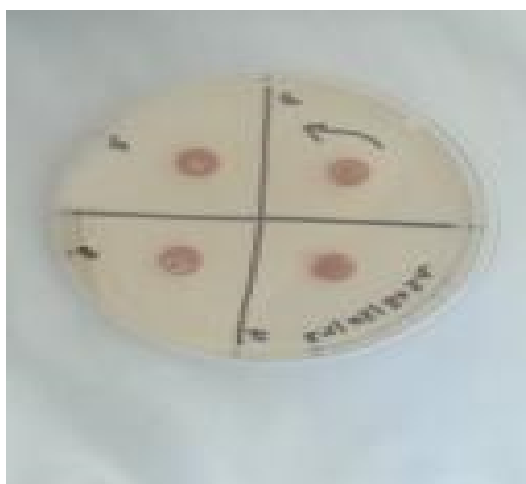


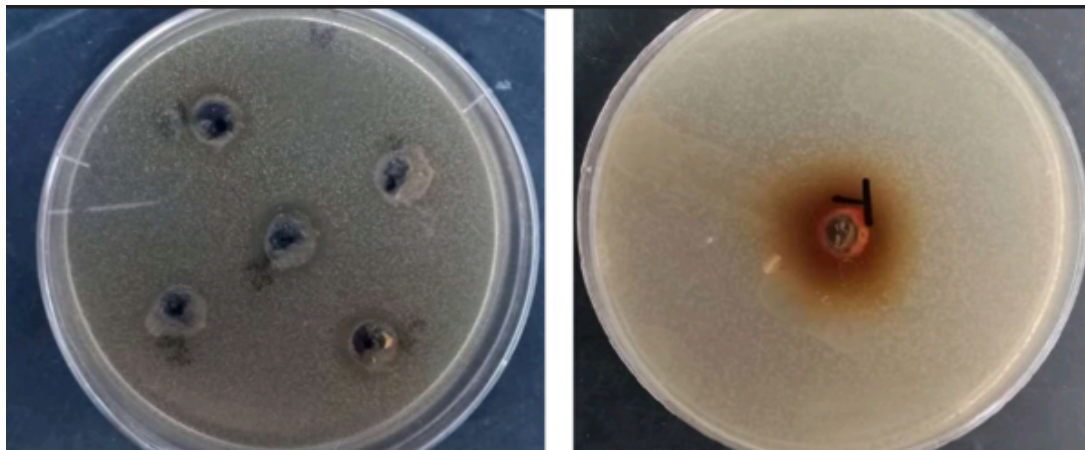
FIGURE 6– Test des disques d'agar des isolats actifs vis-à-vis de *Salmonella* .

1.2.4 Test des puits :

Le but de ce test est de confirmer la capacité des souches tests d'exercer leur effet antibactérien sur milieu liquide. Etant donné que l'activité anti- *Salmonella* obtenue par les tests précédents était faible, une concentration des surnageants des cultures des souches tests a été effectuée. Les activités antibactériennes des surnageants natifs (non concentré) et concentré ont été réalisées à l'égard de *Salmonella* Enteritidis et comparées l'une par rapport à l'autre.

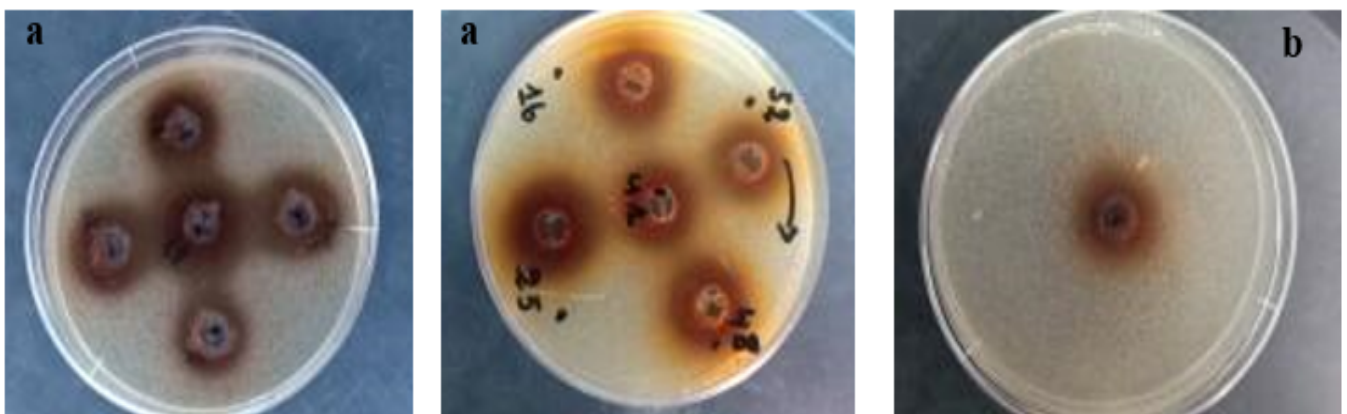
Les résultats de l'activité antagoniste du surnageant natif des cultures des souches tests à l'égard de souche cibles ont montré que l'effet antibactérien des souches tests est variable selon les souches (Figure 7), la souche la plus active est S01 avec une zone d'inhibition de 16 mm et les souches les moins actives sont les souches : S17, S19 et S28 avec une zone d'inhibition de 8 mm de diamètre. Les souches les plus performantes sont : S04, S05, S25, S26, S30, S33, S50 et S53 ayant donné des zones d'inhibition entre 20 mm et 22 mm de diamètre, les meilleures souches sont S33 et S53. Toutefois, le reste des souches ont donné une activité antibactérienne moyenne il s'agit des souches : S21, S22, S11, S13 et S42.

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Edna *et al.*, (2007) qui ont montré qu'une souche de *Lactobacillus reuteri* isolées des selles des poulets présente un effet antibactérien à l'égard de *Salmonella* Enteritidis avec des zones d'inhibition de 8 à 12 mm de diamètre. Cette activité est attribuée à une substance de nature protéique type bactériocine.



a : Zones d'inhibition des isolats non concentrés b : Témoin (MRS ordinaire non concentrés)

FIGURE 7 – Zones d'inhibition des surnageants non concentrés des isolats actifs à l'égard de *Salmonella* Enteritidis .



a : Zones d'inhibition des isolats b : Témoin (MRS ordinaire concentré).

FIGURE 8 – Zones d'inhibition des surnageants concentrés des isolats actifs à l'égard de *Salmonella* Enteritidis .

1.3 Test d'identification préliminaire des souches tests

1.3.1 Coloration de Gram :

Les résultats de la coloration de Gram ont montré que la plupart des souches actives sont Gram positive (tableau VIII), cependant certaines souches sont Gram négatif. Parmi ces dernières, certains isolats ont montré une bonne activité antimicrobienne contre *Salmonella* Enteritidis, en particulier les souches : S30 et S50.

1.3.2 Test de Catalase :

Le test de catalase permet de tester la capacité des souches à dégrader le peroxyde d'hydrogène, ce test est important car il permet la distinction entre les bactéries lactiques qui sont des bactéries catalase négative et les autres bactéries Gram positives. La majorité des souches tests étudiées sont catalase négative.(tableau VIII)

2 Discussion

Pendant longtemps, les antibiotiques ont été utilisés dans le but d'améliorer le rendement d'élevage et prévenir les maladies chez les animaux, l'utilisation excessive de ces antibiotiques a entraîné une augmentation des risques d'anti-biorésistance, d'où la nécessité de trouver des alternatives afin de réduire leur utilisation dans le domaine d'élevage des animaux. Dans ce contexte, plusieurs travaux ont été réalisés, parmi eux, ont cité l'utilisation de probiotiques (Wilson *et al.*, 2005). Ces microorganismes sont connus par leur effet antibactérien à l'égard de plusieurs bactéries à Gram négatif et gram positif, cet effet est exercé par différents mécanismes d'action comme la production d'acides organiques, la production de peroxyde d'hydrogène, le changement de la force proton-motrice et la production de composés de type bactériocines. D'autres études ont porté sur la conservation des produits carnés en utilisant des bactéries lactiques en particulier les souches productrices de bactériocines (Lindgren and Dobroqosz, 1990).

D'autres travaux ont visé l'étude de l'effet anti-*Salmonella* des acides organiques. En effet, (Byrd *et al.*, 1998) ont montré que l'utilisation d'acides organiques (0,5% d'acide acétique, lactique ou formique) dans l'eau de boisson des poulets de chair a considérablement réduit le pH et la présence des *Salmonella* dans le milieu, par ailleurs l'utilisation de l'acide lactique a significativement diminué la présence des salmonelles de 52,4%.

Baaboua *et al.* (2018), ont rapporté que les acides : tartrique, citrique, acétique et lactique présentent un effet inhibiteur à l'égard de *Salmonella* Typhimurium (103 UFC/ml) chez des poussins de poule à des concentrations de 0,312%, 0,625%, 0,512% et 0,078% respectivement.

D'autres travaux ont étudié la possibilité d'utiliser des probiotiques pour le contrôle in vivo des salmonelles chez le poulet. En effet, Ehrmann *et al.* (2002), ont montré que l'utilisation de deux souches probiotiques : *Lactobacillus animalis* TMW et *Lactobacillus salivarius* TMW comme complément alimentaire a permis de contrôler l'infection chez le canard.

Des résultats similaires rapportés par Yang *et al.*, (2011) ont suggéré que l'utilisation d'*Enterococcus faecium* et de *Pediococcus parvulus* a permis d'améliorer la croissance des poulets et de contrôler la présence de salmonelles dans leur tractus intestinales.

CONCLUSION

L'incorporation des antibiotiques dans les aliments des animaux, afin d'augmenter la quantité et la qualité du rendement des produits d'élevage avicole, est pratiquement répondu depuis les années 1940. Toutefois, cette application entraîne des risques d'antibiorésistance et d'autres soucis de santé publique. Pour remédier à ces problèmes, des alternatives à l'utilisation des antibiotiques ont été proposées parmi lesquelles on cite l'utilisation des probiotiques ou de leurs métabolites.

Dans cette optique, des souches isolées à partir des selles de poulets ont fait l'objet de cette étude. De ce fait, soixante-trois souches ont été isolées à partir des selles de poulets de ferme et sélectionnées par la technique de double couche. Les isolats obtenus présentent toute une activité antibactérienne envers *Salmonella* Enteritidis, cette activité antagoniste est confirmée par la technique des disques d'agar.

L'aptitude des souches isolées à produire des substances antibactériennes (anti*Salmonella*) dans un milieu liquide a été testée sur bouillon MRS. Les résultats obtenus ont montré que les surnageants natifs ont présenté des effets antibactériens plus ou moins prononcés, cet effet antibactérien est souches-dépendant.

L'identification préliminaire des souches étudiées (coloration de Gram et catalase) a montré que la majorité des souches actives sont Gram positives et catalase négatives, ces deux caractères sont des clés d'identification des bactéries lactiques.

Les résultats obtenus par la présente étude restent préliminaires, ils doivent être complétés par d'autres travaux à savoir :

- Identifier les meilleurs isolats actifs.
- Mise en évidence de l'origine de l'antibiose.
- Elargir l'étude de l'activité antibactérienne à d'autres bactéries à Gram négatives et positives.
- Confirmer l'effet antagoniste par des cultures mixtes.
- Effectuer une étude *in vivo* afin de déterminer la toxicité des souches et/ou les substances antibactériennes ainsi que prouver leur efficacité à prévenir du poulet des salmonelloses

BIBLIOGRAPHIE

Andino A, Hanning I (2015). *Salmonella enterica* : Survival, colonization, and virulence differences among serovars. *Sci World J.* <https://doi.org/10.1155/2015/520179>.

Aguilar-Pérez C, Gracia B, Rodrigues L, Vitoria A, Cebrián R, Deboosère N ,et al. (2018). Synergy between circular bacteriocin AS-48 and ethambutol against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 :e00359-18. doi : 10.1128/AAC.00359-18.

Bartkiene E, Ruzauskas M, Bartkevics V, et al (2020). Study of the antibiotic residues in poultry meat in some of the EU countries and selection of the best compositions of lactic acid bacteria and essential oils against *Salmonella enterica*. *Poult Sci* 99 :4065–4076. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.002>.

Bendjeddou K, Hamma-Faradji S, Meddour AA, Belguesmia Y, Cudennec B, Bendali F, Daube G, Taminiau B, Drider D (2021). Gut microbiota, body weight and histopathological examinations in experimental infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : antibiotic versus bacteriocin. *Benef Microbes*.

Jun 15 ;12(3) :295-305. doi : 10.3920/BM2020.0155. Epub 2021 Apr 1. PMID : 33789553.

- Brown JH (1935).** Theobald Smith 1859-1934, J Bacteriol., 30 : 1, 1–3.
- Chi H, and Holo H. (2018).** Synergistic antimicrobial activity between the broad spectrum bacteriocin garvicin KS and nisin, farnesol and polymyxin B against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Curr. Microbiol. 75, 272–277. doi :10.1007/s00284-017-1375-y.
- Delarra C (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. ; pp :150.
- Dellaglio F, Felis GE, Castioni A, Torriani S, Germond JE (2005).** *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus* subsp. *nov.*, isolated from Indian dairy products. Int J Syst Evol Microbiol ;55 :401–404.
- Dortu C, Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 13(1), 143-154.
- Drider D, Bendali F, Naghmouchi K, and Chikindas ML. (2016).** Bacteriocins : not only antibacterial agents. Probiotics Antimicrob. Proteins 8, 177–182. doi : 10.1007/s12602-016-9223-0.
- Fajardo P, Pastrana L, Rodr I, et al . (2012).** The scientific World-JOURNAL Effects of Feeding of Two Potentially Probiotic Preparations from Lactic Acid Bacteria on the Performance and Faecal Microflora of. 2012 :14–16. <https://doi.org/10.1100/2012/562635>.
- Gardiner GE, Rea MC, Riordan BO, Connor P O, Morgan SM, Lawlor PG, et al. (2007).** Fate of the two-component lantibiotic lactacin 3147 in the gastrointestinal tract. Appl. Environ. Microbiol. 73, 7103–7109. doi : 10.1128/AEM.01117-07.

Grimont PA. (2014). Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella WHO Collaborating Centre for Reference.

Haquea MA, Y Wanga Z, Shenc X, Lia MK, Saleemid, and C Hea. (2020). Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry : a review. *Microb. Pathogenesis* 142 :104095.

Heineman PG. (1920). Orla-Jensen's Classification of Lactic Acid Bacteria. *J Dairy Sci* 3 :143–155. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(20\)94257-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(20)94257-1).

Holzappel WH, Wood BJB. (2014). Lactic Acid Bacteria : Biodiversity and Taxonomy. *Lact Acid Bact Biodivers Taxon* 9781444333 :1–606. <https://doi.org/10.1002/9781118655252>.

Humbert M, Monti G, Fartoukh M, Magnan, A Brenot, F Rain, B, ... Emilie D. (1998). Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension : comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *European Respiratory Journal*, 11(3), 554-559.

Izquierdo Alegre, E. (2009). Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique (Doctoral dissertation, Strasbourg).

Loh TC, Choe DW, Foo HL, et al. (2014). Effects of feeding different postbiotic metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* strains on egg quality and production performance, faecal parameters and plasma cholesterol in laying hens. *10* :1–9. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-149>.

Le Minor L, Popoff M Y. (1987). Request for an Opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Bacteriol* 37, 465–468.

Le Minor L. (1989). Les Entérobactéries. Dans : Bactériologie Médicale. 2^{ème} Ed. Flammarion. Paris, 741-823.

Muhammad J, Khan S, Su JQ, HeshamAE L, Ditta A, Nawab J et Ali A. (2020). Antibiotiques dans le fumier de volaille et leurs problèmes de santé connexes : un examen systématique. J. Soils Sediments 20 : 486-497.

Mungroo NA, Neethirajan S. (2014). Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry-A Review. Biosensors 4 :472–493.<https://doi.org/10.3390/bios4040472>.

Naghmouchi K, Drider D, Baah J, and Teather R. (2010). Nisin A and polymyxin B as synergistic inhibitors of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Probiotics Antimicrob. Proteins 2, 98–103. doi : 10.1007/s12602-009-9033-8.

Neveling D P, Ahire J J, Laubscher W, Rautenbach M, and Dicks L M T. (2020). Genetic and phenotypic characteristics of a multi-strain probiotic for broilers. Curr. Microbiol. 77 :369–387.

OECD/FAO (2018). OCDE - Perspectives agricoles de la FAO 2018 - 2027. Paris : OCDE. (consulté mai 2021).

OMSA (OIE),2006, (<http://www.oie.int/fr/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2006/>). consulté en juin 2021.

Oliveira S D, F S Flores, L R. Dos Santos et A. Brandelli. (2005). Résistance antimicrobienne chez les souches de *Salmonella enteritidis* isolées de carcasses de poulets de chair, d'échantillons alimentaires, humains et de volailles. Intervalle. J. Food Microbiol. 97 : 297-305.

Reeves MW, Evin G M, Heiba A A, Plikaytis B D, Farmer 3rd J J. (1989). Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other

salmonellasalmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. Journal of clinical microbiology, 27(2), 313-320.

Res M, Ruts C, Hospital CR, et al. (2018). Prevalence of. 517–520. <https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR> Shelobolina, E. S., C. Gaw VanPraagh, and D. R. Lovley. (2003). Use of ferric and ferrous iron containing minerals for respiration by *Desulfotobacterium frappieri*. Geomicrobiol. J. 20 :143–156.

Sonalika J, Srujana AS, Akhila DS, et al. (2020). Application of bacteriophages to control *Salmonella Enteritidis* in raw eggs. Iran J Vet Res 21 :221–225. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2020.36349.5307>

Soomro R N, Abd El-Hack M E, Shah S S., A E, Taha, Alagawany M, Swelum AA., Hussein E O S, H, Ba-Aawdh A, Saadeldin I, and El-Edel M A, et al. (2019). Impact of restricting feed and probiotic supplementation on growth performance, mortality and carcass traits of meat-type quails. Anim. Sci. J. 90 :1388– 1395.

Stern N, Eruslanov J, Pokhilenko BV, Kovalev VD, Volodina Y N, Perelygin LL, V V, et al. (2008). Bacteriocins reduce *Campylobacter jejuni* colonization while bacteria producing bacteriocins are ineffective. Microb. Ecol. Health Dis. 20, 74–79. doi : 10.1080/08910600802030196

TALON, D., BRIAND, M. (1980). ISOLEMENT ET ETUDE D'UN BACTERIOPHAGE DE *PSEUDOMONAS TESTOSTERONI*.

indall BJ, Grimont PAD, Garrity GM, Euze JP. (2005). Taxonomic Note Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. 521–524. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.63580-0>.

Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R, et al. (2019). Benefits and

inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Front Microbiol* 10 :1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>.

Vinueza-Burgos C, Ortega-Paredes, Narváez D, De Zutter C, Zurita L, J. (2019). Characterization of cefotaxime resistant *Escherichia coli* isolated from broiler farms in Ecuador. *PLoS One*, 14(4), e0207567.

Wilson, A.R., Sigeo, D. et Epton, H.A.S. (2005). Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *J. Appl. Microbiol.* 99 : 1516-1522.

Willey LM, Sherwood JM, Woolverton CJ. (2018). Prescott's Microbiologie, 10th Edition, Mc Graw Hill Education, p. 520.

Zhao X, Zhen, Wang ZX and Guo N. (2017). Synergy of a combination of nisin and citric acid against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* *Food Addit. Contam. Part A* 34, 2058–2068. doi : 10.1080/19440049.2017.1366076.

Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, et al. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus* : Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinckii* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 70 :2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>.

ANNEXE A

LES MILIEUX DE CULTURES

ANNEXE A. LES MILIEUX DE CULTURES

TABLE A.1 – Gélose MRS ordinaire

Compositions	Quantité(g/l)
Polypeptone	10
Extrait de viande	10
Extrait autolytique de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1,08
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	0,20
Sulfate de manganèse	0,05
Agar agar bactériologique	15

TABLE A.3 – Gélose nutritif

Compositions	Quantité(g/l)
Tryptone	5
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Chlorure de sodium	5
Agar agar bactériologique	12

TABLE A.2 – Gélose Xylose Lysine Décarboxylase XLD

Compositions	Quantité(g/l)
Extrait de levure	03
L-Lysine	05
Lactose	07.5
saccharose	07.5
chlorure de sodium	05
thiosulfate de sodium	06.80
Citrate ferrique ammoniacal	0.80
Desoxycholate de sodium	02.5
Rouge de phénol	0,08
Agar	13.5 15

TABLE A.4 – Gélose Muller Hinton (MH)

Compositions	Quantité(g/l)
Peptone	3
Hydrolysate de caséine	17,5
Agar	15
Ca ²⁺	20-25
Mg ²⁺	10-12,5

TABLE A.5 – Gélose Salmonella/Shiguelia (SS) pH=7.3

Compositions	Quantité(g/l)
Peptone	5
Extrait de viande	5
Sels biliars	8,5
Vert brillant	0,33
Lactose	10
Rouge neutre	25
Thiosulfate de sodium	8,5
Citrate ferrique ammoniacal	1
Citrate de sodium	8,5
Agar	15

TABLE A.6 – Bouillon MRS

Composition	Quantité (g/l)
Polypeptone	10
Extrait de viande	10
Extrait autolytique de levure	05
Glucose	20
Tween 80	01.08
Phosphate dipotassique	02
Acetate de sodium	05
Citrate ammonium	02
Sulfate de magnésium	0,20
Sulfate de manganèse	0.05

TABLE A.7– Bouillon de Sélénite

Compositions	Quantité(g/l)
Tryptone	05
Lactose	04
Sélénite acide de sodium	04
Phosphate disodique	10
L-cystine	0.01

TABLE A.8– Eau peptone pH=7

Compositions	Quantité(g/l)
Peptone de caséine	10
Chlorure de Sodium	05
phosphate de sodium	09
Phosphate de potassium	01.5

TABLE A.9– Bouillon Rapport Vassiliadis (RV) pH=5.2+/-0.2

Compositions	Quantité(g/l)
Tryptone	4,54
Chlorure de magnesium anhyde	13,4
Chlorure de sodium	7,2
Phosphate monopotassique	1,45
Oxalate de vert de malachite	0,036

ANNEXE B

TABLEAUX DES ZONES D'INHIBITIONS

ANNEXE B. ZONES D'INHIBITION

TABLE B.1– Résultats de zone d'inhibition du surnageant natif et le surnageant concentré

Numéro de la souche	Surnageant natif (mm)	Surnageant concentré (mm)
S01	8	18
S02	6	16
S03	13	18
S04	8	20
S05	10	20
S06	8	16
S07	8	16
S08	12	14
S09	12	14
S10	16	18
S11	8	12
S12	12	16
S13	10	10
S14	8	18
S15	8	18
S16	6	18
S17	6	12
S18	10	18
S19	6	12
S20	10	18
S21	8	10
S22	12	12
S23	12	14
S24	8	20
S25	10	20
S26	8	20
S27	6	18
S28	6	14
S29	10	18

ANNEXE B. ZONES D'INHIBITION

Numéro de la souche	Surnageant natif (mm)	Surnageant concentré(mm)
S30	12	20
S31	12	16
S32	8	20
S33*	10	22
S34	10	20
S35	10	10
S36	8	18
S37	6	18
S38	12	14
S39	8	16
S40	10	18
S41	12	18
S42	10	10
S43	14	18
S44	12	14
S45	8	14
S46	12	12
S47	8	12
S48	6	18
S49	8	12
S50	10	20
S51	10	18
S52	12	18
S53*	8	22
S54	10	18
S55	10	14
S56	12	18
S57	12	14
S58	10	16

ANNEXE B. ZONES D'INHIBITION

Numéro de la souche	Surnageant natif (mm)	Surnageant concentré(mm)
S59	8	14
S60	6	16
S61	8	18
S62	10	18
S63	6	18

Rouge : Souches qui présentent une faible activité antibactérienne avec des zones d'inhibition entre (10mm et 16mm de diamètre).

jaune : Souches les plus performantes qui présentent des zones d'inhibition entre (20 mm et 22 mm de diamètre).

noir : Souches qui présentent une activité antibactérienne moyenne avec des zones d'inhibition allons de (16mm a18mm de diamètre).

* Les meilleures souches actives.

ANNEXE C

TABLEAU DES TESTS PRELIMINAIRES

ANNEXE C. TESTS D'IDENTIFICATION PRELIMINAIRE

TABLEAU C.1 – Résultats des tests d'identification préliminaire des souches tests (coloration de Gram et la Catalase).

Le numero de la souche	Forme	Gram	Catalase
S01	Cocci	+	+
S02	Cocci	+	+
S03	Cocci	+	-
S04	Cocci	+	-
S05	Cocci	+	+
S06	Cocco bacille en courte chenette	+	+
S07	Cocci	+	-
S08	Bacille	-	+
S09	Cocci	-	-
S10	Cocci en amas	+	+
S11	Cocci en chenette	+	-
S12	Cocci	+	-
S13	Bacille	+	-
S14	Cocci en courte chenettes	+	-
S15	Cocco bacille en courte chenettes	+	-
S16	Cocci	+	-
S17	Bacille	+	-
S18	Cocci en courte chenettes	+	-
S19	Bacille	+	-
S20	Cocco bacille en courte chenette	+	-
S21	Cocco bacille	+	-
S22	Cocci	+	-
S23	Cocco bacille	-	-
S24	Cocci en chenettes	+	-
S25	Cocco bacille	+	-
S26	Cocci	+	-
S27	Cocci	-	+
S28	Cocci	+	+
S29	Bacille	-	-

ANNEXE C. TESTS D'IDENTIFICATION PRELIMINAIRE

Le numéro de la souche	Forme	Gram	Catalase
S30	Cocci	-	-
S31	Cocci en chenettes	-	-
S32	Cocco bacille	+	-
S33*	Cocci en chenettes	+	-
S34	Cocci	+	-
S35	Cocco bacille	-	-
S36	Cocco bacille	+	-
S37	Bacille	+	-
S38	Cocci en chenettes	+	-
S39	Bacille	+	-
S40	Cocci en chenette	+	-
S41	Cocco bacille	-	-
S42	Cocci	+	-
S43	Bacille	-	-
S44	Cocco bacille	+	-
S45	Cocco bacille	-	-
S46	Bacille	+	-
S47	Bacille	+	-
S48	Cocco bacille	+	-
S49	Cocco bacille	+	-
S50	Cocci en chenettes	-	-
S51	Cocci	+	+
S52	Cocci	+	-
S53*	Bacille	+	+
S54	Cocci	+	+
S55	Cocci	+	-
S56	Cocci	+	-
S57	Cocci	+	-
S58	Cocci en courte chenettes	+	-
S59	Cocci	+	+
S60	Cocci	+	-

ANNEXE C. TESTS D'IDENTIFICATION PRELIMINAIRE

Le numéro de la souche	Forme	Gram	Catalase
S61	Cocci	+	+
S62	Cocci	+	-
S63	Cocci	+	+

Résumé

L'objet de cette étude est l'isolement de souches bactériennes, douées d'activité anti-*Salmonella*, à partir des selles de poulet.

Un totale de soixante-trois souches ont été isolées et sélectionnées par les techniques de double couche et les disques d'agar, elles présentent toutes une activité antibactérienne envers *Salmonella Enteritidis*. La technique des puits a montré que les surnageants des cultures des isolats présentent toutes une activité anti-*Salmonella*, cette activité est plus importante pour les surnageants concentrés que les surnageants natifs.

L'identification préliminaire des souches étudiées (coloration de Gram et catalase) a montré que la majorité des souches actives sont Gram positif et catalase négatif.

Mots clés : Antibiorésistance, Alternatives aux antibiotiques, probiotiques, élevage de volailles, salmonelles.

Abstract

The aim of this study is the isolation of bacterial strains with anti-*Salmonella* activity from chicken feces.

A total of sixty-three strains were isolated and selected by the double layer and agar disc methods, all of them showing antibacterial activity against *Salmonella Enteritidis*. The agar wells method showed that all isolates' culture supernatants show anti-*Salmonella* activity, this activity is higher for the concentrated supernatants than the native supernatants.

Preliminary identification of the studied strains (Gram and catalase staining) showed that the majority of active strains are Gram positive and catalase negative.

Key words : Antibiotic-resistance, antibiotics alternatives, probiotics, poultry farming, *Salmonella*