

Institut national agronomique
Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences
Département de technologie alimentaire et nutrition humaine
Option : Sciences alimentaires

***Purification et caractérisation de
bactériocines produites par des bactéries
lactiques autochtones isolées***

Présentée par:

Mme Amel MAMECHE-DOUMANDJI

Directrice de thèse: Mme. A. HELLAL Professeur (ENP, Alger)

11-05- 2008

Jury : Président: M. M.M. BELLAL Professeur (INA, Alger) **Examineurs: M. N. E. KARAM** Professeur
(Université Es-Sénia, Oran) : **M. A. DILMI-BOURAS** Professeur (Université Chlef) : **M. A.**
AMMOUCHE Professeur (INA, Alger)

Table des matières

Dédicace . . .	5
REMERCIEMENTS . . .	6
RESUME . . .	8
SUMMARY . . .	9
ص:خلم . . .	10
Liste des abréviations . . .	11
Introduction . . .	12
Chapitre I: Etude bibliographique . . .	14
I. Généralités sur les bactéries lactiques . . .	14
1.1. Caractéristiques . . .	14
1.2. Origine et habitats . . .	14
1.3. Classification . . .	14
1.4. Métabolisme fermentaire . . .	15
1.5. Effets directs des bactéries lactiques sur la santé . . .	16
1.6. Les probiotiques . . .	18
II. Les bactériocines . . .	19
2.1. Définition de la bactériocine . . .	19
2.2. Découverte des bactériocines . . .	20
2.3. Nomenclature et classification des bactériocines . . .	20
2.4. Caractéristiques des bactériocines . . .	22
2.5. Mécanisme d'action de la bactériocine . . .	23
2.6. La biosynthèse des bactériocines . . .	24
2.7. Bactéries lactiques productrices de bactériocines . . .	24
III. La microflore intestinale de l'homme . . .	28
3. 1. Installation de la flore intestinale . . .	28
3.2. Le système immunitaire intestinal . . .	28
3.3. Interaction flore intestinale-immunité de l'hôte . . .	29
Chapitre II: Matériel et méthodes . . .	30
1. Matériel biologique . . .	30
2. Méthodes . . .	30
2.1. Technique d'isolement et de sélection des bactéries lactiques . . .	30
2.2. Identification des souches . . .	31
2.3. Criblage des bactéries lactiques thermophiles productrices de bactériocines . . .	31
2.4. Sélection des souches . . .	31
2.5. Etude de l'activité antimicrobienne . . .	32
2.6. Purification de la bactériocine issue de <i>Lactobacillus acidophilus</i> . . .	33
2.7. Action des protéases, du traitement thermique et du pH sur le composé actif . . .	37
2.8. Production de bactériocine en bioréacteur . . .	38
2.9. Cinétique d'acidification (CINAC) . . .	42

2.10. Effet de la congélation et de la durée du stockage sur l'activité acidifiante . .	45
Chapitre III: Résultats et discussion . .	46
1. Isolement et identification des espèces d'intérêt . .	46
1.1. Les lactobacilles . .	46
1.2. Les bifidobactéries . .	46
1.3. Les streptocoques . .	46
2. Criblage des souches bactériocinogènes . .	47
3. Activité métabolique des souches lactiques sélectionnées . .	49
4. Evolution de la croissance, du pH et de l'activité antimicrobienne de la souche <i>Lb. acidophilus</i> 11 . .	51
5. Détermination de la dilution critique de la bactériocine dans le surnageant brut actif . .	52
5.1. Mesure de l'absorbance des cultures de <i>Lb. bulgaricus</i> 340 . .	52
5.2. Détermination de la dilution critique pour les différents pH de fermentation . .	52
6. Spectre antimicrobien de la bactériocine produite par <i>Lb. acidophilus</i> 11 envers des bactéries Gram positive et Gram négative . .	54
7. Purification de la bactériocine . .	55
8. Caractérisation du composé antagoniste purifié . .	61
8.1. Effet des enzymes protéolytiques, de la température et du pH sur l'activité de la bactériocine . .	61
8.2. Détermination du poids moléculaire . .	62
9. Suivi de production de bactériocine en bioréacteur à pH régulé . .	64
10. Effet de la congélation et de la durée du stockage sur l'activité acidifiante de <i>Lb. acidophilus</i> 11 . .	72
CONCLUSION . .	79
Références bibliographiques . .	81
ANNEXES . .	98

Dédicace

A ma très chère fille Camélia Tania. Grâce Toi, toute ma peine pour conclure ce travail a été particulièrement adoucie. A mon cher époux Abdelkader A mes chers parents, que je chéris par dessus tout, A ceux qui m'ont indique la bonne voie en me rappelant que la volonté fait toujours les grands hommes...A mon père et à ma mère. A Mme le Professeur Hellal Amina pour la bonté de son âme, sa gentillesse et ses qualités humaines A mes sœurs, Soumeya et Samira A mon petit neveu Omar Rayan A ma petite nièce Manel A tous les miens Amel

REMERCIEMENTS

Cette thèse représente cinq années de travail durant lesquelles l'appui et l'aide de plusieurs personnes ont facilité ma tâche.

Ce travail a été effectué à l'Institut National Agronomique Paris-Grignon ainsi qu'à l'INRAA de Nantes sous la direction de madame le Professeur **Catherine BEAL** et M. Le Professeur **Thomas HEARTLE**. Je tiens à les remercier sincèrement pour leur accueil au niveau de leurs laboratoires.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

J'adresse ma reconnaissance et mes plus sincères remerciements à ma Directrice de thèse, Mme le Professeur **Amina HELLAL**, pour ses conseils scientifiques judicieux et sa disponibilité exceptionnelle tout au long de ce projet et surtout pour ses qualités humaines. C'est un grand honneur pour moi d'être dirigée par le Professeur Amina HELLAL

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent à M. le Professeur **Mouhand Mouloud BELLAL**. Je suis très sensible à l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury de Thèse. Soyez assuré de mon plus profond respect et de ma profonde gratitude

Mes plus sincères remerciements vont également à M. le Professeur **ALI AMMOUCHE** pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail.

A Monsieur le Professeur **Nourredine KARAM**, Je suis très touchée de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements et soyez assuré de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

Mes remerciements les plus respectueux vont également à Monsieur le Professeur **Abdelkader DILMI BOURAS** qui m'a fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être examinateur. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont également au personnel et à mes collègues du Centre de la police scientifique d'Alger, qu'à ceux des laboratoires d'hygiène de Blida

Je désire remercier le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique ainsi que Madame l'attachée culturelle de l'ambassade d'Algérie à Paris.

A **M. DIDI O.** de l'université de Ouargla pour ses encouragements, sa sympathie et ses précieux conseils.

A tous mes collègues de Blida, plus particulièrement **M. Nabil BOUSBIA** pour son AIDE si précieuse et **Mme Linda BOUTEKRABT-BENHADJA** pour tout son soutien moral.

Je tiens à remercier vivement M. **Karim SOUTOU**, Mlle **Lila MOUZALI**.

Je désire aussi adresser mes sincères remerciements à Mme **YADDADENE Fatiha** Pour sa gentillesse et son aide efficace.

Enfin, ce travail est l'aboutissement de longues années d'étude ici et ailleurs, auxquelles

L'amour, le sacrifice et le soutien inconditionnel de ma famille
ont largement contribué.

Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, je tiens à remercier de tout cœur mes parents.

Amel

RESUME

52 espèces lactiques ont fait l'objet de cette étude. L'activité antimicrobienne des 52 souches est étudiée à l'égard 4 espèces pathogènes (*Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*) suivant la méthode de diffusion des puits. Une première sélection est effectuée sur la base de l'activité bactériocinogène. Une deuxième sélection est réalisée sur la base du pouvoir acidifiant et de la cinétique de la croissance. Seule l'espèce *Lb. acidophilus* 11 isolée à partir du lait fermenté de vache est retenue pour la purification et la caractérisation de la bactériocine ainsi que pour sa production en bioréacteur. Les étapes de purification sont comme suit: - Passage du surnageant brut actif en chromatographie à échangeur de cations avec une élution de la bactériocine par palier (0,1, 0,3 et 1M en NaCl)- Passage de la fraction active précédente en chromatographie en phase inversée, les fractions actives sont éluées entre 32 et 48 % d'acétonitrile. - Les fractions actives précédentes sont lyophilisées puis reprises dans de l'eau distillée pour un passage en chromatographie en phase inversée analytique. Le profil chromatographique de la fraction active a révélé 4 pics. Le test de l'activité inhibitrice montre que le 4ème pic est actif. Ce dernier sera analysé en spectrométrie de masse. Les résultats ont révélé que la bactériocine présente une masse de 5218 Da. La pepsine, la trypsine, la pronase et la protéinase K altèrent complètement l'activité antagoniste de la bactériocine. Cette dernière décroît rapidement lors d'un traitement de 30 min ou de 45 min à 100°C et un traitement de 121°C pendant 30 min. cette activité n'est pas affectée par la variation du pH. L'étude de l'activité antimicrobienne du composé actif à partir d'un gel de SDS PAGE, révèle une protéine de faible poids moléculaire compris entre 14,2 et 6,5 kDa. D'après un bilan comparatif des trois fermentations à pH régulé (6,5, 5,5 et 5,0), un pH compris entre 6,5 et 5,5 semblerait optimal pour l'acidification de *Lb. acidophilus* 11. Grâce au système CINAC il a été constaté qu'il y a eu une perte d'activité acidifiante lors de la congélation de la souche *Lb. acidophilus* 11 à -20°C.

Mots clé : *Lactobacillus acidophilus*, bactériocine, purification, caractérisation, bioréacteur, système CINAC.

SUMMARY

52 lactic species were the subject of this study. The antimicrobial activity of the 52 strains is studied with the regard 4 pathogenic species (*Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) according to the method of diffusion of the wells. A first selection is carried out on the basis of bacteriocinogene activity a second selection is carried out on the basis of the acidifying capacity and kinetics of the growth. Only the species *Lb. acidophilus* 11 insulated starting from curdled milk from cow is retained for the purification and the characterization of the bacteriocine like for its production as a bioreactor. The stages of purification are as follows: - Passage of the supernatant gross active in exchanger chromatography of cations with an elution of the bacteriocin by stage (0.1, 0.3 and 1M NaCl) - Passage of the fraction activates proceeding in chromatography in reversed phase, the active fractions are elutes between 32 and 48% of acetonitrile. - The active fractions are elutes between 32 and 48% of acetonitrile are freeze-dried then included in water distilled for a passage in chromatography in analytical reversed phase. The chromatographic profile of the active fraction revealed 4 peaks. The test of the inhibiting activity shows that the 4th peak is active. This last will be analyzed in mass spectrometry. The results revealed that the bacteriocin has a mass of 5218 Da. Pepsin, trypsin, the pronase and the proteinase K completely deteriorate the antagonistic activity of the bacteriocin. The latter decrease quickly at the time of a treatment of 30 min or 45 min with 100°C and a treatment of 121°C during 30 min. this activity is not affected by the variation of the pH the study of the antimicrobial activity of the active compound starting from a gel of SDS PAGE, reveals a molecular low-weight protein ranging between 14.2 and 6.5 kDa. According to a comparative assessment of three fermentations with controlled pH (6.5, 5.5 and 5.0), a pH ranging between 6.5 and 5.5 would seem optimal for the acidification of *Lb. acidophilus* 11. Thanks to system CINAC it was noted that there was a loss of activity acidifying at the time of the frozen of the stock *Lb. acidophilus* 11 with -20°C.

Key words : *Lactobacillus acidophilus*, bacteriocin, purification, characterization, bioreactor, CINAC system.

ص:مخلم

52 نوع من الأرومات اللبنية كانوا محل بحث في هذه الدراسة. النشاط المضاد للميكروبات لهؤلاء الأرومات اللبنية على غرار 4 أنواع ممرضة (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*) بالقياس طريقة الإنتشار الشعاعي من الأبار. التصنيف الأولي تم بمراعاة نشاط البكتريوسينوجان. التصنيف الثانوي أخذ بحين الإعتبار قدرة التخميض وحركية النمو. وحدها 11 *Lb. acidophilus* المعزولة من حليب البقر قمت بتصنيفها ودراسة خصائصها البكتريوسينية ومن تم إنتاجها في المفاعلات البيولوجية. مراحل التصفية كانت كالآتي :- عبور السائل الطافي الخام الحيوي بالكروماتوغرافيا المبدلة للكاثيونات مع تنليجة تصفية الباكترىوسين على مراحل 0,1 ، 0,3 و 1 مولال من NaCl - ومن تم مرور الجزيئ الحيوي السابق في الكروماتوغرافيا ذي الطور المعكوس، الجزيئات الحيوية هم فقط الجزيئات المتتالعة بين 32 و 48 من الأسيتونتريل. - تم حفظ الجزيئات الحيوية المتتالعة بين 32 و 48 من الأسيتونتريل عن طريق تجفيفها بتبخير الماء تم تجميده تحت درجات حرارة منخفضة وتحت الفراغ (دريغ- فريزر) ومن تم استخدامها بإضافة 100 ميكرو ليتر من الماء المقطر من أجل عبورها في الكروماتوغرافيا ذي الطور المعكوس التحليلي. نتيجة التحليل بينت وجود 4 قسم. تجربة النشاط المتبط بينت أن القمة الرابعة هي نشطتين. هذه الأخيرة قست بجهز طيف قياس الكتل حيث بينت النتائج أن كتلة البكتريوسين تقرب Da 5218. أهدت الليبين، التريسين، البروناز والبروتيناز ك كليا النشاط المضاد للبكتريوسين. هذه الأخيرة تتناقص بسرعة عند تطبيق حرارة 100م لمدة 30 أو 45م، وعند تطبيق درجة حرارة تعادل 121م لمدة 30 دقيقة، هذا النشاط لا يتأثر بمدى اختلاف الأس الهيدروجيني. إن دراسة النشاط المضاد للميكروبات للمركب الحيوي المستخلص من هلام SDS PAGE، بين أنها عبارة عن بروتين ذو وزن جزيئي ضئيل محصور بين 14,2 و 6,5 كيلو دالتون. إبتداء من محصلة مقارنة ثلاث تخميرات ذو أس هيدروجيني محدد (5,5، 6,5 و 5,0)، تبين لنا أن الأس الهيدروجيني المحصور بين 5,5 و 6,5 هو الأسب لتخميض *Lb. acidophilus* 11. بفضل نظام CINAC تمكنا من ملاحظة ضياع النشاط المحمص خلال فترة تجميد الجرثومة *Lb. acidophilus* 11 تحت درجة حرارة -20م.

الكلمات الجوهرية: *Lactobacillus acidophilus*، باكترىوسين، تصفية، دراسة الخصائص، مفاعل بيولوجي، نظام CINAC.

Liste des abréviations

- ACN: acétonitrile.
- CMI: concentration minimale inhibitrice.
- EMP: voie d'Embden-Meyerhof-Parnas.
- ESI: Electro-Spray Ionization
- LMW: Low Molecular Weight standards.
- MAU/L: million unité arbitraire/litre.
- MRS: Mann Regosa et Scharp.
- MRSC: Mann Regosa et Scharp cystéiné.
- mS: millisimens.
- m/z: masse/charge
- PPC: voie pentose-phosphocétolase. .
- SBA: surnageant brut actif.
- SDS-PAGE: électrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate.
- TFA: acide trifluoro-acétique.
- tm: temps nécessaire pour atteindre Vm.
- tpHi: temps nécessaire pour atteindre un pH donné.
- pHm: pH correspondant à Vm.
- UA: unité arbitraire.
- U.F.C.: unités formant colonies.
- Vm: vitesse maximale d'acidification.
- X0: dénombrement après inoculation du fermenteur (t0).
- XF: dénombrement à la fin de fermentation.

Introduction

Les bactéries lactiques sont utilisées dans de nombreux produits laitiers dont les laits fermentés, les fromages et les yaourts. Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments ainsi qu'à la production de composés aromatiques. Les bactéries lactiques inhibent la prolifération de micro-organismes par la production de composés inhibiteurs et en abaissant le pH par la production d'acide lactique (Gilliland, 1985a; Piard et Desmazeaud, 1991, 1992).

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, dont les vertus se ressemblent, et qui produisent de l'acide lactique comme produit final du processus de fermentation. Elles sont répandues dans la nature, et se trouvent aussi dans le système digestif de l'homme. Si elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons. Les bactéries lactiques sont à l'origine de processus de transformation alimentaire. Ces micro-organismes sont présents dans différentes variétés d'aliments. Ils se composent principalement des genres *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et *Carnobacterium* (Boyaval et al., 1998; Aslim et al., 2005; Mofredj et al., 2007).

Certaines souches de bactéries lactiques sont des probiotiques qui, une fois ingérées en quantité suffisante dans l'organisme, exercent des effets bénéfiques pour la santé allant au-delà des vertus nutritives de base (Schaafsma, 1996). Ces bactéries ont le pouvoir de produire des composés antibactériens, des peptides dénommés bactériocines doués d'une activité bactéricide ou bactériostatique à l'égard de plusieurs germes pathogènes (Cenatiempo et al., 1996). Les bactériocines de bactéries lactiques sont l'objet d'une attention toute particulière depuis plusieurs années en raison de l'intérêt tant fondamental qu'appliqué qu'elles suscitent. Aujourd'hui, les probiotiques sont utilisés aussi dans un grand choix de laitages fermentés qui vont du kéfir (boisson liquide) jusqu'au yaourt (plus consistant).

Les bactériocines présentent un intérêt dans la conservation des denrées alimentaires par leur capacité à réguler la microflore existant dans les produits fermentés et inhibent la croissance des germes pathogènes. En agro-alimentaire seule la nisine issue de *Lactococcus lactis* est utilisée comme additif alimentaire afin d'inhiber la croissance des espèces nuisibles responsables des intoxications (Delves-Broughton, 1990). La nisine est efficace contre les germes pathogènes tels que *Listeria monocytogenese*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tyrobutiricum* (Cai et al., 1997; Heyman et Heulevin, 2006).

L'utilisation des bactériocines dans les aliments fut introduite par Hirsh en 1951 lorsqu'il démontra que la nisine était en mesure d'inhiber la croissance de *Clostridium* dans un fromage fabriqué de lait pasteurisé. Cette découverte eut comme effet de propulser les études sur les bactériocines. En effet, grâce à l'activité antimicrobienne de leurs bactériocines, les bactéries productrices ont la capacité de diminuer la charge microbienne d'un aliment et donc de contribuer à leur innocuité (Delves-Broughton, 1990). Bien que son utilisation soit autorisée dans plus de 50 pays (Sahl et Bierbaum, 1998), l'émergence de souches résistantes à la nisine accroît l'intérêt porté sur les autres bactériocines. En effet,

des souches résistantes à certaines bactériocines ont déjà été isolées; c'est notamment le cas pour la nisine et la pédiocine (Goulhen et *al.*, 1998; Ennahar et *al.*, 2000 a et b). Ceci dit, l'émergence sur le marché alimentaire de souches résistantes à la nisine doit être pris en considération et des précautions appropriées doivent être prises. Ainsi, la recherche de nouvelles bactériocines et la caractérisation de leur propriétés génétiques et biochimiques représentent différents domaines de recherche mis de l'avant pour offrir aux industriels des alternatives à la nisine.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude dont les objectifs sont les suivants:

- Isolement, purification et caractérisation de plusieurs souches de bactéries lactiques à partir de produits laitiers et de fèces de nourrissons allaités exclusivement au sein.
- Recherche d'espèces douées d'un pouvoir antimicrobien.
- Etude des cinétiques de croissance et de l'activité acidifiante des souches d'intérêt afin de sélectionner la meilleure espèce.
- Purification et de caractérisation de la bactériocine.
- Etude de la cinétique de production de la bactériocine en bioréacteur à pH régulé à 6,5, 5,5 et 5,0 ainsi que le suivi de la cinétique d'acidification de la souche sélectionnée en temps réel grâce au système CINAC développé à l'INRA de Paris constitue la dernière étape de ce travail.

Chapitre I: Etude bibliographique

I. Généralités sur les bactéries lactiques

1.1. Caractéristiques

Les bactéries lactiques sont capables par fermentation des substances hydrocarbonées de produire de l'acide lactique. Ce sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles se développent en présence de sucres, d'alcool et d'acides organiques (Desmazeaud (1983); De Roissart, 1986). Parmi les caractéristiques de ces micro-organismes: Gram (+), forme sphérique, allongés ou en bâtonnets, immobiles, asporulés, anaérobies mais aérotolestants, catalase (-). Ils ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole, ni hydrogène sulfureux. La plupart de ces espèces présentent une activité protéolytique faible (Alais, 1984). Elles sont exigeantes sur le plan nutritionnel en ce qui concerne les vitamines (vitamine du groupe B), les acides gras, les glucides et les acides aminés Les bactéries lactiques ont une activité aromatique très importante d'où leur utilisation en agro-alimentaire (Leveau et *al.*, 1991). Les bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène, mais de trop grandes teneurs peuvent leur être néfastes. Ceci peut probablement être relié au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est produit dans les cellules en présence d'air. L'eau oxygénée doit être éliminée sinon son accumulation devient toxique. Le système le plus efficace d'élimination du H₂O₂ est une enzyme nommée catalase dont les bactéries lactiques sont déficientes. Les bactéries lactiques possèdent plutôt une peroxydase, moins efficace que la catalase. Ainsi, comme les bactéries lactiques n'éliminent pas facilement le peroxyde, elles sont considérées comme micro-aérophiles (Biavati et *al.*, 2000).

1.2. Origine et habitats

Le lait représente un excellent milieu de culture pour les bactéries lactiques vu sa richesse en éléments nutritifs indispensables à la croissance des bactéries lactiques. Ces bactéries peuvent avoir d'autres origines tels que les végétaux, cavité et le tube digestif humain et animal (Desmazeaud, 1994; Challa et *al.*, 1997; Romeo et *al.*, 2001).

1.3. Classification

Les caractères morphologiques permettent de distinguer deux groupes soit les coques soit les bacilles. Onze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage se répand en industrie laitière. Les bactéries lactiques sont utilisées pour la fermentation d'un grand nombre de produits d'origine animale ou végétale. Seuls les cinq genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont

communément propagés dans les salles à ferments des industries laitières ou employés dans la fermentation lactique des produits laitiers (Champagne, 1998; Langella et al., 2001).

1.4. Métabolisme fermentaire

Le lactose est le sucre majoritaire fermentescible du lait. Le lactose est transporté par un système perméase, après sa pénétration dans la cellule, il sera coupé par une β -galactosidase pour donner du glucose et du galactose. Le principal produit final de la dégradation du lactose est le lactate auquel peut s'ajouter l'acétate, l'éthanol et le gaz carbonique pour les espèces hétérofermentaires. Les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (De Roissart et Luquet, 1994):

- La voie homofermentaire: les groupes principaux de bactéries lactiques appartenant à cette classe sont des espèces de streptocoques, d'entérocoques, de lactocoques, de pédiocoques, et de lactobacilles homofermentaires. Ils convertissent presque quantitativement le glucose en en acide lactique (90 à 95 %) [voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)].

- La voie hétérofermentaire: les groupes principaux de bactéries lactiques appartenant à cette classe sont des leuconostocs et certains lactobacilles. Ces espèces fermentent le glucose en produisant moins de 1,8 moles d'acide lactique/mole de glucose, en plus de l'éthanol, de l'acétate, et du CO₂ [voie pentose-phosphocétolase (PPC)].

Ces bactéries métabolisent les glucides suivant la voie glycolytique suivante (Fig. 1).

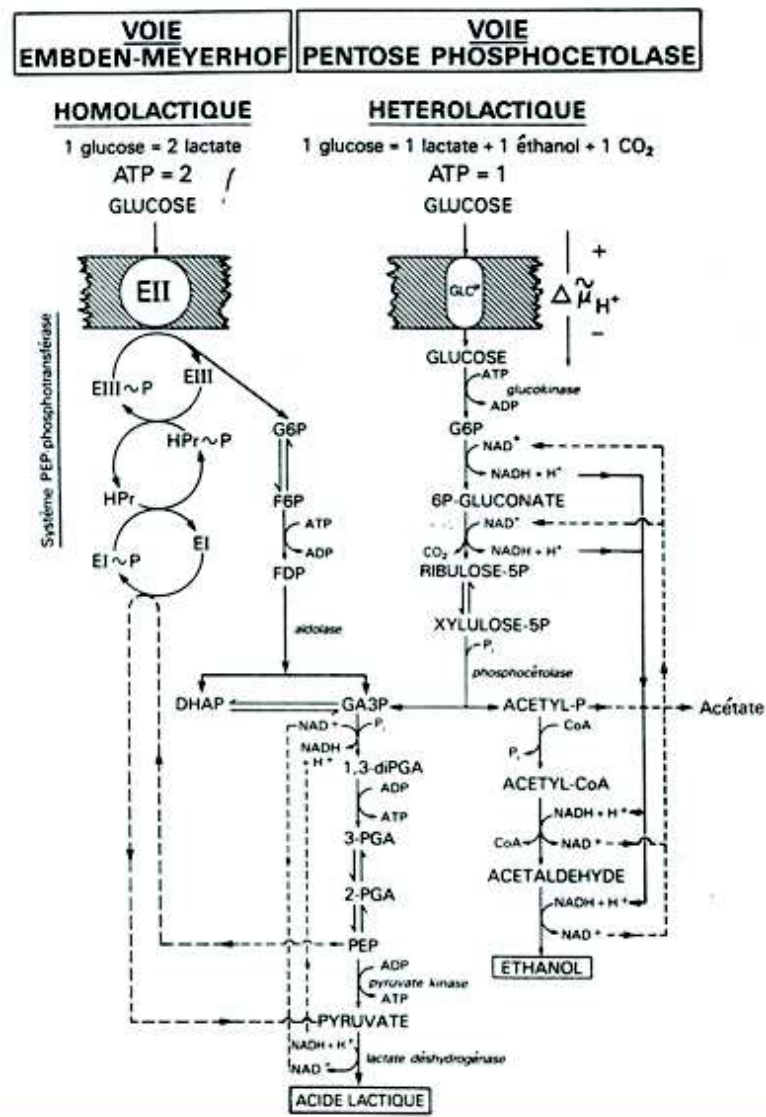


Fig. 1: Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques (Thompson, 1987)

1.5. Effets directs des bactéries lactiques sur la santé

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du siècle par le russe Metchnikoff (1907). Selon lui, les lactobacilles pouvaient réduire la putréfaction intestinale, en modifiant la microflore intestinale, et ainsi prolonger la vie. Depuis, un grand nombre d'études sur l'effet potentiel des bactéries lactiques sur la santé ont été publiées (Hitchins et McDonough, 1989; Elmer et al., 1996; Holzapfel et al., 1998; Vanderhoof et Young, 1998). Seul un petit nombre de bactéries lactiques dont *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *E. faecium* ainsi que les bifidobactéries ont été ainsi étudiées. Les effets bénéfiques potentiels cités sont nombreux et variés. Certains sont maintenant bien établis tels que l'amélioration de la digestion du lactose et le traitement des désordres diarrhéiques. D'autres restent encore controversés tels que la diminution du

cholestérol sérique ou encore la réduction de la formation de tumeurs (Vesa et al., 2000; Drouault et Corthier, 2001).

1.5.1. Digestion du lactose

Il est bien établi que le yaourt a des effets positifs sur la mal digestion du lactose dans le cas de déficiences primaires et secondaires en lactase. Le lactose du lait est hydrolysé par les bactéries lactiques lors de la fabrication du yaourt par une lactase (β -galactosidase). La déficience en lactase est due à une faible activité en lactase intestinale sur les entérocytes des villosités situées dans la bordure en brosse du jéjunum (Sahi, 1994). Le lactose non digéré dans l'intestin grêle est fermenté dans le côlon par les bactéries coliques conduisant à la production d'acides organiques à chaîne courte et de gaz tels que l'hydrogène, le méthane et le gaz carbonique. Ces produits présents en quantités excessives dans le côlon peuvent provoquer flatulences, spasmes intestinaux, douleurs abdominales, ballonnements et diarrhées osmotiques (De Villiers, 1995). Plusieurs études ont montré, par le test respiratoire à l'hydrogène, que la production d'hydrogène est beaucoup moins importante avec le yaourt qu'avec le lait (Shermak et al., 1995; Naim, 2001). Marteau et al. (1990) ont déjà montré que plus de 90% du lactose hydrolysé du yaourt est digéré chez des sujets alactosiques.

1.5.2. Prophylaxie ou traitement de certaines affections intestinales

Certaines bactéries lactiques sont utilisées dans la prévention ou le traitement des diarrhées infectieuses et des troubles digestifs liés à la prise d'antibiotiques. Plusieurs essais randomisés avec placebo ont montré l'efficacité de certaines bactéries lactiques dans la prévention des perturbations digestives liées à l'antibiothérapie. Les diarrhées associées à la prise d'antibiotiques constituent un problème fréquent qui touche environ 20% des patients hospitalisés et auxquels on administre des antibiotiques. Un tiers de ces diarrhées est causé par *Clostridium difficile*. En effet, la perturbation de la flore digestive normale entraînée par les antibiotiques crée un milieu propice à la colonisation par *C. difficile*. Cette bactérie sécrète deux toxines qui ont pour rôle de se lier aux cellules intestinales épithéliales, ce qui entraîne une sécrétion massive de liquide ainsi qu'un phénomène inflammatoire. C'est donc par ces mécanismes que l'infection à cette bactérie cause la diarrhée. L'infection à *C. difficile* représente l'infection nosocomiale la plus fréquente qui entraîne une augmentation de la morbidité et de la mortalité chez la clientèle hospitalisée. La transmission de l'infection se fait par l'ingestion des spores de ce pathogène présent dans l'environnement et s'effectue généralement par la voie fécale-orale (Cibik et al., 2004). Les principales espèces de probiotiques ayant démontré des bénéfices en prévention et en traitement de la diarrhée secondaire à la prise d'antibiotiques ou celle induite par l'infection au *C. difficile* sont les espèces de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Pochapin, 2000; Sartor, 2004).

1.5.3. Cancérogenèse

La flore colique pourrait être impliquée dans la cancérogenèse. Cet effet serait médié par des enzymes bactériennes qui activent des procarcinogènes en carcinogènes. Des expériences menées avec des modèles animaux et chez l'homme ont montré que plusieurs bactéries lactiques pouvaient diminuer les taux d'enzymes responsables de l'activation de certains procarcinogènes tels que la β -glucuronidase, la β -glucosidase, l'azoréductase, ou encore la nitroréductase (Rowland et al., 1998; Naito et al., 2007).

1.5.4. Diminution du cholestérol sérique et déconjugaison des sels biliaires

L'effet des bactéries lactiques sur le métabolisme du cholestérol reste encore controversé. Plusieurs études rapportent que la concentration en cholestérol sérique diminue pendant la consommation de grandes quantités (680 à 5 000 mL par jour) de produits laitiers fermentés (Bazarre et al., 1983; Panda et al., 2008). Gilliland (1990) a montré que plusieurs bactéries, notamment *Lb. acidophilus* et *Bf. longum*, sont capables de limiter le taux du cholestérol sanguin. Ces mêmes bactéries peuvent assimiler le cholestérol *in vitro* en présence de taurocholate de sodium. Une partie de ce cholestérol assimilé (environ 20%) a notamment été retrouvée dans la membrane cellulaire de ces bactéries lactiques (Gilliland, 1985b; Dambekodi et Gilliland, 1998). Dilmi-Bouras (2006) a montré que certaines souches appartenant aux espèces *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* résistent aux sels biliaires et elles peuvent assimiler des quantités appréciables de cholestérol. Ces souches réduisent les niveaux du HDL-cholestérol et du LDL-cholestérol totaux, d'une manière bien équilibrée.

1.6. Les probiotiques

Le concept probiotique est né de la théorie de la longévité de Metchnikoff en 1907 : il fut le premier à proposer l'utilisation des lactobacilles des yaourts pour la restauration de la microflore dans le tractus gastro-intestinal. Les probiotiques ont d'abord été développés dans les années 1960 pour les élevages d'animaux afin de prévenir les infections et stimuler le gain de poids. Durant cette même période, quelques médicaments probiotiques ont été lancés. Néanmoins, les difficultés initiales de fabrication d'un produit de qualité microbiologique stable, l'incertitude sur la capacité de survie des microorganismes *in vivo*, l'absence de données sur l'efficacité clinique et les nouvelles exigences de la réglementation dans le domaine ont conduit à la disparition progressive de ces probiotiques. L'essor récent du concept d'aliments fonctionnels a fortement relancé l'intérêt porté aux probiotiques (Marteau et Rambaud, 1998; Aktypis et al., 2003).

La première définition officielle a été proposée par Fuller en 1989: un probiotique est « un supplément alimentaire microbien vivant qui affecte bénéfiquement la santé de l'animal en améliorant sa balance microbienne intestinale ». Cette définition a été révisée plusieurs fois, notamment par la « FAO » et la « WHO » (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization) en 2001: les probiotiques sont « des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, produisent un effet bénéfique pour la santé de l'hôte ».

Depuis une dizaine d'années, un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation de cultures lactiques à effets bénéfiques pour la santé ou "probiotiques" (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore en alimentation animale. Dans la majorité des cas, les produits laitiers tels que les yaourts, les laits fermentés et les fromages, ont été choisis comme prébiotiques des cultures probiotiques. Plus récemment, les probiotiques ont été définis comme des organismes vivants qui, après ingestion par voie *per os* en certaines quantités, exercent des effets bénéfiques pour la santé allant au-delà des vertus nutritives inhérentes de base (Schaafsma, 1996; Atanassova et al., 2003; Työppönen et al., 2003). Les bifidobactéries, hôtes naturels des intestins de l'homme et des animaux à sang chaud, ont des propriétés nutritionnelles et thérapeutiques aujourd'hui reconnues. En effet, on note l'inhibition de la croissance de nombreux pathogènes et de bactéries putréfiantes, la régulation du transit intestinal, l'amélioration de l'intolérance au lactose et des allergies

alimentaires aux caséines laitières, leurs effets anticancérigènes, anticholestérolémiques et antidiarrhéiques ainsi qu'une stimulation du système immunitaire (Modler et *al.*, 1990; Gournier-Chateau et *al.*, 1994; Salminen et Saxelin, 1996; Tannock, 1997; Moon et *al.*, 2005). Ces bactéries probiotiques devraient être capables de survivre en grand nombre aux conditions acides de l'estomac et aux sels biliaires de l'intestin lors de la consommation du produit, puis d'adhérer aux cellules épithéliales de l'intestin afin de produire les effets bénéfiques désirés le plus longtemps possible (Tamime et *al.*, 1995; Vadyvaloo et *al.*, 2004; Teixeira De Carvalho et *al.*, 2006).

Différents effets positifs sont ainsi attribués aux probiotiques. Ces effets sont décrits et expliqués ci-dessous: (Sanders et Huis in't Veld, 1999; Playne et Salminen, 2002; Gueimonde et Salminen, 2003):

- Aide à la digestion du lactose par l'action de la β -galactosidase bactérienne.
- Réduction du risque des diarrhées par l'activité antipathogène et la stimulation du système immunitaire.
- Diminution des allergies alimentaires par l'amélioration de la fonction barrière de la muqueuse, la stimulation du système immunitaire et dégradation des protéines allergènes.
- Activité hypocholestérolémiante par l'assimilation du cholestérol, et la déconjugaison des sels biliaires.
- Prévention du cancer du côlon par la dégradation de carcinogènes, production de composés antimutagéniques, modulation des enzymes fécales carcinogéniques et stimulation du système immunitaire.
- Résistance contre les maladies inflammatoires et irritables des intestins. L'utilisation des probiotiques permet de restaurer la flore intestinale permettant à l'intestin de jouer son rôle de "barrière".
- Effet antihypertenseur par action des peptidases sur les protéines du lait donnant des peptides bioactifs.

II. Les bactériocines

2.1. Définition de la bactériocine

Une bactériocine est définie comme étant une protéine ou complexe protéique à activité bactéricide (Tagg et *al.*, 1976; Klaenhammer, 1988). Tagg (1992) suggère de redéfinir les bactériocines afin de considérer les caractéristiques que ne possèdent pas les colicines, mais qu'on observe chez la plupart des bactériocines des bactéries à Gram positif. Il propose de retenir la définition originale et de référer à ces substances comme étant des bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS). Ces dernières sont des substances antibiotiques bactériennes qui sont produites par les bactéries à Gram positif et qui, tout comme les colicines, sont des antibiotiques bactériens de nature protéique.

Le spectre d'activité d'une bactériocine se définit comme étant la diversité des bactéries sensibles à l'action bactéricide ou bactériostatique du peptide. On a d'abord attribué aux bactériocines un spectre d'activité limité aux bactéries taxinomiquement proches de la bactérie productrice (Tagg et *al.*, 1976). Certaines bactériocines possèdent un large spectre d'activité qui inclut des bactéries éloignées au point de vue phylogénétique.

Selon Tagg et *al.* (1976), une bactériocine doit répondre aux cinq critères suivants:

- Un spectre d'activité étroit, centré sur les espèces phylogénétiquement proches de la souche productrice,
- La présence d'une partie protéique nécessaire à leur activité,
- Un mode d'action de type bactéricide,
- La fixation sur un récepteur spécifique localisé sur la cellule cible,
- La synthèse d'une molécule par la cellule productrice qui l'immuniserait contre sa propre bactériocine.

La bactériocine est un produit extracellulaire primaire, synthétisé par les bactéries par la voie ribosomale et peut avoir une activité bactéricide à spectre étroit incluant les bactéries de la même espèce ou du même groupe à l'exception de la bactérie productrice qui possède un mécanisme de protection spécifique (Aymerich et *al.*, 2000; Ammor et *al.*, 2006).

2.2. Découverte des bactériocines

En 1877, Pasteur et Joubert ont utilisé des micro-organismes non pathogènes antagonistes pour le contrôle des infections comme la diphtérie. En 1925, Gratia décrit une action antagoniste spécifique entre deux souches d'*Escherichia coli* (Leclerc et *al.*, 1995; Garnau et *al.*, 2002).

En 1928, Rogers a mis en évidence l'effet antagoniste de *Lactococcus lactis* vis à vis de *Lactobacillus bulgaricus*. La substance produite fut nommée nisine par Mattick et Hirsch en 1944. Ils observèrent que l'action antibactérienne était forte et s'étendait à plusieurs bactéries à Gram positif. La définition précédente ne convient alors plus, vu la découverte de bactériocines à large spectre d'activité. De plus, certaines bactériocines, les lantibiotiques s'associent directement aux structures phospholipidiques de la cellule cible sans nécessiter de récepteur spécifique pour l'insertion des substances inhibitrices dans la membrane (Jung et Sahi, 1991).

2.3. Nomenclature et classification des bactériocines

Chez les bactéries lactiques des bactériocines sont produites par plusieurs genres: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* (Klaenhammer, 1988; Piard et Desmazeaud, 1992) *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Strreprococcus*, *Enterococcus* (De Vuyst et Vandamme, 1994) et *Bifidobacterium* (Meghrouh et *al.*, 1999). La classification des bactériocines repose sur la taille, les propriétés physicochimiques, la stabilité, le spectre d'inhibition, le mode d'action, la présence d'acides aminés modifiés et les informations génétiques (localisation du gène structurel et analyse de séquence).

La nomenclature des bactériocines est basée sur le générique du genre ou de l'espèce productrice (Leclerc et *al.*, 1995). Par exemple l'espèce *Escherichia coli* produit une bactériocine nommée colicine. L'espèce *Pediococcus* produit une bactériocine nommée pediocine. D'après Bradley (1967), les bactériocines sont classées selon leur poids en deux groupes:

- **Bactériocines de faible poids moléculaire** : non sédimentables, sensibles à la trypsine et thermostables.

- **Bactériocines de haut poids moléculaire** : sédimentables, résistantes à la trypsine, thermolabile, visibles au microscope électronique et ressemblent aux queues de phages.

Les bactériocines ont été divisées en quatre classes selon Klaenhammer (1993):

- Classe I. Les lantibiotiques, qui sont de petits peptides (< 15 kDa) contenant des acides aminés inusuels.
- Classe II. Les bactériocines peptidiques (< 15 kDa), sans lanthionine.
- Classe III. Les bactériocines protéiques, de plus grande taille (> 15 kDa), sans lanthionine, instable à la chaleur.
- Classe IV. Les bactéricines complexes, qui ont un composant glucidique ou lipidique.

Les bactériocines des classes I et II ont été les plus étudiées, parce qu'elles sont les plus abondantes et qu'elles paraissent se prêter le mieux à des applications dans l'industrie alimentaire.

- Classe I

La classe I comporte des petites bactériocines nommées lantibiotiques. Il s'agit de peptides dont la taille est inférieure à 5 kDa. Ces peptides conservent leur activité après une exposition à la chaleur. Ce groupe se compose d'un nombre variable d'acides aminés modifiés après la traduction de la protéine. Ces acides aminés sont la lanthionine, la β -méthyllanthionine et les résidus déshydratés (déhydroalanine et déhydrobutyrine). Quelques bactériocines ayant été identifiées comme appartenant à ce groupe sont: carnocine UI49; cytolysine; lacticine 3147; lacticine 481; lactocine S et Nisine.

- Classe II

La classe II inclut des peptides de taille inférieure à 10 kDa. Ces peptides demeurent également stables après un traitement à la chaleur. Ils ne contiennent pas d'acides aminés modifiés après la traduction. Un site de maturation composé de deux glycines successives est présent dans le précurseur de la bactériocine. Une autre sous-classe avait été proposée par Klaenhammer (1993), celui des bactériocines thiol-activées. La seule bactériocine thiol-activée alors connue était la lactococcine B. Cependant, cette propriété de la lactococcine B a depuis été réfutée par Venema et al. (1996). Cette classe comprend quatre sous-classes, nommées IIa, IIb, IIc et IId:

Sous-classe IIa: elle est composée des bactériocines formées d'un seul peptide. Certaines de ces bactériocines sont apparentées à la pédiocine. Pour ces dernières, une similarité de séquence en acides aminés plus élevée est retrouvée à l'extrémité N-terminale du peptide. On y retrouve deux cystéines réunies par un pont disulfure dans le peptide mature: -Y-GN-GV-XI-C-X--K/N-X3-1-C-, où XI à X4 représentent des résidus polaires non chargés ou chargés. Cette séquence consensus est appelée la boîte pédiocine. Certaines de ces bactériocines possèdent un autre pont disulfure situé dans la région C-terminale. Ces peptides ont la particularité d'être actifs contre le genre *Listeria*. Les bactériocines apparentées à la pédiocine sont: la bavaricine IMN, la carnobactériocines BM1 et B2, la curvacine A, l'enterocine A, la leucocine A, la mesentericine Y105, la pédiocine PA1, la piscicocine Via, la piscicoline 126 et la sakacine P. Ce sous-groupe comprend aussi les bactériocines non apparentées à la pédiocine comme la AS-48, la carnobactériocine A, la crispacine A, la divergicine 750, la lactococcines A et B, la lactococcine 972 et l'enterocine B.

Les bactériocines qui sont actives contre *Listeria*: pédiocine PA4 (Gonzalez et Kunka, 1987), sakacine A (Schillinger et Lücke, 1989), leucocine A-UAL 187 (Hastings et Stiles, 1991), sakacine P (Tichaczek et al., 1992) et curvacine A (Tichaczek et al., 1992).

Sous-classe IIb: bactériocines formées de deux peptides

Cette sous-classe comprend les bactériocines dont l'activité nécessite la présence de deux peptides distincts. Les deux peptides doivent être présents en quantités approximativement équivalentes pour obtenir une activité optimale (Nissen-Meyer et al., 1992; Allison et al., 1994; Anderssen et al., 1998). Les gènes structuraux qui codent pour de tels peptides sont habituellement situés un à la suite de l'autre, dans un même opéron (Allison et al., 1994; Diep et al., 1996; Nes et al., 1996; Richard et al., 2006). Les bactériocines appartenant à ce sous-groupe sont la lactacine F, la tactobine A, la lactococcine G, la pédiocine L50, la plantaricines E/F, J/K et S et la thermophiline 13.

Les complexes de poration qui requièrent deux peptides pour l'activité:

lactococcine G (Nissen-Meyer et al., 1992; Moll et al., 1996). lactococcine M (Van Belkum et al., 1991, 1992), lactacine F (Muriana et Klaenhammer, 1987, 1991 a, et b).

Iic il s'agit des bactériocines dont la sécrétion des sec-dépendante, tel que la divergicine (Van Belkum et al., 1989; Venema et al., 1993).

Iid Les bactériocines qui ne peuvent être regroupées dans les trois premières sous-classes: diplococcine (Oxford, 1944; Davey, 1981, 1984; Davey et Richardson, 1981; Davey et Pearce, 1982) et lactococcine A (Holo et al., 1991; Stoddard et al., 1992).

Classes III

La classe III regroupe les bactériocines de haut poids moléculaire (plus de 30 kDa). Ces bactériocines sont sensibles à la chaleur. Cette classe comporte les bactériocines suivantes: helveticine J (Joerger et Klaenhammer, 1986, 1990), caseicine 80 (Rammelsberg et Radler, 1990; Rammelsberg et al., 1990), acidophilucine A (Toba et al., 1991a), lacticines A et B (Toba et al., 1991b) et helveticine V-1829 (Vaughan et al., 1992),

Classe IV

La classe IV comporte les bactériocines composées d'une partie non protéique nécessaire à l'activité inhibitrice (sucre ou lipide). Cependant, aucune bactériocine produite par *L. lactis* n'appartient à l'une de ces deux classes. La classe IV a été ajoutée suite à l'observation de la perte d'activité de certaines bactériocines après leur incubation en présence d'enzymes dégradant les sucres et les lipides (Jiménez-Díaz et al., 1993). Cependant, la purification de ces bactériocines a révélé qu'elles avaient la même composition que les bactériocines régulières (Jiménez-Díaz et al., 1995). L'existence de cette quatrième classe pour les bactériocines reste donc controversée (Nes et al., 1996). Cette classe comporte les bactériocines suivantes: lactocine 27 (Upreti et Hinsdill, 1973), plantaricine S (Jiménez-Díaz et al., 1993) et pédiocine SJ- 1 (Schved et al., 1993).

2.4. Caractéristiques des bactériocines

2.4.1. Caractères biochimiques

Toutes les bactériocines possèdent une protéine responsable de leur activité biologique (Tagg et al., 1976). Les bactériocines peuvent être soit de composition simple constituée

uniquement de protéines telles que la nisine et la lactine 481, soit de composition complexe par la présence de lipides de carbohydrate additionés à la protéine telle que la lactine 27 (Upreti et Hinsdill, 1975).

Les bactériocines présentent une sensibilité aux enzymes protéolytiques telles que la pepsine, l'□ chymotrypsine et la trypsine (Piard et Desmazeaud, 1992). Il existe des bactériocines qui sont sensibles aux enzymes non protéolytiques (lipase et □ amylase).

2.4.2. Caractères physiques

Les bactériocines de faible poids moléculaire sont très thermostables, à l'opposé de celles qui sont à poids moléculaire élevé qui sont très sensibles aux traitements thermiques (Lee et Paik, 2001; Alves et *al.*, 2006; Albano et *al.*, 2007).

2.4.3. Caractères chimiques

Les bactériocines sont généralement stables dans les milieux acides et neutres. Par contre elles perdent leur stabilité en milieu basique. C'est le cas de la nisine qui perd sa stabilité à 80% à pH 10 (Piard et Desmazeaud, 1992; Kostinek et *al.*, 2007).

L'activité de la bactériocine issue de bactéries lactiques mésophiles n'est pas affectée par la variation du pH allant de 2 à 11 (Gomez et *al.*, 1997).

2.5. Mécanisme d'action de la bactériocine

Toute les bactériocines de bactéries lactiques, dont le mode d'action a été étudié, paraissent agir de façon similaire en formant des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles. Cependant sans qu'une explication puisse être fournie, un effet bactériostatique a été décrit pour certaines bactériocines alors que pour d'autres, quelquefois très proches des précédentes, l'effet est nettement bactéricide (Hécharde et *al.*, 1992).

D'autres différences résident dans la nécessité d'un potentiel membranaire et une action directe sur les structures phospholipidiques (Jung et Sahl, 1991) ou à l'inverse un mécanisme dit voltage- indépendant, mais nécessitant une interaction initiale avec un récepteur de nature protéique (Venema et *al.*, 1996). Dans tous les cas, la formation de pores membranaires a pour conséquence directe l'efflux d'ions ou encore de petites molécules comme des acides aminés.

Les bactéries productrices pouvant être sensibles à leur propre bactériocine, elles se prémunissent à l'aide d'une protéine qualifiée «d'immunité» (Abee, 1995). La protéine d'immunité, une protéine possédant un large domaine transmembranaire pourrait interagir avec le récepteur potentiel de la bactériocine et empêchait ainsi l'insertion de cette dernière dans la membrane (Quadri et *al.*, 1995).

Selon Tagg et *al.* (1976), le mode d'action des bactéries comporte deux étapes:

1 ère étape : elle consiste en l'adsorption de la bactériocine sur les récepteurs spécifiques ou non spécifiques de la membrane des cellules cibles.

2 ème étape: elle est une phase irréversible implique la modification pathologique de la cellule cible.

L'action des bactériocines se manifeste par la formation des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles et la fuite des constituants cellulaires (ATP, K⁺) qui ont un rôle

dans le maintien et l'équilibre des réserves énergétiques et du pH intracellulaire. Cette perte va perturber la synthèse des macromolécules tels que l'ADN, l'ARN et les protéines.

2.6. La biosynthèse des bactériocines

Plusieurs étapes sont nécessaires à la production d'une bactériocine mature par une bactérie. L'induction de la biosynthèse, la transcription en ARN et la traduction en protéines des différentes composantes du système de biosynthèse, la modification des acides aminés dans le cas des lanthionines, la maturation et finalement le transport de la bactériocine vers l'extérieur de la cellule constituent les différentes étapes de biosynthèse. Il faut aussi inclure dans ces étapes l'immunité, qui rend la cellule productrice résistante à sa propre bactériocine. Le tableau suivant résume le rôle des diverses protéines impliquées dans la biosynthèse d'une bactériocine (Tab. 1) (Venema et al., 1996).

Tableau 1: Rôle des protéines impliquées dans la biosynthèse d'une bactériocine

Protéine(s)	Rôle
Induction	Reçoit un signal de l'inducteur (externe à la cellule) et provoque la transcription des gènes codant pour la biosynthèse de la bactériocine
Structure	code pour la bactériocine immature
Modification	dans le cas des lanthionines, modifie des acides aminés sur la bactériocine immature
Transport	Transporte la bactériocine à l'extérieur de la cellule
Clivage	coupe la bactériocine immature de son signal N- terminal
Immunité	rend la cellule productrice résistante à sa bactériocine

2.7. Bactéries lactiques productrices de bactériocines

2.7.1. Lactobacillus acidophilus

2.7.1.1. Principaux caractères des lactobacilles

Ce sont des bacilles se présentant sous la forme de petits bâtonnets plus ou moins allongés de 0,5 à 2 µm de longueur. Ils peuvent avoir différents aspects: droits, diplobacilles ou en une longue chaîne de bacilles (Larpen, 1997). Ces bactéries tirent leur nom de «lacto» du fait qu'elles transforment les sucres du lait par le biais de la fermentation lactique. La croissance des bacilles est stimulée par une concentration de CO₂ de l'ordre de 5 à 10 %. La présence de ce dernier indique l'anaérobiose. Ces bactéries peuvent se développer en association avec d'autres espèces lactiques dans un produit alimentaire fermenté ou dans le tube digestif de l'homme. Peu d'espèces sont pathogènes.

2.7.1.2. Taxonomie

Les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* appartiennent à la famille des *Lactobacillaceae*. Orla Jensen (1919) a divisé ce genre en trois groupes (sous genre) selon le produit de fermentation des sucres et leur température optimale de croissance:

Groupe I Thermobacterium

Ce groupe rassemble les lactobacilles homofermentaires stricts qui fermentent les hexoses par la voie d'Embden Meyerhof Parnas. Ces bactéries se développent à une

température de 45 °C à l'exception de deux espèces soit *Lactobacillus agilis* et *Lb. murinis*. Les espèces appartenant à ce groupe ne se développent pas à une température de 15°C. Plusieurs espèces sont trouvées dans le lait soit *Lactobacillus bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. jugurti* et *Lb. matis*. Les bactéries de ce groupe sont caractérisées par l'importante quantité d'acide lactique produite par ces germes. Chaque espèce possède des aptitudes très limitées à fermenter divers sucres (Desmazeaud, 1983).

Groupe II Streptobacterium

Ce groupe représente les bacilles hétérofermentaires facultatifs. Les hexoses sont fermentés par la voie d'Embden Meyrhopf Parnas en acides lactiques. Mais les pentoses peuvent être dégradés en empruntant la voie hétérofermentaire en produisant des acides lactique et acétique.

Groupe III Betabacterium

Les espèces de ce groupe ont un métabolisme strictement hétérofermentaire. IL y a absence de fructose 1,6 dip-aldolase et de phosphofructokinase. Mais elles ont une forte activité de glucose 6 D gluconate déshydrogénase. Les espèces de ce groupe possèdent une phosphocétolase. Elles fermentent le gluconate et les pentoses en produisant de l'acide lactique, de l'acide acétique, du CO₂ et de l'éthanol. Ce groupe comporte plusieurs espèces dont *Lactobacillus brevis* et *Lb. kefir*. Seules deux espèces se développent à une température de 45°C (*Lb. fermentum* et *Lb. neuteri*).

2.7.2. Les bifidobactéries

2.7.2.1. Taxonomie des bifidobactéries

Les bifidobactéries ont longtemps appartenu au genre *Lactobacillus* et puis plus tard au genre *Actinomyces* (Poupard et al., 1973). Le pourcentage de cytosine-guanine de l'ADN chez le genre *Bifidobacterium* est en moyenne de 61 %. Mais chez le genre *Lactobacillus* il est de 32 à 53 % (Dellaglio et al., 1994; Biavati et al., 2000).

Actuellement, le genre *Bifidobacterium* appartient à la famille des *Actinomycetaceae*. Il était composé de 29 espèces dont 10 provenant de l'homme, 17 de divers animaux et 2 du milieu aquatique. D'après Meile et al. (1997), trois nouvelles espèces ont été incluses dans la liste, *Bf. lactis* et *Bf. inopinatum* isolées à partir du lait de vache et *Bf. denticolens* isolée de l'être humain. Actuellement, il existe 32 espèces de bifidobactéries.

L'identification des bifidobactéries est généralement effectuée selon la méthode de Mitsuoka (1984). Celle-ci permet entre autres, d'identifier les acides organiques produits par la fermentation du glucose. Par ailleurs grâce à une méthode enzymatique il est possible de rechercher la fructose -6- phosphate phosphocétolase (Chevalier et al., 1990; Gerdes, 2001; Ward et Roy 2005).

2.7.2.2. Caractères généraux

Les bifidobactéries sont des bactéries Gram (+), asporogènes, immobiles et à catalase (-). Elles se présentent en petits amas formant des bouquets de bâtonnets incurvés aux contours réguliers et ondulés. Elles peuvent aussi se présenter sous la forme de petits bacilles réguliers ou de coccoïdes (Chapon et Kiss, 1991; Gavini et al., 1991).

Leur morphologie dépend de la composition du milieu. La forme bifide en Y apparaît en présence de carbonate, d'acétate de sodium et de chlorure dans le milieu.

Les bifidobactéries se distinguent des autres bactéries à Gram (+) par leur morphologie bifide et la présence de la fructose-6- phosphate phosphocétolase (F6PPK). Cette dernière assure la dégradation des hexoses par la voie du fructose –6- phosphate. Cette voie est appelée « Bifid-shunt » [voie F6P-phosphocétolase] (Jiang et al., 1996; Fujiwara et al., 2001) (Fig. 2).

Ce sont des micro-organismes anaérobies. Leur développement nécessite l'addition d'un agent réducteur tel que le chlorhydrate de cystéine ou de l'acide ascorbique (Roy, 2005). Ce sont des bactéries acidophiles (pH optimal 5 à 6). Leur température optimale de croissance est comprise entre 37 et 40 °C. Les espèces de bifidobactéries provenant de l'homme sont généralement non pathogènes. Les problèmes cliniques associés aux bifidobactéries sont rencontrés avec l'espèce *Bifidobacterium dentium* (Mitsuoka et Kaneuchi, 1977; Leahy et al., 2005).

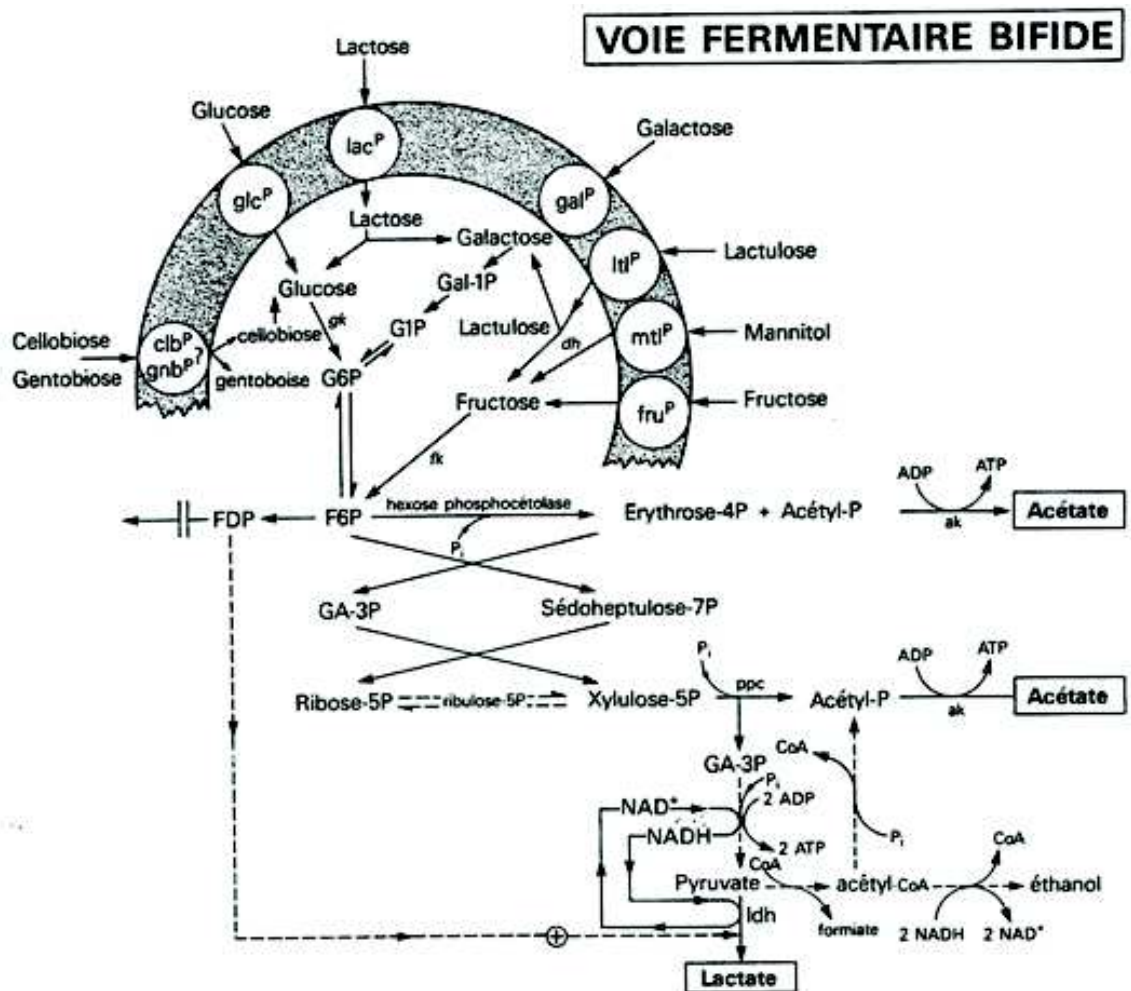


Fig. 2: Transport et métabolisme des sucres par les bifidobactéries (Thompson, 1987).

2.7.2.3. Les facteurs bifidigènes

Les bifidobactéries sont incapables de se développer dans un milieu totalement synthétique. Leur croissance nécessite la présence de substances naturellement présentes dans le lait maternel appelées facteurs bifidigènes (Nord et *al.*, 1984; Poch et Bezkorovainy, 1991). Il existe au moins 2 types de facteurs bifidigènes, thermostables pour *B. bifidum* et thermolabiles pour *Bf. infantis* (Romond et *al.*, 1980; Misra et Kuila, 1992). *Bf. bifidum* trouve dans le lait de la femme des facteurs résistants à la chaleur, alors que *Bf. infantis* ne se développe pas dans le lait maternel pasteurisé.

- Facteurs bifidus I et II

Le liquide amniotique et le lait maternel en contiennent (sous la forme de gynolactose) (Beerens et *al.*, 1980; Tamura, 1983). Ces facteurs stimulent essentiellement la croissance de *Bf. bifidum*. Les mucines de porcs et de rongeurs en présentent également. Ces facteurs sont utilisés comme source d'énergie par *Bf. bifidum* (Proulx et *al.*, 1992).

Les facteurs bifidus II sont obtenus au cours de la digestion par la voie enzymatique par action de la trypsine, la chymotrypsine, l'alcalase ou la papaine sur les protéines (Proulx et *al.*, 1992). Ces facteurs sont présents dans le lait maternel et dans le foie. L'addition de ces facteurs dans les produits lactés augmente le nombre de ces bactéries dans les selles et diminue le pH jusqu'à une valeur proche de celle des selles de nourrissons allaités au lait maternel (Modler et *al.*, 1990).

- Les oligosaccharides

Selon Salminen et Salminen, (1997), le lactulose est favorable pour la croissance des bifidobactéries. Le lactulose est un disaccharide composé de galactose et de lactose. Il est obtenu par une caramélisation du lactose. En dehors de son effet bifidigène ce sucre est utilisé dans le traitement des constipations et des affections intestinales (Tanaka et *al.*, 1983; Dorshow et Lewitt, 1987). Le raffinose est un oligosaccharide naturel métabolisé par des espèces de bifidobactéries (Yazawa et *al.*, 1978; Terada et *al.*, 1992; Dubey et Mistry, 1996). Il existe même des oligosaccharides de synthèse tels que le fructo-oligosaccharide et le transgalactoside-oligosaccharide. Ces composés ne sont pas fermentescibles dans la bouche. Ils sont indigestes dans l'intestin grêle, mais totalement dégradables dans le colon (Bouhnik et *al.*, 1991; Champagne et *al.*, 2005).

Selon Wijsman et *al.* (1989) les oligo-saccharides de synthèse ont un grand intérêt au laboratoire pour un isolement sélectif des bifidobactéries à partir d'un produit polymicrobien tel que les selles.

- Les autres facteurs bifidigènes

L'addition de jus de carotte ou de ses constituants tels que l'acide pantothenique, l'acide 3-phosphocoenzyme A-5-sulphonique, ou l'acide 4-phosphopantéthéine -5-sulphonique, aux milieux de culture augmente la croissance des bifidobactéries (Romond et Romond, 1987).

Il existe aussi d'autres facteurs bifidogènes tels que l'extrait de malt (Nagawa et *al.*, 1987) et l'extrait de levure (Roy et Ward, 1990).

2.7.2.4. Spécificités biochimiques et culturelles

Les bifidobactéries sont des bactéries anaérobies strictes. Elles se développent sur de nombreux milieux de culture en présence d'un agent réducteur tel que le chlorhydrate de cystéine ou l'acide ascorbique (Gavini et *al.*, 1991 et 1996).

Les bifidobactéries peuvent se développer sur d'autres milieux tels que le TPY (Trypticase peptone yeast) et le milieu Columbia Agar modifié par Beerens (1990). Ce dernier est sélectif et électif pour les bifidobactéries lorsque le pH est ajusté à 5 par l'action de l'acide propionique (Bonaparte et *al.*, 2001). Il existe un 3^{ème} milieu appelé Bacto Brewn Anaerobic Agar *Actinomyces* Broth, (De Roissart et Luquet., 1994). Pour le dénombrement des bifidobactéries deux milieux sont utilisés (Wijsman et *al.*, 1989). Le premier milieu, est le transgalactosylate oligo-saccharide (T.O.S) agar amélioré par le NPNL (mélange d'antibiotiques, de sulfate de néomycine, de sulfate de paromomycine, d'acide nalidixique et de liel). Le second milieu, est le TOS agar modifié par le remplacement du TOS par L-arabinose.

Sur le plan biochimique, les bifidobactéries se différencient des autres espèces au niveau de la voie du Bifid Shunt du fructose-6-P, en produisant 3 moles d'acétate pour 2 moles de lactate (De Roissart et Luquet, 1994). Le processus de la fermentation du glucose par *Bifidobacterium* est présenté dans la figure 2 (Tamime et *al.*, 1995). Toutes les espèces de bifidobactéries sont nitrate-réductase (-), et catalase (-) à l'exception de *Bf. indicum* et de *Bf. asteroides* qui deviennent catalase (+) en présence d'air.

III. La microflore intestinale de l'homme

3. 1. Installation de la flore intestinale

Dans les heures qui suivent la naissance puis durant toute la vie, le tube digestif est colonisé par les bactéries dites résidentes à un taux élevé (soit 10^{11} bactéries/g de selles) (Fuller, 1989; Fooks et Gibson, 2001).

Cette flore bactérienne se caractérise par un équilibre avec des populations dominantes. Ces germes ont un effet sur l'hôte. On parle «d'écosystème microbien intestinal». Seules les populations dominantes peuvent avoir une fonction efficace au niveau du tube digestif. Une autre population bactérienne dite sous-dominante compose cet écosystème. Cette flore forme des bactéries en transit, provenant de l'alimentation ou de prescriptions médicamenteuses (Moreau, 2001a; Duggan et *al.*, 2002; Reuter, 2002). Il existe une troisième flore nommée flore fluctuante constituée en partie de bactéries synthétisant des substances indésirables (phénol, ammoniac, sulfure). L'importance de cette flore est fonction des deux autres populations ou flore microbiennes ci-dessus citées (Baudet, 2002). De grandes différences existent entre la flore microbienne des personnes âgées, celles de l'enfant et de l'adulte. La qualité de la flore intestinale est fortement influencée par l'alimentation, à titre d'exemple les bifidobactéries abondent dans la flore fécale du nourrisson allaité au sein contrairement à ce qui est trouvé dans les selles du nourrisson allaité artificiellement (Moreau, 2001a; Altermann et *al.*, 2005; Azcarate-Peril et *al.*, 2005).

3.2. Le système immunitaire intestinal

La muqueuse de l'intestin grêle et celle du colon contiennent un nombre de cellules immunes supérieur au nombre total existant dans tout le reste de l'organisme. L'intestin est ainsi le premier organe lymphoïde de l'organisme. Parallèlement, le tube digestif contient, chez

l'homme, environ 10¹⁴ bactéries principalement présentes dans les parties terminales de l'intestin grêle et dans le colon, 60 à 70 % de cellules immunes sont présentes dans la muqueuse intestinale.

La première fonction du système immunitaire intestinal est de tolérer toutes les protéines étrangères à l'organisme ou antigènes. Dans ce cas il n'y a pas de réponses immunes inflammatoires contre ces protéines au niveau du tube digestif. Cette importante fonction empêche ainsi le développement des hypersensibilités alimentaires. Cependant le système immunitaire intestinal doit également protéger l'hôte de la pénétration de bactéries résidentes dans le compartiment systémique et de l'envahissement du tube digestif par des microorganismes pathogènes. Pour cela ce système a une deuxième fonction qui est la possibilité de fabrication d'anti-corps appartenant à la famille des immunoglobulines A ou IgA sécrétés dans la lumière intestinale par les cellules immunes de la muqueuse (plasmocytes à IgA). Ces anticorps sont parfaitement adaptés aux conditions de l'intestin. Leur fonction protectrice est d'empêcher la translocation bactérienne par des bactéries résidentes et pathogènes, de neutraliser les toxines, d'inhiber la multiplication virale dans l'entérocyte, et de bloquer l'adhésion des bactéries à la muqueuse (Moreau, 2001b; Delgado et al., 2007).

3.3. Interaction flore intestinale-immunité de l'hôte

La présence de bactéries intestinales interagit fortement avec le développement du système immunitaire intestinal et avec ses fonctions. Ainsi la flore intestinale joue un rôle très important en optimisant ces fonctions ce qui permet le maintien de l'équilibre intestinal.

Les aliments peuvent avoir un effet immunomodulateur en influant sur la flore intestinale, d'où la naissance des produits dits «fonctionnels» dont on distingue les probiotiques (Moreau, 2001b; Belfiore et al., 2007). En effet la flore intestinale peut être la cible d'un déséquilibre due à des causes physiologiques (malnutrition, prise d'antibiotiques, stress et déficit immunitaire). Il faut veiller au bon équilibre de l'écosystème microbien intestinal en renforçant la présence de la flore dominante. C'est le rôle des probiotiques tels que *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Baudet, 2002; Pillai et Jesudhasan, 2006; Loghavi et al., 2008).

Chapitre II: Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

Le matériel biologique comprend:

- Le lait de vache cru fourni par une ferme située près de Blida. La vache appartient à la race bretonne pie noir. Les prélèvements de lait ont été réalisés directement à partir de la mamelle. Les conditions de la traite sont comme suit:
- L'extérieur de la mamelle souvent souillé par la litière ou par les excréments; un nettoyage préalable avant la traite est donc indispensable; celui-ci peut être réalisé à l'aide d'un linge préalablement trempé dans une solution désinfectante, tiède; la mamelle doit ensuite être séchée.
- Les premiers jets de lait provenant de chaque quartier de la mamelle sont toujours plus fortement chargés en germes; il y a lieu de les collecter séparément et de ne pas les mélanger avec le lait recueilli ultérieurement.
- Se laver soigneusement et se sécher les mains avant la traite.
- Assurer une réfrigération rapide du lait (0-4°C.).
- Des selles de nourrissons allaités exclusivement au sein de l'hôpital Ben Boulaid de Blida.

Différents germes pathogènes (souches cibles ou indicatrices) fournis par le laboratoire de microbiologie de l'hôpital Ben Boulaid de Blida, le laboratoire d'hygiène de Blida et l'institut Pasteur d'Alger. Les germes pathogènes Gram positif utilisés sont *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* et *Bacillus subtilis*. Les germes pathogènes Gram négatif utilisés sont *Escherichia coli* (EPEC), *Salmonella thyphimurium* et *Yersinia enterocolitica*. D'autre espèce indicatrices non pathogènes sont utilisées soit, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* et *Bifidobacterium bifidum*.

- Une souche de référence *Lactobacillus bulgaricus* 340 (Danisco, Dangé-Saint-Romain, France).

Les conditions de culture des souches cibles sont présentés en annexe (Tab. 2).

2. Méthodes

2.1. Technique d'isolement et de sélection des bactéries lactiques

Les streptocoques thermophiles sont isolés à partir d'un lait cru fourni par une ferme de la région de Blida. Ce lait est laissé pour une coagulation spontanée à 37°C pendant 24h. Ce dernier fera objet d'un isolement des lactobacilles thermophiles.

A partir du lait de vache, des dilutions décimales jusqu'à 10^{-7} sont réalisées. A partir de la dernière dilution, des ensemencements sont faits en profondeur sur milieu MRS, qui favorise la croissance des lactobacilles et en surface sur milieu M17 pour la croissance des streptocoques. L'incubation des boîtes de Pétri se fait à une température de 37°C pour les lactobacilles et à 42°C pour les streptocoques thermophiles pendant 24 à 48 h.

Les souches bifides proviennent de selles fraîches d'un nourrisson sain âgé de 2 mois. L'échantillonnage est effectué au niveau de la pouponnière de l'hôpital Ben Boulaid de Blida.

Les selles sont prélevées stérilement à partir de la couche jetable. L'isolement des bifidobactéries est réalisé en profondeur sur MRS cystéiné à 37°C. Après 48 h d'incubation, les colonies sont sélectionnées selon leur aspect morphologique ainsi que sur la base de leur mobilité, de leur forme, de leur état frais et de la coloration de Gram (Tamime et al., 1995). Les colonies des bifidobactéries sont repiquées sur le bouillon MRS cystéiné, à pH 6,4 additionné de 15 µg/ mL d'acide nalidixique. Puis les tubes sont incubés en anaérobiose (en ajoutant une goutte d'huile de paraffine stérile à la surface du tube) pendant 24 h à 37°C. A partir des isolats plusieurs tests sont réalisés soit, la coloration de Gram, test de la catalase, test physiologique et test biochimique de la galerie API 20A (cette galerie est choisi vu l'absence de la galerie API 50CH). Après quoi les souches seront repiquées sur MRS cystéiné à pH 6,4 (Larpen, 1997; D'Aimmo et al., 2007).

2.2. Identification des souches

Les souches sont identifiées selon les tests préconisés par Larpen (1997). Des observations macroscopiques et microscopiques, des colorations de Gram, des tests de la catalase, des tests physiologiques et des tests biochimiques de la galerie API 20A sont réalisés.

2.3. Criblage des bactéries lactiques thermophiles productrices de bactériocines

L'effet antagoniste des souches lactiques est étudié vis à vis d'autres espèces lactiques et à l'égard de 4 espèces pathogènes (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*) suivant la méthode de diffusion en milieu solide afin de détecter la production de la substance inhibitrice. Celle-ci est mise en évidence par la méthode de puits de diffusion sur gel (Tagg et al., 1976). Le principe de cette méthode est basé sur la diffusion de l'agent antibactérien dans un milieu gélosé ensemencé au préalable avec un germe cible.

Pour étudier l'effet antagoniste de la bactériocine, il est nécessaire d'éliminer l'influence des acides organiques (acide lactique), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il est donc nécessaire de travailler dans les conditions suivantes: (Gies et al., 1983; Toora, 1995).

-le pH du milieu est ajusté à une valeur de 6,8 en ajoutant quelques gouttes de NaOH 1N stérile.

· l'effet inhibiteur du H_2O_2 est éliminé par l'ajout de la catalase (5 mg / mL).

2.4. Sélection des souches

Une première sélection des souches est effectuée sur la base de l'activité bactériocinogène. Puis une deuxième sélection est réalisée sur la base de deux paramètres technologiques, le pouvoir acidifiant et la cinétique de la croissance. Ces deux derniers sont suivis dans du lait écrémé reconstitué à raison de 10% toutes les 2 h pendant 8 h et après 24 h de fermentation.

L'évolution de la population bactérienne est déterminée par dénombrement sur milieu solide (nombre des UFC/mL).

L'activité acidifiante est caractérisée par quatre paramètres (Zourari et Desmazeaud, 1991):

V_m: vitesse maximale d'acidification exprimée en mUpH/min

T_m: temps où intervient V_m (en min)

pH_i: pH initial

pH_f: pH final

$$V_m = \Delta \text{pH} / \Delta T$$

La mesure de la croissance par dénombrement (UFC/ml) permet de calculer le temps de génération (G) ainsi que le taux de croissance (μ): (Prescott et al., 2007)

$$G = T \cdot \text{Log } 2 / (\text{Log } N_f - \text{Log } N_i)$$
$$\mu = 1 / G$$

Log N_f : logarithme du nombre des UFC obtenu au temps final (T_f)

Log N_i: logarithme du nombre des UFC obtenu au temps initial (T_i)

2.5. Etude de l'activité antimicrobienne

2.5.1. Préparation du surnageant brut actif

Un volume de 400 mL de bouillon MRS est inoculé à raison de 10% avec une préculture de 24h de la souche bactérienne sélectionnée puis étuvé à 37°C pendant 18h avec une agitation de 100 rpm. Une centrifugation de la culture est réalisée à 10 000g pendant 30 mn à 4°C. Le surnageant et le culot sont récupérés stérilement pour la recherche de la substance inhibitrice. Le pH du surnageant est ajusté à une valeur de 6,8 puis filtré à travers des membranes de 0,45 μm (diamètre des pores). Par contre le culot est lavé deux fois avec de l'eau distillée, séché puis additionné de méthanol selon un rapport de volume 2/3 (V/P). Le but d'ajout du méthanol est l'extraction éventuelle de la bactériocine. Le mélange est centrifugé à 10 000 g pendant 30 mn à 4°C. Le surnageant obtenu est appelé extrait cellulaire.

2.5.2. Test de l'activité antimicrobienne

2.5.2.1. Méthode de diffusion en milieu solide

L'activité antimicrobienne du surnageant brut actif ainsi que de l'extrait cellulaire est testée par la méthode de diffusion en milieu solide Le milieu gélosé approprié estensemencé à

raison de 1% avec la souche cible. 20 mL de cette gélose sont coulés dans des boîtes de Pétri. Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement sur cette surface et seront remplis avec 100 μ L du surnageant de culture ou d'extrait cellulaire. Ces boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C/ 4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne. Les cultures seront mises dans leurs conditions optimales de croissance. La lecture se fait par la mesure du diamètre en mm des zones d'inhibition formées autour des puits (Zi). Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm (Thompson et al., 1996). La mesure du diamètre d'inhibition Zi est effectuée selon la formule suivante:

$$\text{Zi en (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre de puits (6 mm)}$$

2.5.2.2. Méthode de la dilution critique

Le but de cette méthode est de déterminer la plus faible concentration en bactériocine capable de provoquer une inhibition complète de la croissance de la bactérie cible. Les cellules de la souche cible en présence de bactériocine à différentes concentrations sont étuvées pendant 24h. Une courbe de corrélation entre la croissance de la souche cible en fonction de la concentration en bactériocine est établie (Daba et al., 1994).

Au préalable, la taille de l'inoculum bactérien de la souche cible est déterminée. Le suivi de l'absorbance de la souche cible *Lb. bulgaricus* 340 est réalisé à différentes concentrations cellulaires. Une öse de *Lb. bulgaricus* 340 estensemencée dans 5 mL de bouillon MRS puis étuvée à 37°C pendant 24h (culture **P1**). A partir de cette dernière culture plusieurs dilutions dans 5 mL de bouillon MRS sont réalisées de 10^{-1} jusqu'à 10^{-4} . Les 4 cultures diluées (C1, C2, C3, C4) et les deux tubes témoins sont incubés à 37°C pendant 24h, l'essai est réalisé en double. A travers cet essai, on cherche la dilution de la culture de la souche cible qui permet d'obtenir une DO (à 660 nm) de 0,8 en 24 heures, qui servira à l'étude de l'effet antagoniste de la bactériocine de *Lb. acidophilus* à différentes concentrations.

Par ailleurs, en fin de fermentation de la souche sélectionnée, la culture est centrifugée à 10 000g pendant 30 min. Le pH du surnageant brut actif (SBA) est ajusté à 6,5 (pH optimal pour l'activité antimicrobienne) avec une solution de NaOH 1N stérile. Le SBA est distribué à raison de 5 mL puis stocké à -20°C. L'activité antimicrobienne de la bactériocine est étudiée vis-à-vis de la souche cible (*Lb. bulgaricus* 340) cultivée sur bouillon MRS en présence de différentes concentrations en bactériocine contenue dans le SBA. Après 24h d'incubation, une courbe de corrélation est effectuée (DO en fonction de la concentration du SBA). En parallèle l'activité antimicrobienne de la bactériocine est testée par la méthode de diffusion sur gel.

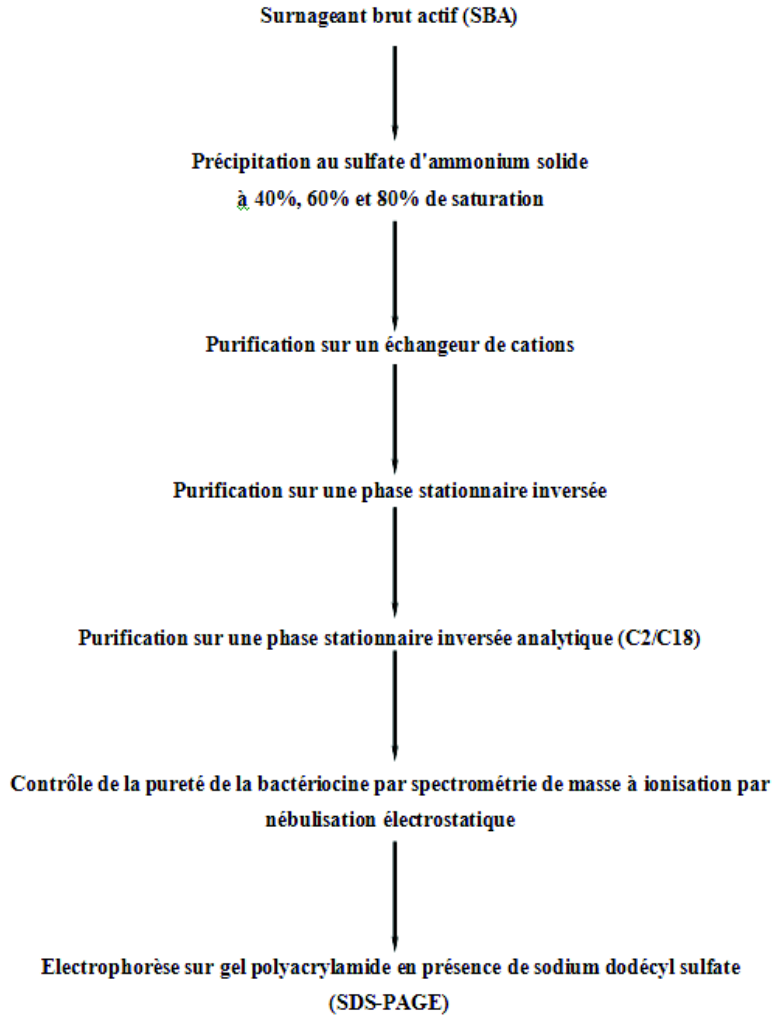
2.6. Purification de la bactériocine issue de *Lactobacillus acidophilus*

2.6.1. Préparation de la culture

La purification des bactériocines est réalisée selon le protocole établi par Nissen-Meyer et al.(1992). Une colonie de *Lactobacillus acidophilus* est reprise dans 1 mL de bouillon MRS puis étuvé à 37°C/24h. Un deuxième repiquage est réalisé: 1 mL de la précédente culture est repris dans 10 mL de bouillon MRS étuvé à 37°C pendant 24h. Une grande

culture est ensuite lancée, 400 mL de bouillon MRS sont repiqués à raison de 10% avec la culture précédente à 37°C pendant 18h. Une centrifugation réfrigérée est réalisée à 10 000 g pendant 30 min. Les surnageants récupérés sont filtrés sur de l'acétate de cellulose 0,45 µm.

Les différentes étapes de purification de bactériocine sont illustrées comme suit:



Différentes étapes de purification de la bactériocine

2.6.2. Précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium

Cette précipitation est un procédé de séparation basé sur la différence de solubilité des protéines (Osterlund et Janson, 1997). Cette méthode permet de concentrer les protéines. Le but est de déterminer à quelle concentration en sulfate d'ammonium, la bactériocine précipite. La précipitation des protéines est réalisée par addition de sulfate d'ammonium solide $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ à des concentrations progressives jusqu'à saturation complète du surnageant. Le surnageant brut actif additionné de sulfate d'ammonium est porté à une incubation réfrigérée à +4°C sous agitation pendant 30 min.

Le précipité est récupéré par centrifugation réfrigérée à 10 000 g pendant 1 h. Le surnageant est ensuite repris, précipité par le sulfate d'ammonium jusqu'à 80% dans les mêmes conditions précédentes, puis centrifugé à 10 000 g pendant 1h. Le précipité obtenu est remis en suspension dans le tampon sodium phosphate 10 mM.

2.6.3. Purification sur un échangeur de cations

Le surnageant brut actif est injecté avec un débit rapide (5 mL/min) sur une colonne à échangeur de cations (S-Sépharose, Sigma®). Le type de gel est stream line sulfopropyl (SF), et les dimensions de la colonne (L x D) sont 20 x 2,5 cm. Deux tampons sont utilisés, tampon A (acétate de sodium 50mM, pH 4) et le tampon B (acétate de sodium 50 mM + NaCl 1M, pH 4). La colonne est d'abord équilibrée avec le tampon A, puis le mélange (150 mL du SBA additionné de 50 mL du tampon A, pH 4) est injecté avec un débit de 10 mL/min à travers cette colonne. Les fractions douées d'une activité inhibitrice seront éluées par une solution de chlorure de sodium à 0,1M, 0,3M et 1M. L'éluat actif obtenu est appelé fraction I.

2.6.4. Purification sur une phase stationnaire inversée

La fraction I a été purifiée par un passage avec un débit de 4 mL/min sur une colonne en phase inversée. Le gel utilisé est de type Poros R1 et les dimensions de la colonne (L x D) sont 20 x 1,5 cm, avec un volume de 12 mL. Deux tampons sont utilisés, le tampon A (0,1% d'acide trifluoroacétique) et le tampon B (80% acétonitrile + 0,09% TFA). La colonne est d'abord équilibrée avec du tampon A pendant 2 min; ensuite la fraction active contenant la bactériocine est passée à travers cette colonne avec un débit de 5mL/min. Les molécules de bactériocine sont ensuite éluées avec un gradient linéaire du tampon B pendant 30 min. L'éluat actif obtenu est appelé fraction II.

2.6.5. Purification sur une phase stationnaire inversée analytique (C2/C18)

Deux tampons sont utilisés, le tampon A (1,1% TFA) et le tampon B (0,9% TFA + 70 % ACN + 30% H₂O). La fraction III préalablement lyophilisée est reprise dans 100 µL du tampon A. Elle est purifiée par un passage sur une colonne en phase inversée analytique (RP-HPLC, MN, 100 x 4, 300A, 5µm, C8, Pharmacia-LKB). Cette colonne est d'abord équilibrée avec le tampon A pendant 3 min. 20 µL d'échantillon sont injectés. Les molécules de bactériocine sont éluées avec un gradient de tampon B (de 3 à 33 min: 100% B, de 33 à 35 min 100% A) avec un débit de 1 mL/min. Un détecteur UV (Waters 991, Millipore) permet de suivre le profil d'éluion des molécules de bactériocine à 280 nm. Des fractions de 1 mL sont recueillies par un collecteur de fractions (Cygnet, Roucaire) placé à la sortie du détecteur. La pureté de la bactériocine est contrôlée par spectrométrie de masse. Après chaque étape de purification, une mesure de l'activité antimicrobienne des bactériocines est réalisée.

2.6.6. Contrôle de la pureté de la bactériocine par spectrométrie de masse à ionisation par nébulisation électrostatique (ESI/MS, Electro spray Ionisation Mass Spectrometry)

La **spectrométrie de** masse est une technique d'analyse chimique permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse monoisotopique. De plus, la spectrométrie de masse permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) (Gale et Smith, 2005).

Le mécanisme de l'ionisation par électrospray est décrit comme suit: dans un premier temps, l'échantillon est simplement solubilisé dans un mélange méthanol-eau 1:1 (v/v). Il est ensuite introduit avec un débit de 2,5 µL/ min dans un capillaire qui est porté à un haut potentiel électrique. Ce champ électrique provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui se dirigent vers l'entrée du spectromètre de masse. Par évaporation, ces gouttelettes vont porter une charge positive de plus en plus importante qui provoquera une succession d'explosion coulombiennes pour aboutir à la fin du processus à des ions moléculaires multichargés de type $[M+nH]^{n+}$ où n est le nombre de charge porté par la molécule analysée de masse M (Constantin et al., 1996; Rollema et al., 1996).

Les spectres ESI présentent en général un ensemble de pics correspondant aux ions multichargés de type $[M+nH]^{n+}$ où M correspond à la masse moléculaire de la molécule analysée, et n au nombre de charges portées par cette molécule ionisée. La masse M peut-être déterminée très simplement par déconvolution du spectre et transformation de ce dernier en une courbe masse-intensité. Par exemple, pour deux pics successifs de rapports m/z mesurés sur le spectre m_1 et m_2 (avec $m_1 < m_2$), et de charges **Z** et **Z + 1** Sachant que:

- $m_1 = M + Z/Z$
- $m_2 = M + Z + 1/Z + 1$

On peut donc calculer l'état de **charge n** et la **masse moléculaire M**:

- $Z = (m_2 - 1) / (m_1 - m_2)$
- Avec $M = [m_2 \cdot (Z + 1)] - (Z + 1)$

La détermination de la masse molaire de la bactériocine est obtenue grâce au logiciel X calibur

2.6.7. Electrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE)

L'une des variantes les plus répandues de l'électrophorèse est la SDS-PAGE, utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Les protéines sont dénaturées par du sodium dodecyl sulfate, molécule très fortement chargée négativement. Les charges négatives du SDS noient complètement les charges propres de la protéine qui n'interviennent plus. La charge de l'ensemble molécule dénaturée/SDS (et donc sa vitesse de migration) dépend alors uniquement de la longueur de la chaîne protéique. La présence du gel ralentit les grosses protéines, qui se répartissent le long du trajet de migration en fonction de leur poids moléculaire.

Une électrophorèse est réalisée sur gel en présence de dodecyl sulfate de sodium polyacrylamide (SDS-PAGE) selon la méthode de Schägger et Von Jagow (1987). Le gel principal est composé de 15% d'acrylamide, de 0,1% de dodécyl sulfate et de tris 0,33M (Tableau 3, en annexe). 40 µL d'échantillon de bactériocine purifiée ont été mélangés avec 20 µL de tampon de charge pH 6,8 (composition en annexe). Les échantillons ont été bouillis dans l'eau cinq minutes avec le tampon de charge avant leur dépôt. Le marqueur peptides LMW (pharmacia Biotech) utilisé est constitué de triosephosphate isomérase (26,6 kDa), de myoglobine (17 kDa), de lactalbumine (14,2 kDa) et d'aprotinine (6,5 kDa).

Le système d'électrophorèse utilisé est de type vertical de marque Bioblock Scientific. 20 µL de chaque échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette capillaire dans chaque puits au travers du tampon. La migration électrophorétique se déroule sous une intensité

de 50 mA à température ambiante sous une tension de 100 volts au début de la migration et atteint jusqu'à 150 volts à la fin de la migration. Chaque échantillon a été chargé sur le gel en duplicata de façon à pouvoir couper le gel en deux à la fin de la migration et ainsi obtenir deux gels identiques.

Lorsque la migration électrophorétique est terminée, deux gels sont faits simultanément. Le premier est coloré avec du bleu de Coomassie (Tableau 4, en annexe). Ce gel est ensuite décoloré dans une solution de décoloration (Tableau 4, en annexe). Le deuxième gel est lavé trois fois avec 250 mL d'eau distillée stérile pendant 1 h. Il est alors placé sur gélose MRS précédemment inoculé avec 1% de la souche cible *Lb. bulgaricus* 340. Après 18 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition correspondant aux bandes colorées sont déterminées.

2.7. Action des protéases, du traitement thermique et du pH sur le composé actif

L'activité de bactériocine a été étudiée après traitement du surnageant brut actif par la catalase (Sigma[®], Etats-Unis), par différentes protéases, à différentes valeurs de pH (de 4 à 10) ou après un traitement thermique.

Quatre enzymes protéolytiques ont fait l'objet de notre étude: pepsine (Merck 60 UI/mg), trypsine (Merck from bovine pancreas 40 UI/mg), pronase (Merck 4.000.000UI/g) et protéinase K (Merck 40 UI/mg) (Fillipov, 1981;Gwiazdowska et Trojanowska, 2006).

Toutes les enzymes ont été dissoutes dans la solution tampon de phosphate de potassium 3 mmol.L⁻¹ (pH 7,0) excepté la pepsine (pH 3). Elles ont été ajoutées au surnageant brut actif à une concentration finale de 0,5 mg. mL⁻¹. Après incubation à 37°C pendant 1h 30 min, l'activité antimicrobienne vis à vis *Lb. bulgaricus* 340 est étudiée par la méthode de diffusion des puits.

L'effet de la catalase a été mesuré en ajoutant la catalase à une concentration finale 5 mg. mL⁻¹; la catalase a été dissoute dans une solution tampon phosphate de potassium 50 mmol.L⁻¹ (pH 7) puis incubée à 25°C pendant 2 heures.

La thermorésistance de la bactériocine a été examinée en chauffant le surnageant brut actif pendant 30 minutes aux différentes températures: 70°C, 80°C, 90°C, 100°C et pendant 15, 30 et 45 minutes à 100°C et à 121°C. Après refroidissement, l'activité antimicrobienne est testée.

Des aliquotes du surnageant ont été ajustés aux différentes valeurs du pH (4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10) avec HCl 1N ou NaOH 1N avant d'examiner l'activité inhibitrice. Après incubation pendant 1h 30min à 37°C, l'activité bactériocinogénique est testée vis à vis *Lb bulgaricus* 340 par la méthode de diffusion en milieu solide

Une détermination de l'activité de la bactériocine en unités arbitraires (UA), est réalisée après chaque traitement du surnageant brut actif. Cette activité est définie comme étant la plus grande dilution permettant une absence totale de la zone d'inhibition. Pour déterminer les UA, Le MRS gélosé est ensemencé à raison de 1% avec la souche cible (*Lb. bulgaricus* 340). 20 mL de cette gélose sont coulés dans des boîtes de Pétri. Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement. Le surnageant brut actif contenant la bactériocine préalablement traité est dilué en série (1/2, 1/4, 1/8, 1/16,..., 1/256) puis introduit dans les

huit puits, de façon à ce que chaque puits contienne un volume de 100 µL. Ces boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C/ 4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne puis incubées à 37°C. La lecture se fait par la détermination de la dilution permettant une absence totale de la zone d'inhibition. L'inverse de cette dilution rapporté à 1mL représente la valeur d'une unité arbitraire UA/mL

2.8. Production de bactériocine en bioréacteur

Avant inoculation du fermenteur, les *inocula* sont stockés soit sous forme congelée à -70°C, soit sous la forme lyophilisée. Chaque cryotube contient 1g de biomasse, ils sont décongelés pendant 10 min à 30°C dans un bain marie.

2.8.1. Matériel et milieu de culture du fermenteur

Le fermenteur utilisé est un réacteur Biolafitte (LSL-biolafitte-France) de 2,2L (volume utile 1,8L) (Fig. 3 a et b). Il est relié à un set de régulation permettant de mesurer et de réguler le pH de culture (Fig. 4). Le milieu de culture utilisé est de type industriel. Il s'agit d'un lactosérum doux en poudre. Il est reconstitué à raison de 60 g/L. Afin d'insolubiliser les protéines de haut poids moléculaire, le pH est ajusté à 5,0 avec H₂SO₄ 1N. Puis un traitement thermique est réalisé à 110°C pendant 20 min. Après refroidissement, le lactosérum est centrifugé à 10 000 g pendant 30 min. Le surnageant obtenu est filtré sur papier plissé de 4 à 7 µm de rétention puis complété avec de l'extrait de levure à raison de 20 g/L. L'extrait de levure permet d'enrichir le lactosérum en matières azotées. La stérilisation du milieu est ensuite effectuée dans le fermenteur avec la sonde du pH à 110°C pendant 20 min.

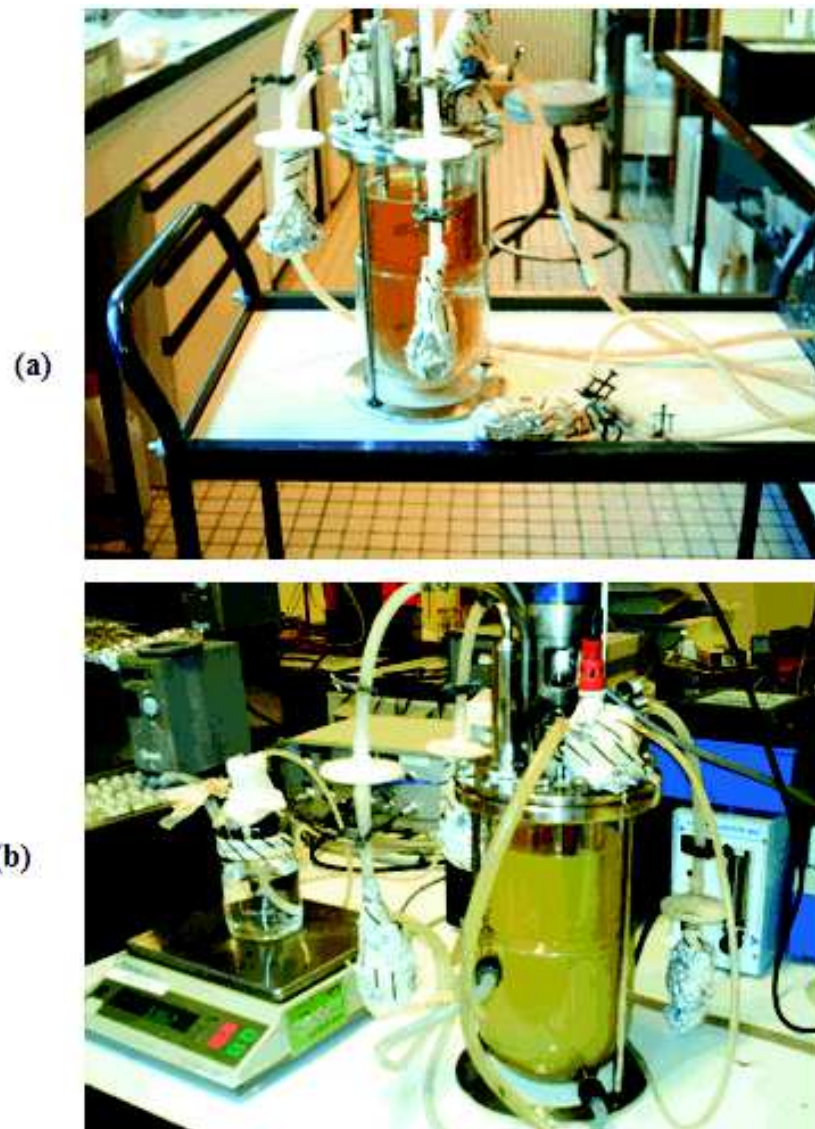


Fig. 3 (a et b): Fermenteur de 2,2L utilisé lors de la culture de *Lb. acidophilus* 11 (photo. originale)



Fig. 4: Equipements de la fermentation (photo. originale)

2.8.2. Conditions de culture

Une öse bien chargée de *Lb. acidophilus* est ensemencée dans 5 mL de bouillon MRS puis incubée à 37°C (culture P1) pendant 24h. Le jour de la fermentation, 100 µL sont repris dans 5 mL de bouillon MRS et incubés à 37°C pendant 18h (préculture P2). La préculture P2 est diluée à raison de 1% dans de l'eau osmosée stérile. Le fermenteur (volume de milieu de fermentation de 1,8 L) est inoculé à raison de 0,01% à partir de la précédente dilution.

Le fermenteur est muni d'un agitateur tournant à 200 rpm/min; une sonde de conductivité électrique est reliée à un transmetteur Mycom CLM 151 (Endress Hauser, Huningue, France) et à une sonde de pH stérilisable (Ingold, Paris, France). Le pH est régulé avec une solution de soude (NaOH 1N) à l'aide d'une pompe péristaltique commandée par un régulateur Demca type 3B101 (Promatex, Quinssaynes, France). La température de la fermentation est maintenue constante à 37°C par la circulation d'eau chaude dans une double enveloppe. L'eau du bain marie est portée à une température supérieure de 2°C à la température désirée.

2.8.3. Suivi de la fermentation

L'acidification est caractérisée par la quantité de soude consommée pour assurer la régulation du pH et par l'évolution de la conductivité électrique du milieu de culture. En effet la mesure de la conductivité au cours d'une fermentation renseigne directement sur la concentration en lactate de sodium. Par conséquent la conductivité est utile pour suivre l'avancement d'une fermentation et pour préciser le moment d'arrêt de la fermentation, au même titre que la consommation de la soude (Latille et *al.*, 1992).

Deux mesures sont suivies au cours de la fermentation: le poids de la soude utilisée et la conductivité. Le premier paramètre (m_{NaOH} , en g) est mesuré sur une balance électrique. Les données sont enregistrées sur ordinateur en temps réel, grâce aux logiciels Wcunac-Indus et PPouf (INRA, Grignon). Le deuxième paramètre (conduct., en mS) évolue en fonction de la concentration en lactate de sodium. 6 descripteurs sont mesurés:

$V_{m\text{NaOH}}$: vitesse maximale de consommation de soude (g/min).

t_{mNaOH} : temps pour atteindre V_{mNaOH} (min).

d_{NaOH} : consommation de soude correspondant à V_{mNaOH} (g).

$V_{mConduct}$: vitesse maximale de variation de conductivité (en mS/min).

$t_{mConduct}$: temps pour atteindre $V_{mConduct}$ (min).

$d_{Conduct}$: variation de conductivité à $V_{mConduct}$ (mS).

Trois conditions standards de fermentation à 37°C sont réalisées; respectivement à pH 6,5, à pH 5,5 et à pH 5,0. L'arrêt de la fermentation est déterminé à partir des courbes d'évolution des vitesses de variation du poids de NaOH et de la conductivité électrique. La fermentation est stoppée à $t_{mNaOH} + 3h$, c'est-à-dire après la fin de la phase exponentielle de croissance, et lorsque la vitesse de consommation de soude (V_{mNaOH}) et la vitesse de conductivité électrique ($V_{mConduct}$) atteignent leur valeurs maximales.

A la fin de la fermentation, un refroidissement du fermenteur est effectué à pH réglé, en plaçant le fermenteur dans un seau contenant de l'eau glacée pendant 30 min jusqu'à ce que la température du milieu descende à 15°C. Le milieu fermenté est ensuite transféré stérilement dans des pots de centrifugation (Fig. 5 a et b). Une centrifugation est ainsi réalisée à 10 000g pendant 30 min. Le surnageant brut actif est récupéré stérilement pour l'étude de l'activité de la bactériocine. Les culots (biomasse) sont récupérés préalablement pesés, puis dilués 3 fois avec du surnageant brut actif (1 poids du culot + 3 poids du surnageant). Les mélanges sont alors répartis à raison de 500 μ L dans des cryotubes. Les échantillons sont congelés à -20°C et stockés pendant quelques semaines. Ces échantillons serviront pour la mesure de l'activité acidifiante, avant congélation (j0), 24h après congélation (j1), 7 jours (j7), 14 jours (j14), 21 jours (j21) et 28 jours après le stockage (j28). Avant la mesure de l'activité acidifiante les échantillons sont décongelés dans le bain marie à 30°C pendant 10 min.



Fig. 5 (a et b): Technique de refroidissement du fermenteur et de la collecte de la culture (photo. originale)

2.9. Cinétique d'acidification (CINAC)

Le suivi de la cinétique d'acidification de la bactérie, développé à l'INRA de Paris, permet l'acquisition et l'exploitation en temps réel du nombre de mesures de pH et des vitesses d'acidification (dpH/dt) et l'établissement des cinétiques d'acidification correspondantes. Le système CINAC a été inventé par Corrieu et *al.* (1988) dans le but de caractériser l'activité acidifiante des souches lactiques. Grâce à ce système les pertes d'activité acidifiante de chaque espèce peuvent être quantifiées (Béal et *al.*, 2000; Fonseca et *al.*, 2000 et 2001; Monnet et *al.*, 2003).

2.9.1. Principe du système

Le principe de ce système est de mesurer le pH en continu de plusieurs échantillons de lait ensemencés dans des conditions standards et simultanément. Plusieurs descripteurs sont calculés

- Vm: Vitesse maximale d'acidification Vm (upH/min).
- tm: temps nécessaire pour atteindre Vm (min).
- pHm: le pH correspondant à Vm.
- tpHi: le temps nécessaire pour atteindre un pH donné (min) (exemple pH_i= 5,5).

Le système CINAC est constitué de 4 parties fonctionnelles (Fig. 6 et 7):

- un grand bain marie thermostaté,
- 15 sondes de pH (Ingold)
- 2 sondes de température (Prosensor, Amanvillers, France).
- une interface électronique constituée de quatre cartes, soit une carte analogique constituée de 28 transmetteurs, les trois autres cartes étant de type numérique permettant la conversion numérique et analogique des données. Un ordinateur relié à l'interface et fonctionnant avec le logiciel WCinac.

Le logiciel WCinac permet l'étalonnage des sondes de pH en deux points, la régularisation de la température du bain marie, l'acquisition et le stockage des données, le calcul en temps réel et la représentation graphique des vitesses d'acidification et des descripteurs (Béal et *al.*, 1997 et 2001; Fonseca et *al.*, 2000 et 2001; Monnet et *al.*, 2003).

2.9.2. Protocole expérimental

Le milieu de culture utilisé pour la mesure de l'activité acidifiante se compose de lait écrémé (Elle et Vire, Condé-sur-Vire, France, Epi ingrédient, Ancenis, France) reconstitué avec de l'eau osmosée à raison de 100g/L. Une fois le lait homogénéisé, il est distribué dans des Erlenmeyers à raison de 150 mL puis couverts de bouchon Cinac et du papier aluminium. Le lait est pasteurisé à 110°C pendant 20 min, puis refroidi et stocké à 4°C pendant 18h avant son utilisation.

Les fioles de lait sont inoculées avec 100 µL de suspensions cellulaires à tester. Ces dernières sont décongelées dans un bain marie à 30°C pendant 10 min. toutes les mesures sont triplées. Le descripteur d'acidification retenu est tp_{5,5}. L'acquisition des données est réalisée toutes les cinq minutes pendant 24h, jusqu'à atteindre un pH inférieur ou égal à 5.

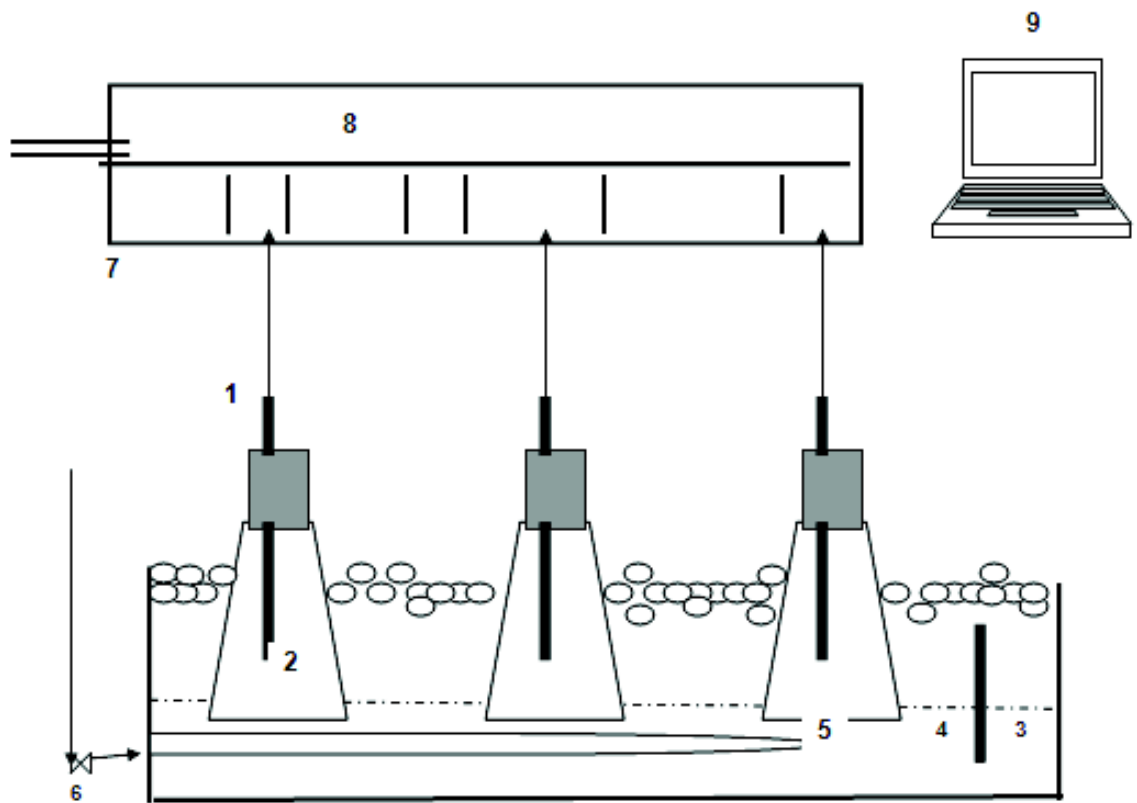


Fig. 6: Schéma simplifié du dispositif CINAC (Corrieu et al ., 1988)

1. Electrode de pH
2. Fioles Erlenmeyer contenant du laitensemencé
3. Bain marie thermostaté
4. Sonde de température
5. Résistance chauffante
6. Electrovanne d'admission d'eau froide
7. Transmetteur de pH et de température
8. Interface électronique
9. Micro-ordinateur

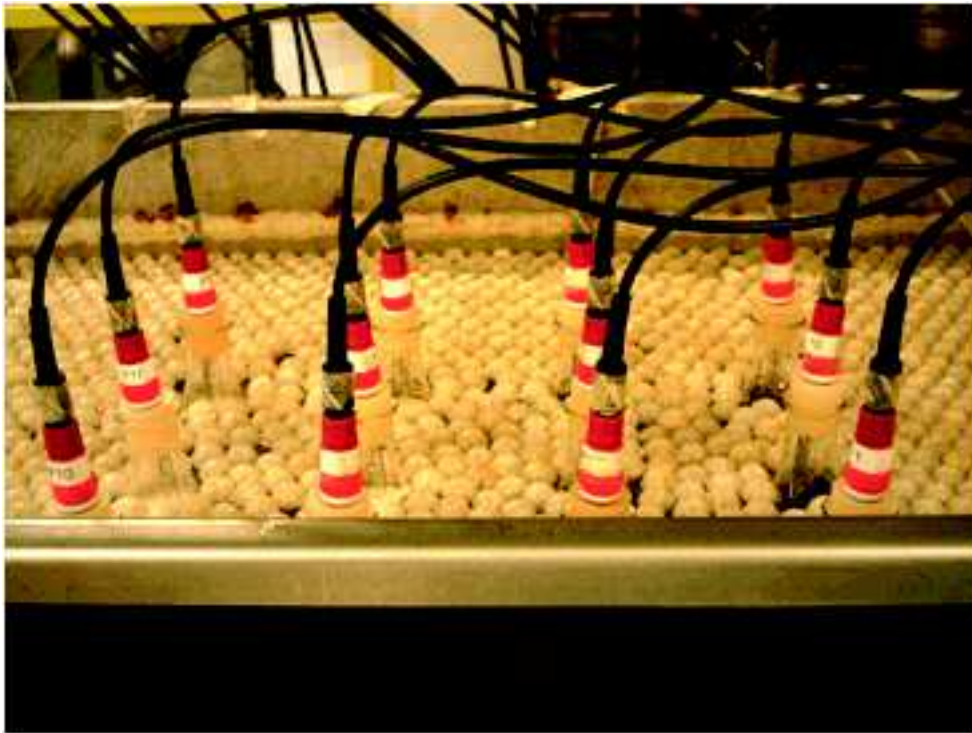


Fig. 7: Bain marie et sondes de pH plongées dans les fioles de lait (photo. originale)

2.10. Effet de la congélation et de la durée du stockage sur l'activité acidifiante

Dans le but de quantifier la perte d'activité acidifiante de la souche lactique sélectionnée après l'étape de congélation et au cours du stockage à -20°C , l'activité acidifiante de cette espèce a été mesurée. Le principe consiste à déterminer grâce au système CINAC le temps nécessaire pour atteindre la vitesse maximale d'acidification. La décongélation est une étape primordiale pour protéger les cellules bactériennes. Elle s'effectue par immersion des cryotubes dans un bain marie à 30°C pendant 10 min.

Chapitre III: Résultats et discussion

1. Isolement et identification des espèces d'intérêt

1.1. Les lactobacilles

Des isolats appartenant à la famille des lactobacilles ont été isolés à partir d'un lait caillé de vache. Les colonies du genre *Lactobacillus* cultivées sur gélose MRS apparaissent sous forme ronde de couleur blanchâtre ayant un aspect crémeux lisse ou rugueux à contours irréguliers. L'aspect microscopique après coloration de Gram révèle la présence de cellules sous la forme de bâtonnets. Les résultats des tests effectués sont les suivants: Gram +, catalase -. Les résultats de la galerie API 20 A relatifs aux tests biochimiques (tableau 5 en annexes) indiquent qu'il s'agirait bien de l'espèce *Lactobacillus acidophilus*. Dans la présente étude 13 souches appartenant à l'espèce *Lactobacillus acidophilus* ont été isolées à partir d'un lait de vache coagulé spontanément. Il est à noter que notre recherche était orientée vers la sélection de l'espèce *Lactobacillus acidophilus*.

1.2. Les bifidobactéries

Plusieurs espèces appartenant à de la famille des bifidobactéries ont été isolées à partir des selles de nourrissons âgés d'un mois allaités exclusivement au sein de l'hôpital de Ben Boulaïd de Blida. Les colonies du genre *Bifidobacterium* cultivées sur gélose MRS cystéiné apparaissent sous une forme de colonie ronde lenticulaire. L'aspect microscopique après coloration de Gram révèle la présence de cellules sous la forme de bâtonnets bifurqués. Les résultats des tests effectués sont les suivants: Gram +, catalase -. Les résultats de la galerie API 20 A relatifs aux tests biochimiques (tableau 6 en annexes) nous rapprochent des espèces *Bifidobacterium bifidum* (6 souches), *Bifidobacterium longum* (7 souches), *Bifidobacterium infantis* (7 souches), *Bifidobacterium adolescentis* (4 souches), et *Bifidobacterium breve* (5 souches).

1.3. Les streptocoques

Les streptocoques ont été isolés à partir du lait cru de vache de la région de Blida. Les colonies du genre *Streptococcus* cultivées sur gélose M17 apparaissent sous une forme de colonie ronde, blanche, bien visible de 2 à 3 mm de diamètre. Elles se présentent sous une forme allongée à contours réguliers ou sous forme arrondie à contours flous. Après coloration de Gram, les cellules se présentent sous forme de diplocoques ou de cocci en chaînettes plus ou moins longues. Les résultats de la galerie API 20 A relatifs aux tests biochimiques sont représentés au niveau du tableau 7 (annexes). Il s'agirait bien de l'espèce *Streptococcus thermophilus* (10 souches isolées) expressément sélectionnée.

2. Criblage des souches bactériocinogènes

Le criblage des souches isolées permet de sélectionner des souches productrices de bactériocines. Le criblage de souches lactiques testées à l'égard de germes pathogènes a été étudié après avoir éliminé l'effet inhibiteur du H₂O₂ par action de la catalase, et l'effet des acides par neutralisation du pH du milieu. La figure 8 montre un exemple de zones d'inhibition des 3 espèces lactiques (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* et *Bifidobacterium infantis*) productrices de substances inhibitrices dont le diamètre d'inhibition (Zi) est supérieur ou égal à 2 mm. La méthode utilisée est celle de diffusion des puits (Thompson et al., 1996). Le tableau 8 présente l'effet antagoniste des 52 souches sélectionnées à l'égard de 4 espèces pathogènes (*Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*). Les bactéries lactiques considérées présentent une activité inhibitrice variable vis à vis des germes pathogènes. Les souches appartenant à l'espèce *Lb. acidophilus* présentent l'activité antimicrobienne la plus importante envers *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium* et *Listeria monocytogenes*. Par contre l'espèce *Bf. infantis* montre une activité inhibitrice considérable envers *Staphylococcus aureus*.

Le spectre d'activité d'une bactériocine se définit comme étant la diversité des bactéries sensibles à l'action bactéricide ou bactériostatique du peptide. On a d'abord attribué aux bactériocines un spectre d'activité limité aux bactéries taxonomiquement proches de la bactérie productrice (Tagg et al., 1976). D'après nos résultats la plupart des souches lactiques isolées possèdent un large spectre d'activité qui inclut des bactéries éloignées au point de vue phylogénétique.

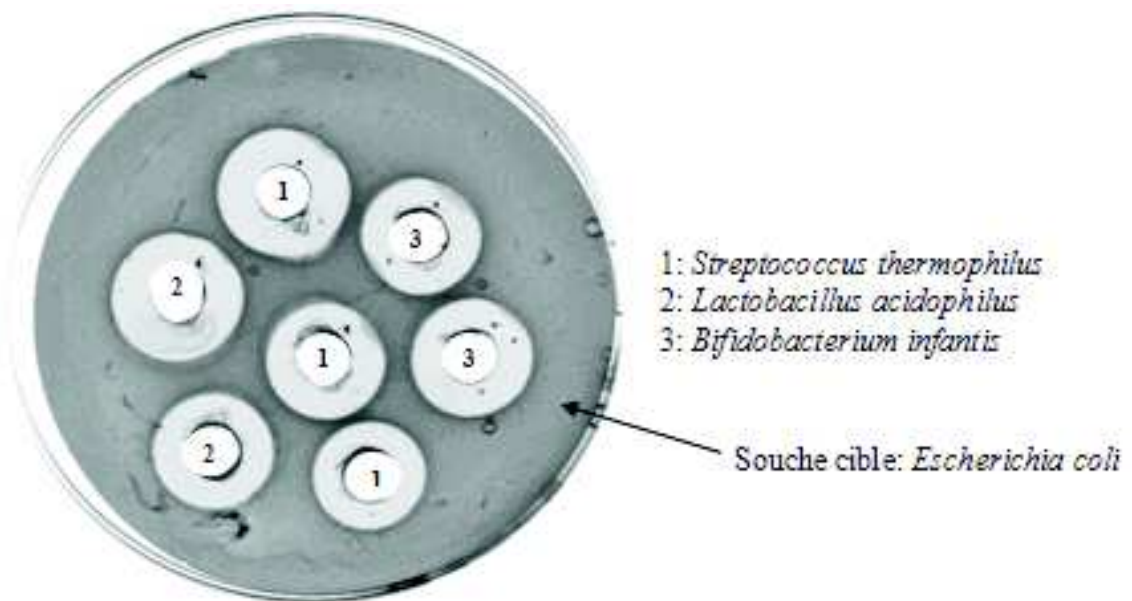


Fig. 8: Criblage des souches lactiques productrices de bactériocines par la méthode de diffusion en milieu solide à l'égard d'*Escherichia coli*

Tableau 8: Criblage des souches lactiques à l'égard de germes pathogènes (moyenne de 3 essais; diamètre d'inhibition en mm).

Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones isolées

Souches	<i>E. coli</i>	<i>S. thyphimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Bf. adolescentis</i> 1	0,67	05,33	03,33	01,00
<i>Bf. adolescentis</i> 2	11,00	07,67	18,00	21,00
<i>Bf. adolescentis</i> 3	12,00	10,33	03,67	17,00
<i>Bf. adolescentis</i> 4	22,67	18,00	01,33	20,67
<i>Bf. bifidum</i> 1	02,00	07,33	10,00	01,33
<i>Bf. bifidum</i> 2	05,33	07,67	10,00	12,33
<i>Bf. bifidum</i> 3	07,33	07,67	04,67	00,00
<i>Bf. bifidum</i> 4	07,00	12,00	03,00	00,00
<i>Bf. bifidum</i> 5	11,67	11,67	02,67	07,33
<i>Bf. bifidum</i> 6	12,33	22,33	23,67	06,67
<i>Bf. infantis</i> 1	21,67	22,67	13,33	15,67
<i>Bf. infantis</i> 2	14,67	18,67	19,67	21,33
<i>Bf. infantis</i> 3	22,33	22,67	12,67	16,33
<i>Bf. infantis</i> 4	17,67	18,67	24,00	17,67
<i>Bf. infantis</i> 5	24,00	15,33	15,67	21,67
<i>Bf. infantis</i> 6	13,00	11,00	22,00	24,67
<i>Bf. infantis</i> 7	07,00	00,67	04,00	08,00
<i>Bf. longum</i> 1	00,67	03,67	02,33	00,00
<i>Bf. longum</i> 2	00,00	12,00	04,33	12,33
<i>Bf. longum</i> 3	01,33	13,00	01,00	01,33
<i>Bf. longum</i> 4	00,00	19,33	09,33	01,33
<i>Bf. longum</i> 5	00,00	17,33	06,67	00,00
<i>Bf. longum</i> 6	00,00	06,00	08,67	13,33
<i>Bf. longum</i> 7	00,00	09,33	10,00	09,33
<i>Bf. breve</i> 1	12,33	10,67	10,33	01,33
<i>Bf. breve</i> 2	14,33	04,00	12,67	04,33
<i>Bf. breve</i> 3	18,00	09,33	09,33	06,00
<i>Bf. breve</i> 4	12,67	05,33	10,33	09,33
<i>Bf. breve</i> 5	18,00	07,67	15,33	00,67
<i>Sc. thermophilus</i> 1	04,00	00,00	21,33	10,00
<i>Sc. thermophilus</i> 2	03,00	00,67	15,67	13,33
<i>Sc. thermophilus</i> 3	04,00	00,00	20,33	08,00
<i>Sc. thermophilus</i> 4	02,67	02,00	23,67	10,00
<i>Sc. thermophilus</i> 5	09,33	03,67	11,00	14,33
<i>Sc. thermophilus</i> 6	06,33	00,00	25,00	09,00
<i>Sc. thermophilus</i> 7	04,67	06,00	25,67	23,00
<i>Sc. thermophilus</i> 8	06,67	00,00	15,67	18,67
<i>Sc. thermophilus</i> 9	02,00	08,00	14,00	14,33
<i>Sc. thermophilus</i> 10	09,00	00,00	18,33	10,00
<i>Lb. acidophilus</i> 1	30,00	20,33	34,00	00,00
<i>Lb. acidophilus</i> 2	24,33	09,00	24,67	00,67
<i>Lb. acidophilus</i> 3	29,67	11,00	19,67	02,67
<i>Lb. acidophilus</i> 4	25,33	09,67	29,67	00,00
<i>Lb. acidophilus</i> 5	30,00	14,33	21,00	05,67
<i>Lb. acidophilus</i> 6	29,67	24,00	34,00	00,00
<i>Lb. acidophilus</i> 7	24,33	14,33	15,33	02,00
<i>Lb. acidophilus</i> 8	12,33	00,67	14,00	00,00
<i>Lb. acidophilus</i> 9	09,33	10,00	09,00	00,00
<i>Lb. acidophilus</i> 10	05,67	00,00	0,67	00,00
<i>Lb. acidophilus</i> 11	31,00	11,33	06,00	00,00
<i>Lb. acidophilus</i> 12	10,00	20,67	14,67	00,00
<i>Lb. acidophilus</i> 13	14,33	28,00	10,33	10,00

Une première sélection des souches est effectuée sur la base de l'activité antimicrobienne. Les trois meilleures souches pour chaque espèce ont été retenues soit *Bf. adolescentis* 2, *Bf. adolescentis* 3, *Bf. adolescentis* 4, *Bf. bifidum* 4, *Bf. bifidum* 5, *Bf. bifidum* 6, *Bf. infantis* 1, *Bf. infantis* 3, *Bf. infantis* 5, *Bf. longum* 2, *Bf. longum* 4, *Bf. longum* 5, *Bf. breve* 2, *Bf. breve* 3, *Bf. breve* 5, *Sc. thermophilus* 3, *Sc. thermophilus* 6, *Sc. thermophilus* 7, *Lb. acidophilus* 1, *Lb. acidophilus* 6 et *Lb. acidophilus* 11. Une deuxième sélection des 21 souches sera réalisée sur la base de deux paramètres technologiques: le pouvoir acidifiant et la cinétique de la croissance.

3. Activité métabolique des souches lactiques sélectionnées

L'activité métabolique concerne le suivi du pH et de la croissance bactérienne. Une caractérisation du pouvoir acidifiant des 21 souches sélectionnées est réalisée sur du lait écrémé reconstitué. Le suivi du pH est réalisé toutes les 2 heures pendant 8h et après 24h d'incubation. Les résultats du suivi du pH et de la croissance bactérienne sont présentés au niveau des tableaux 9 et 10 (en annexe). Le tableau 11 indique les variations de ces paramètres en 8 heures de culture.

Souches	Δ pH	V pH	G	μ
<i>Bf. adolescentis</i> 2	1,30	2,71	57,60	0,017
<i>Bf. adolescentis</i> 3	1,26	2,63	90,00	0,011
<i>Bf. adolescentis</i> 4	1,15	2,40	80,00	0,012
<i>Bf. bifidum</i> 4	1,34	2,79	68,25	0,014
<i>Bf. bifidum</i> 5	1,17	2,44	94,12	0,010
<i>Bf. bifidum</i> 6	1,12	2,33	94,12	0,010
<i>Bf. infantis</i> 1	1,15	2,40	130,91	0,007
<i>Bf. infantis</i> 3	1,24	2,58	75,79	0,013
<i>Bf. infantis</i> 5	1,00	2,08	104,35	0,009
<i>Bf. longum</i> 2	1,16	2,42	112,50	0,008
<i>Bf. longum</i> 4	1,16	2,42	73,10	0,013
<i>Bf. longum</i> 5	1,12	2,33	87,80	0,011
<i>Bf. breve</i> 2	1,01	2,10	84,71	0,011
<i>Bf. breve</i> 3	1,08	2,25	80,00	0,012
<i>Bf. breve</i> 5	1,13	2,35	84,71	0,011
<i>Sc. thermophilus</i> 3	0,90	1,88	96,00	0,010
<i>Sc. thermophilus</i> 6	0,90	1,88	80,00	0,012
<i>Sc. thermophilus</i> 7	0,68	1,42	79,56	0,012
<i>Lb. acidophilus</i> 1	0,86	1,79	80,00	0,012
<i>Lb. acidophilus</i> 6	1,56	3,25	80,90	0,012
<i>Lb. acidophilus</i> 11	1,80	3,75	88,89	0,011

Δ pH: pH initial – pH final

V pH: vitesse d'acidification (en mU pH/min) Δ pH/ Δ T

G = T . Log 2/ (Log N_f – Log N_i) (min)

$\mu = 1 / G$ (h⁻¹)

Log N_f: logarithme du nombre des UFC obtenu au temps final (T_g)

Log N_i: logarithme du nombre des UFC obtenu au temps initial (T₀)

Tableau 11: Calculs des variations de pH, des vitesses d'acidification (V pH), du temps de génération (G) et du taux de croissance (μ) des cultures des bactéries lactiques sélectionnées

Log N_f : logarithme du nombre des UFC obtenu au temps final (T_g)

Log N_i : logarithme du nombre des UFC obtenu au temps initial (T₀)

Parmi les 21 souches, *Lb. acidophilus* 11 montre la meilleure vitesse d'acidification soit 3,75 mU pH/min. Mais, le calcul des paramètres de croissance, temps de génération (G) et taux de croissance (μ), semble en faveur de la souche *Bf. adolescentis* 2.

Dans la présente étude, notre premier critère de choix est porté sur les souches lactiques d'intérêt technologique. Nous avons alors retenu la souche *Lb. acidophilus* 11 au vu de ses pouvoirs acidifiant et antimicrobien intéressants, pour la réalisation des étapes suivantes.

Il est cependant important de souligner que plusieurs auteurs ont signalé *Lb. acidophilus* comme une espèce d'intérêt dans la lutte préventive et thérapeutique des

diarrhées. Ainsi, et à titre d'exemple, Foster et al. (2003) ont étudié l'effet antagoniste *in vivo* de quatre espèces lactiques, *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. reuteri*, *Bifidobacterium breve* et *Bf. longum* à l'égard d'un parasite protozoaire *Cryptosporidium parvum*, agent causal de la diarrhée. *Lactobacillus* inhibe la croissance de la souche cible à 81%, tandis que le taux d'inhibition de la souche cible par *Bifidobacterium* n'est que de 10 à 37 %.

4. Evolution de la croissance, du pH et de l'activité antimicrobienne de la souche *Lb. acidophilus* 11

L'activité bactériocinogénèse est recherchée dans le surnageant brut et dans les cellules après centrifugation de la culture de *Lb. acidophilus* 11. Les résultats de la recherche de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu solide ont montré une absence totale d'une activité antimicrobienne dans les extraits cellulaires.

L'évolution de la croissance et de la production de la bactériocine par *Lb. acidophilus* 11 en fonction du pH est présentée sur la figure 9 et du tableau 12 (en annexe). Le test de l'activité antimicrobienne est réalisé sur *Lb. bulgaricus* 340.

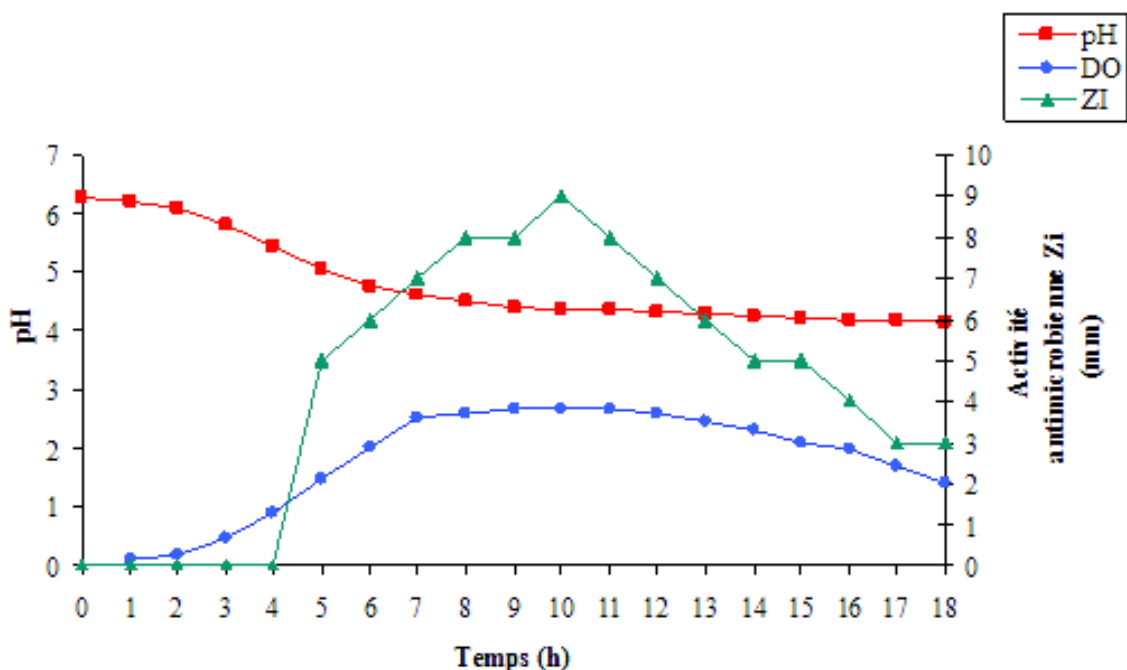


Fig. 9: Cinétiques de croissance, de pH et d'activité antimicrobienne de *Lb. acidophilus* 11

ZI: diamètre de la zone d'inhibition en mm [Zi = diamètre de la zone d'inhibition obtenu – diamètre de puits (6mm)]

DO: densité optique à 600 nm

Nos résultats montrent que l'activité antimicrobienne augmente en fonction du temps d'incubation. La sécrétion de bactériocine commence pendant la phase exponentielle de la croissance soit après 5 heures d'incubation. Une production maximale de bactériocine est notée en 10 heures d'incubation. Cette activité commence à diminuer après 14h

d'incubation. Cette diminution peut être expliquée par l'accumulation d'acides organiques et l'appauvrissement du milieu défavorisant ainsi la croissance bactérienne.

Zamfir et al. (2000) ont réalisé un suivi parallèle de la fermentation de *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 et de la production de bactériocine à pH non contrôlé sur bouillon MRS additionné de glucose. Ces auteurs ont montré que la production de cette bactériocine est maximale à la fin de la phase exponentielle de croissance et diminue pendant la phase stationnaire. *Lb. helveticus* 102 est utilisée comme souche cible pour tester l'activité inhibitrice de *Lb. acidophilus* IBB 801. Il existe donc une relation étroite entre la production de bactériocine et la croissance bactérienne. Les résultats de la présente étude se rapprochent de ceux de Zamfir et al. (2000).

5. Détermination de la dilution critique de la bactériocine dans le surnageant brut actif

Le but de cette méthode est de déterminer la plus faible concentration en bactériocine capable de provoquer une inhibition complète de la croissance de la bactérie cible (*Lb. bulgaricus* 340).

5.1. Mesure de l'absorbance des cultures de *Lb. bulgaricus* 340

La souche *Lb. bulgaricus* 340 est utilisée comme souche cible à cause de sa forte sensibilité à la bactériocine issue de *Lb. acidophilus* 11. L'intérêt de ce suivi est de déterminer la dilution de la culture qui permet l'obtention d'une DO de 0,80 correspondant à une biomasse de 10^{10} UFC/mL après 24 h d'incubation.

La mesure de l'absorbance de la souche cible *Lb. bulgaricus* 340 à différentes concentrations cellulaires est mentionnée au niveau du tableau 13. D'après ces résultats, la culture diluée à 10^{-2} permet d'obtenir une DO de 0,80 au bout de 24h, ce qui représente une bonne charge microbienne viable. Cette dernière est utilisée pour le suivi de l'activité antimicrobienne en présence de différentes concentrations en bactériocine.

Tableau 13: Mesure de l'absorbance des cultures diluées de *Lb. bulgaricus* 340 au bout de 24h

Cultures de <i>Lb. bulgaricus</i> 340 diluées	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Absorbance	1,205	0,805	0,555	0,370

5.2. Détermination de la dilution critique pour les différents pH de fermentation

La culture de la souche cible *Lb. bulgaricus* 340 préalablement préparée servira à l'étude de la dilution critique. Le surnageant brut actif contenant la bactériocine est récupéré à partir de fermentations réalisées à différents pH régulés. Il s'agit donc de suivre la croissance de la souche cible sur milieu MRS en présence de différentes concentrations en bactériocines par la mesure de la turbidimétrie à 660 nm dans le but de déterminer la dilution critique de la

bactériocine, dilution inhibant totalement la croissance de *Lb. bulgaricus* 340. Cette dilution correspond à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

En parallèle l'activité antimicrobienne de la bactériocine est testée par la méthode de diffusion sur gel. Les résultats de l'activité antimicrobienne de la bactériocine issue de la fermentation de *Lb. acidophilus* 11 à pH régulés à 6,5, 5,5 et 5 à l'égard de *Lb. bulgaricus* 340 sont représentés au niveau des tableaux 14, 15 et 16 (en annexe) et des figures 10, 11 et 12.

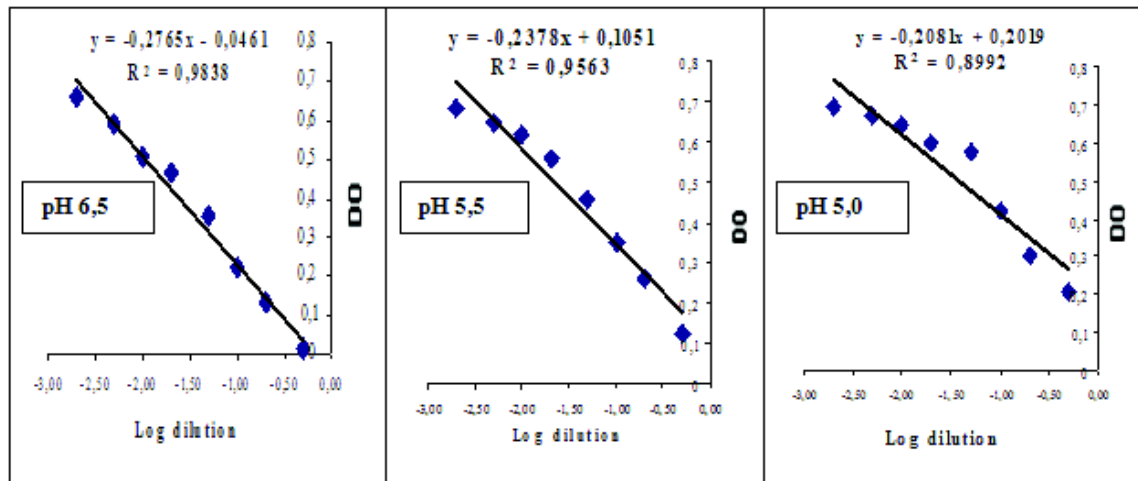


Fig. 10, 11 et 12: Détermination de la dilution critique du SBA pour les différents pH régulés de fermentation (6,5, 5,5 et 5,0)

D'après les équations de corrélations (Y correspond à l'absorbance et X correspond au Log de la dilution)

A pH 6,5 $Y = -0,2765x - 0,0461$,

Abs = $-0,2765 \log (\text{Dil}) - 0,0461$).

Dilution critique (Dil) = 0,68 pour Abs = 0

A pH 5,5 $Y = -0,2378x + 0,1051$,

Abs = $-0,2378 \text{ Log} (\text{Dil}) + 0,1051$

Dil = 2,77 pour Abs = 0

A pH 5,0 $Y = -0,2081x + 0,2019$,

Abs = $-0,2081 \log (\text{Dil}) + 0,2019$

Dil = 9,34 pour Abs = 0

D'autre part, le test de l'activité antimicrobienne de la bactériocine par la méthode de diffusion sur gel a donné des diamètres de la zone d'inhibition par le SBA non dilué de 18, 17 et 14 mm respectivement pour le SBA issu de la fermentation à pH 6,5, 5,5 et 5,0. En revanche, aucune inhibition n'est observée pour les dilutions respectives de 0,002, 0,005 et 0,02.

La courbe de corrélation entre la dilution et la concentration en bactériocine (représentée par le SBA) (Fig. 13, en annexe) permet de tirer les concentrations minimales inhibitrices en SBA qui correspondent aux dilutions critiques.

Ainsi, dans les conditions de fermentation à pH contrôlé 6,5, la valeur de la CMI est la plus basse, ce qui laisse supposer une plus grande production de bactériocine (Tab.

17). Par contre dans les conditions de fermentation à pH contrôlé 5,5 ou 5,0 il y aurait moins de production de bactériocine et par conséquent la valeur de la dilution critique de la bactériocine pour une absorbance nulle de *Lb. bulgaricus* 340 est égale à une valeur plus élevée soit respectivement de 2,77 et 9,34.

Tableau 17: Détermination de la concentration du surnageant brut actif correspondant aux dilutions critiques (concentration minimale inhibitrice CMI)

pH de fermentation	Dilution critique	CMI = volume SBA/Volume total
6,5	0,68	0,62
5,5	2,77	2,52
5,0	9,34	8,49

Volume total (5 mL) = (Volume SBA + Volume P1 (500 µL) + Volume MRS)

P1: culture de la souche cible *Lb. bulgaricus* 340.

Les résultats de la présente étude montrent que le pH optimal pour la production de bactériocine par *Lb. acidophilus* 11 est de l'ordre de 6,5. Ce résultat est en accord avec la littérature qui indique que cette espèce présente un pH optimal de 6,0 pour la production de bactériocine (Bogovic-Matijasic et Rogel, 1998; Gomes et Malcata, 1999). De même, d'après Fernandez-Murga et al. (2000) un effet favorable sur la production de bactériocine par *Lb. acidophilus* est mis en évidence à pH 6,0, qui présente une augmentation de la production de bactériocine deux fois supérieure à celle obtenue à pH 5,0, et quatre fois supérieure à celle obtenue à pH 4,5.

6. Spectre antimicrobien de la bactériocine produite par *Lb. acidophilus* 11 envers des bactéries Gram positive et Gram négative

Le but de cette étape est de déterminer le type du spectre d'activité de *Lb. acidophilus* 11 (spectre d'activité étroit ou large).

Deux espèces de bifidobactéries sont inhibées par cette bactériocine soit *Bifidobacterium infantis* et *Bifidobacterium breve* (Tab. 18). Par contre elle ne présente aucune activité vis-à-vis *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus helveticus*.

Quelques espèces pathogènes Gram+ telles que *Campylobacter jejuni*, et *Bacillus subtilis* sont également inhibées. Par contre aucun effet envers *Staphylococcus aureus*. Elle inhibe aussi quelques espèces pathogènes Gram- telles que, *Escherichia coli* (EPEC) et *Salmonella thyphimurium* mais ne présente aucune activité antagoniste vis à vis *Yersinia enterocolitica*. On peut donc considérer que la bactériocine produite par *Lb. acidophilus* 11 présente un spectre d'activité large.

D'après Barefoot et al. (1983) la lactacine B issue de *Lb. acidophilus* N2 inhibe cinq bactéries lactiques à l'exclusion de toute autre espèce Gram+ ou Gram -: *Lb. delbrueckii* subsp *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp *lactis* ATCC 4797, *Lb. delbrueckii* subsp *lactis* NCDO 970, *Lb. delbrueckii* subsp *bulgaricus* NCDO 1489 et *Lb. helveticus* NCDO 87.

Muriana et Klaenhammer (1987) et Barefoot et al. (1994), ont observé une activité de *Lactobacillus acidophilus* envers *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Enterococcus*. Lewus et al. (1991) avaient détecté, dans un milieu de culture, une action inhibitrice de *Lb. acidophilus* N2 sur quatre souches de *L. monocytogenes*. De même, Kanatani et al. (1992), ont observé que *Lactobacillus acidophilus* présentait une activité antimicrobienne à l'égard de *Listeria*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* et *Propionibacterium*. D'autres auteurs ont étudié l'antagonisme *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* envers *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* et *Salmonella typhimurium* (Coconnier et al., 1998).

Tableau 18: Spectre antimicrobien de la bactériocine produite par *Lb. acidophilus* 11 envers des bactéries Gram positive et Gram négative

Bactérie	Diamètre d'inhibition Zi (mm)
Gram positive <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> 340 <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Bacillus subtilis</i>	0 10 13 12 17 00 00 06 00 18 12 31 11 00
Gram négative <i>Escherichia coli</i> (EPEC) <i>Salmonella thyphimurium</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	

7. Purification de la bactériocine

Le surnageant brut actif obtenu subit plusieurs étapes de purification. La bactériocine produite par *Lb. acidophilus* 11 a été purifiée comme suit:

- Une étape initiale pour la purification de la bactériocine est réalisée par la précipitation des protéines du surnageant brut actif au sulfate d'ammonium: les fractions précipitées au sulfate d'ammonium subissent une perte d'activité. D'où la nécessité d'initier la purification à partir du surnageant brut actif sans précipitation de ses protéines. La précipitation au sulfate d'ammonium a été un moyen souvent utilisé lors de la purification des bactériocines. Cependant, ces dernières ne sont pas récupérées totalement par cette méthode (Davey et Richardson, 1981; Holo et al., 1991). Il a été démontré que le sulfate d'ammonium dissocie les bactériocines en sous-unités actives et modifie la conformation de la molécule ce qui peut provoquer parfois une amplification anormale de l'activité biologique (Kashket, 1987).
- Passage du surnageant brut actif en chromatographie à échangeur de cations avec une élution de la bactériocine par palier (0,1, 0,3 et 1M en NaCl), la bactériocine s'adsorbe à la résine et elle est désorbée à une certaine concentration en NaCl, ce qui permet de la séparer des protéines se désorbant à des concentrations différentes en sel. A ce stade de purification l'activité antimicrobienne a été observée dans la fraction élue à 1M en NaCl (Fig. 14). Ceci suggère que la substance inhibitrice est probablement de nature cationique.

- Passage de la fraction active précédente en chromatographie en phase inversée: les fractions actives sont éluées entre 32 et 48% d'acétonitrile (Fig. 15 a et b). La méthode de chromatographie en phase inversée a été une méthode de choix pour séparer les molécules hydrophobes. Elle permet une bonne purification de diverses bactériocines (Mulders et al., 1991), la leucocine A-UAL (Hasting et al., 1991), la lactocine (Mortvedt et al., 1991) et la sakacine A (Holck et al., 1992).
- Les fractions actives sont éluées entre 32 et 48% d'acétonitrile, lyophilisées puis reprises dans 100 µL d'eau distillée pour un passage en chromatographie en phase inversée analytique (HPLC). Le profil chromatographique de la fraction active révèle 4 pics (Fig. 16 a et b). Le test de l'activité inhibitrice montre que le 4^{ème} pic est actif. Ce dernier est ensuite étudié par spectrométrie de masse. L'analyse en spectrométrie de masse par ionisation electrospray de la fraction active a permis de déterminer la masse du peptide correspondant à 5218 Da (Fig. 17).

Pour chaque étape, le volume, l'activité totale de la bactériocine ainsi que le rendement en activité sont déterminés (Tab. 19).

En conclusion le composé antimicrobien issu de la souche *Lb. acidophilus* 11 est produit en bouillon MRS. Sa purification est possible par différentes étapes de chromatographie. Sa caractérisation préliminaire montre que la partie biologiquement active est une protéine cationique à caractère hydrophobe.

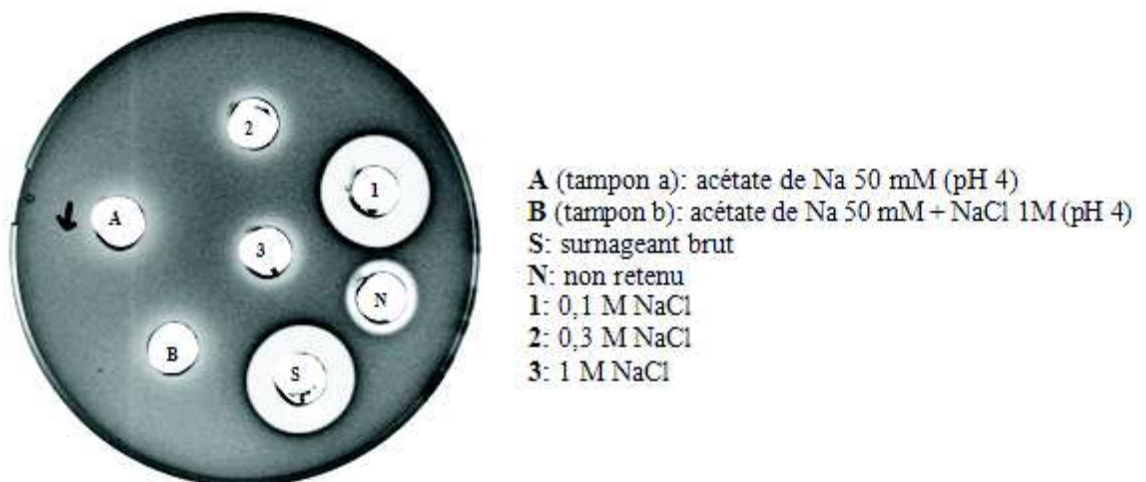


Fig. 14: Test de l'activité antimicrobienne des fractions actives éluées après passage du SBA en chromatographie à échangeur de cations (photo. originale)

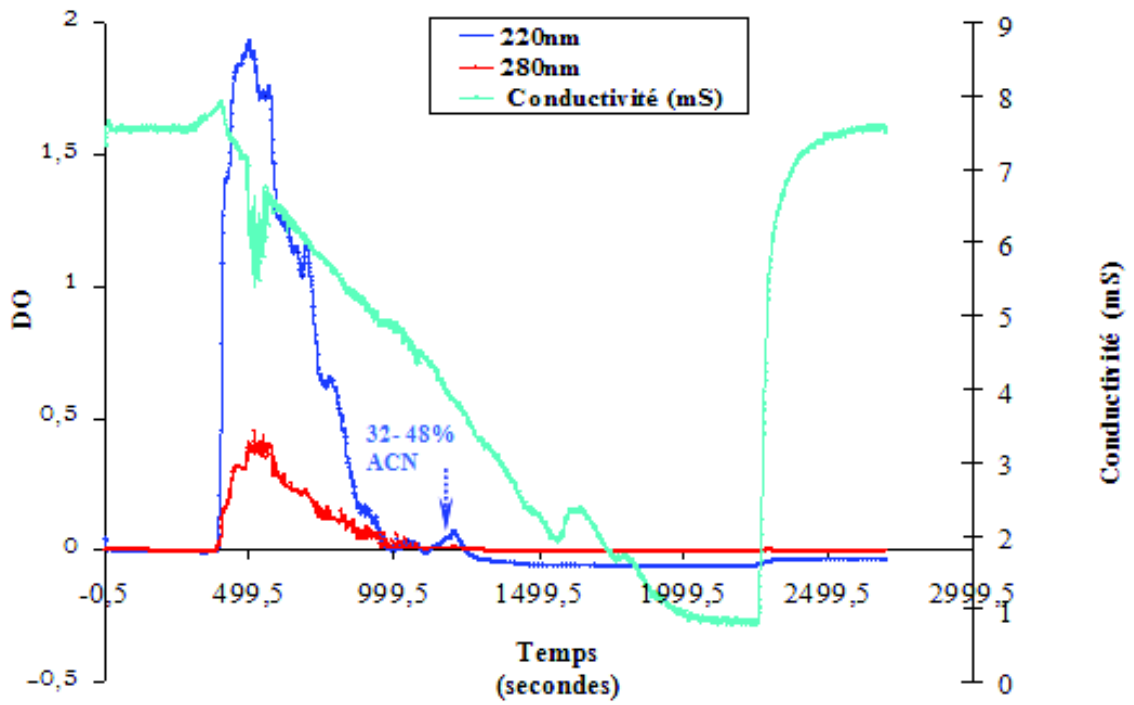
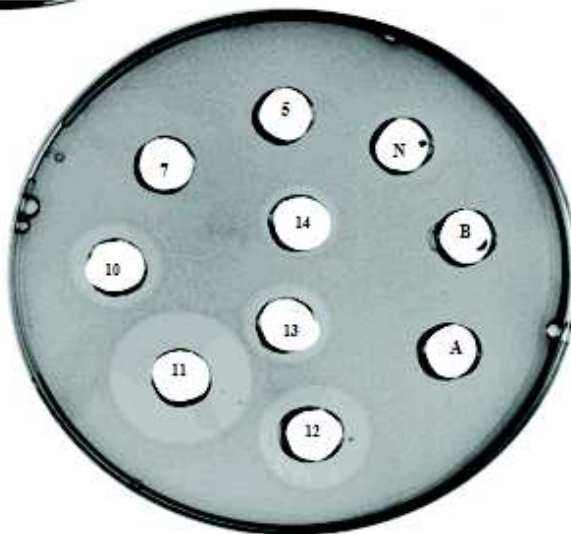


Fig. 15 (a): Chromatographie en phase inversée de la fraction active 1M



A (tampon a): 0,1% TFA (acide trifluoroacétique)
 B (tampon b): 80% acétonitrile + 0,09% TFA
 N: Non retenu
 5, 7, 10, 11, 12 et 13: Fractions issues de chromatographie en phase inverse, dont 10, 11, 12 et 13: fractions actives éluées entre 32 et 48% d'acétonitrile

Fig. 15 (b): Test de l'activité antimicrobienne des fractions actives éluées en chromatographie en phase inversée (photo. originale)

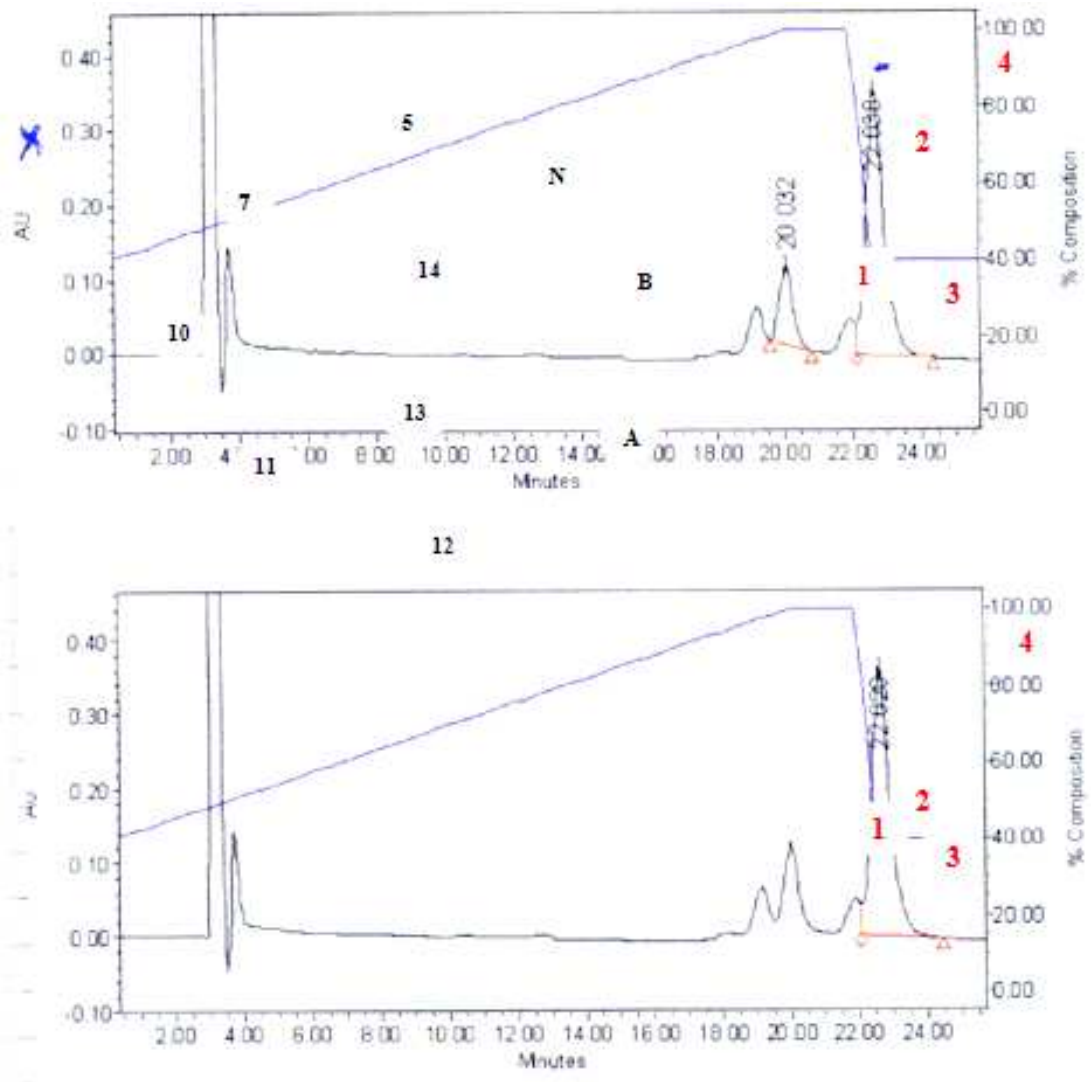


Fig. 16 (a): Chromatographie en phase inversée analytique des fractions actives éluées entre 32 et 48% d'acétonitrile



A (tampon a): 1,1% TFA (acide trifluoroacétique)
 B (tampon b): 0,9% TFA + 70 % acétonitrile + 30% H₂O
 1, 2, 3 et 4: fractions issues de la chromatographie en phase inversée analytique.

Fig. 16 (b): Test de l'activité antimicrobienne des fractions actives élues en chromatographie en phase inversée analytique (photo. originale)

Tableau 19: Purification de bactériocine issue de *Lb. acidophilus* 11

Stade de purification	Volume (mL)	Activité (AU/mL)	Activité Totale (AU)	Pourcentage (%)
Surnageant brut actif	400	3200	1280000	100
Chromatographie à échangeur de cations	250	3200	800000	62,5
Chromatographie phase inversée	20	1600	32000	2,5
Chromatographie phase inversée analytique	4	800	3200	0,25

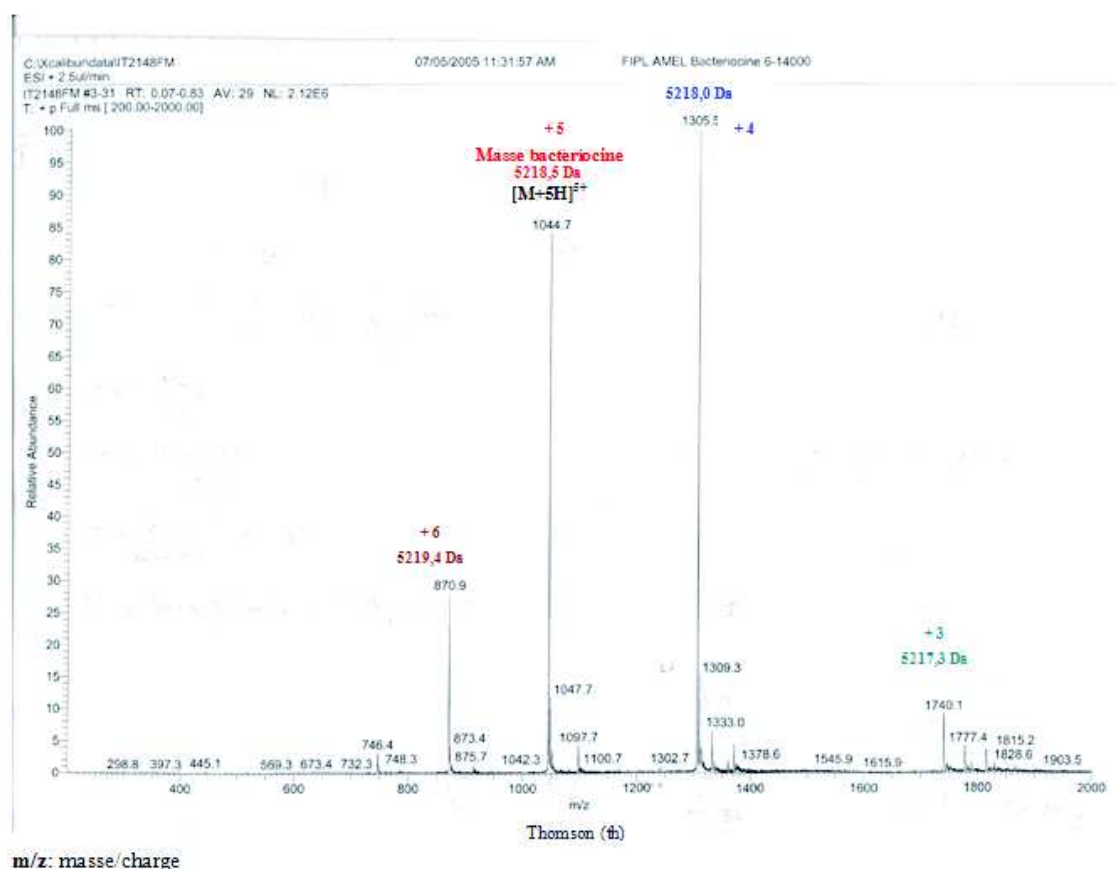


Fig. 17: Spectrométrie de masse de la bactériocine purifiée

Les résultats de la présente étude concernant la purification de la bactériocine ont montré que la concentration par précipitation au sulfate d'ammonium n'est pas une étape

de concentration appropriée pour cette purification. En effet elle ne semble pas être en mesure de précipiter la bactériocine d'une façon efficace. Par ailleurs, il a été démontré que les fractions précipitées au sulfate d'ammonium subissent une perte significative d'activité. D'où la nécessité d'initier la purification à partir du surnageant brut actif. Les travaux de Lachance (2000) démontrent que la bactériocine possède un poids moléculaire se situant entre 3,5 kDa et 14 kDa., suite à la filtration de surnageant sur une membrane de 30 kDa, aucune activité n'est retrouvée dans le filtrat. La présence d'activité dans le rétentat vient donc supporter l'hypothèse d'agrégation ou de l'adsorption sur les membranes de filtration. La centrifugation à 10 000g pourrait ainsi être responsable de la désagrégation de la bactériocine. De telles observations ont déjà été rapportées lors de la purification de la bactériocine de classe II et III (Toba et al., 1991; Thompson et al., 1996). En effet, il a été rapporté que le poids moléculaire estimé de certaines bactériocines excédait 200 kDa alors qu'après purification, il était beaucoup plus bas.

Le composé antimicrobien issu de la souche *Lb. acidophilus* 11 est produit en bouillon MRS. Sa purification a été possible par différentes étapes de chromatographie:

- Passage du surnageant brut actif en chromatographie à échangeur de cations avec une élution de la bactériocine par palier (0,1, 0,3 et 1M en NaCl).
- Passage de la fraction active précédente en chromatographie en phase inversée.
- Les fractions actives éluées de la chromatographie en phase inversée sont lyophilisées puis reprises dans 100 µL d'eau distillée pour un passage en chromatographie en phase inversée analytique (HPLC).

Sa caractérisation préliminaire montre que la partie biologiquement active est une protéine cationique à caractère hydrophobe. Chumchalovà et al. (2004) ont purifié et caractérisé l'acidocine CH5 produite par *Lactobacillus acidophilus* CH5. Sa purification est effectuée en se basant sur le caractère hydrophobe et cationique. Grâce au séquençage d'Edman, le N-terminal est constitué de 13 acides aminés. L'acidocine CH5 a été classée parmi le groupe II des bactériocines.

Ten Brink et al. (1990) ont utilisé la méthode d'extraction par les solvants organiques pour la purification de l'acidocine B issue d'une souche de *Lactobacillus acidophilus* M46. Oh et al. (2000) ont purifié et caractérisé une bactériocine produite par *Lactobacillus acidophilus* 30SC. Cette espèce est résistante aux solutions gastriques artificielles contenant 0,3% de bile. Elle produit une substance antimicrobienne thermostable, de nature protéique. Son activité n'est pas atteinte avec les variations de pH. Elle présente une activité antagoniste vis-à-vis de plusieurs bactéries Gram+ telle que *Listeria*. La purification de la bactériocine est réalisée après précipitation des protéines au sulfate d'ammonium à 50 %, puis après le passage en chromatographie en phase inversée. Le SDS-PAGE des fractions actives révèle que la bactériocine est de faible poids moléculaire (3,5 kDa).

Selon Yang et al. (1992 et 1994), la production des substances inhibitrices est fondée sur le principe d'adsorption et de désorption de ces dernières sur la cellule bactériocinogène. Les stratégies de purification des bactériocines se rapportaient exclusivement à la fraction sécrétée dans le milieu de culture par les souches productrices et ne tenaient pas compte de la partie adsorbée à la surface des cellules. La fraction adsorbée représente environ 80% de la totalité de la bactériocine produite (Daba et al., 1994). La propriété d'adsorption et de désorption des bactériocines sur les cellules en fonction du pH a permis d'améliorer les procédés d'extraction et a abouti à des rendements plus élevés en bactériocines (Yang et al., 1992). En effet, l'ajustement du pH à 6 (adsorption maximale de la bactériocine) permet une séparation facile des molécules à partir du milieu de culture par centrifugation

et récupération des cellules. Ensuite, la bactériocine peut être désorbée des cellules en diminuant le pH entre 1,5 à 2 (Yang et *al.*, 1992). Cette méthode semble produire des peptides d'une façon plus concentrée avec des niveaux élevés de production. D'autre part, Bower et Daeschel (1995) ont rapporté que les interactions électrostatiques assurent l'adsorption aux surfaces hydrophiles alors que la désorption est influencée par l'ajout du Tween 80.

8. Caractérisation du composé antagoniste purifié

8.1. Effet des enzymes protéolytiques, de la température et du pH sur l'activité de la bactériocine

Le composé actif purifié a subi plusieurs traitements (Tab. 20):

- L'activité antimicrobienne est de 32000 UA/mL lorsque la bactériocine ne subit aucun traitement (témoin). La bactériocine a été soumise à l'action de plusieurs enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine, pronase et protéinase K). Ces dernières altèrent complètement l'activité antagoniste de la bactériocine (Fig. 18). Ceci indique que la partie biologiquement active de l'inhibiteur est de nature protéique. Cette nature suggère que cette substance inhibitrice est considérée comme étant une bactériocine (Tagg et *al.*, 1976; Klaenhammer et *al.*, 1994; Zamfir et *al.*, 1999).
- L'effet du traitement thermique a été examiné en traitant la bactériocine pendant 30 minutes aux différentes températures: 70°C, 80°C, 90°C, 100°C et 121°C, à 100°C pendant 15, 30 et 45 minutes. On constate que cette substance reste stable pendant 30 min de 70°C jusqu'à 90°C. Elle est stable aussi pendant 15 min à 100°C. Elle décroît rapidement lors d'un traitement de 30 min ou de 45 min à 100°C et un traitement de 121°C pendant 30 min. Ceci pourrait être expliqué par la dénaturation de la bactériocine. La bactériocine issue de *Lb. acidophilus* 11 s'est révélée sensible à la chaleur, puisqu'elle ne conserve qu'une activité partielle après un traitement de 30 minutes à 100°C. Il ne s'agirait donc pas d'un lantibiotique, puisque ces derniers résistent à un traitement de 121°C. Certaines bactériocines ne faisant pas partie des lantibiotiques résistent mieux à la chaleur, comme la diplococcine, qui est toujours active suite à un traitement d'une heure à 100°C (Davey et Richardson, 1981). D'autres y sont moins résistantes, comme la lactococcine 972, dont l'activité est sensible à un traitement de 15 minutes à 50°C (Martinez et *al.*, 1995 et 1996).
- La stabilité de la bactériocine a été étudiée à différentes valeurs de pH variant de 4 à 10. Ce traitement est effectué à température ambiante pendant 2h. Le pH de la solution est ajusté à 6,8 afin d'effectuer le test de l'activité antimicrobienne avec la méthode de diffusion des puits. Selon nos résultats, l'activité inhibitrice de la bactériocine n'est pas affectée par la variation du pH. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Zamfir et *al.* (1999) qui ont constaté que l'activité de l'acidophiline 801 reste stable à une gamme de pH compris entre 3 et 10.

D'après Muriana et *al.* (1987) la lactacine F produites par *Lb. acidophilus* NCK 88 résiste remarquablement bien à la chaleur (15 min à 121°C). Elle est inactivée par la protéase K, la trypsine, la ficine. D'après Ten Brink et *al.* (1990) la bactériocine M46, produite par *Lactobacillus acidophilus* M46 résiste modérément à la chaleur, est sensible à la trypsine

et stable entre pH 2,0 et pH 12,0. Toba et al. (1991) ont constaté que l'acidophilucine A produite par *Lb. acidophilus* LAPT 1060, est sensible à la chaleur (elle ne résiste que 10 min à 60 – 70°C), à la trypsine et à la lactinase E.

Deraz et al. (2005) ont étudié une petite bactériocine appelée acidocine D20079 produite par *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. Elle est extrêmement thermostable (30 min à 121°C), tolère les variations du pH et sensible aux enzymes protéolytiques (trypsine, ficine, pepsine, papaine et protéinase K).



L: Bactériocine (bac) sans traitement
 E1: bac + pepsine incubé à 37°C. /2h
 E2: bac + trypsine incubé à 37°C. /2h
 E3: bac + pronase incubé à 37°C. /2h
 E4: bac +protéinase-K incubé à 37°C. /2h
 P: piqûre de pronase sur la gélose

Fig. 18: Effet des enzymes protéolytiques sur l'activité antagoniste de la bactériocine (photo. originale)

Tableau 2 0: Effet de la catalase, des enzymes protéolytiques, du traitement thermique et du pH sur l'activité de la bactériocine

Traitement	Activité de la bactériocine (UA. mL ⁻¹)
Sans traitement	3200
Catalase	3200
Enzymes protéolytiques Pepsine Trypsine Pronase Protéinase K	0 0 0 0
Traitement thermique 70°C, 30 min 80°C, 30 min 90°C, 30 min 100°C,15 min 100°C, 30 min 100°C,45 min 121°C, 30 min	3200 3200 3200 3200 1600 800 400
pH 4 5 6 7 8 9 10	3200 3200 3200 3200 3200 3200 3200

8.2. Détermination du poids moléculaire

Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS est utilisée afin d'estimer la masse moléculaire. L'échantillon utilisé est constitué de fractions actives éluées entre

32 et 48% d'acétonitrile issus de chromatographie en phase inversée. L'étude de l'activité antimicrobienne du composé actif à partir d'un gel de SDS PAGE, révèle une protéine présentant un RF voisin du peptide marqueur α -lactalbumin avec un faible poids moléculaire de 14,2 kDa (Fig. 19).

D'après la classification de De Vuyst et Vandamme (1994), et d'après le profil électrophorétique de cette protéine antimicrobienne, on peut conclure qu'il s'agirait bien d'une bactériocine appartenant à la deuxième classe (les non-lantibiotiques de faible poids moléculaire). Ce sont des bactériocines de poids moléculaire inférieur à 15 kDa et stables à la chaleur (entre 30 min à 100°C et 15 min à 121°C). Barefoot et Klaenhammer (1983) ont observé que la masse moléculaire d'une bactériocine donnée est variable au sein de la même espèce.

D'après la littérature plusieurs auteurs ont constaté que des souches appartenant à l'espèce *Lb. acidophilus* produisaient des bactériocines de faible poids moléculaire. D'après Hamdane et al. (1974), l'acidoline issue de *Lb. acidophilus* 2181 est de très faible poids moléculaire (0,2 kDa). Barrefoot et al. (1983) ont purifié la lactacine produite par *Lb. acidophilus* N2. Son poids moléculaire, à l'état de monomère serait d'environ de 8,5 kDa, elle serait formée d'une chaîne de 79 résidus d'acides aminés. D'après Muriana et al. (1987) la lactacine F produites par *Lb. acidophilus* NCK 88 a un poids moléculaire d'environ 6 kDa et comprend 56 résidus d'acides aminés. D'après Ten Brink et al. (1990) la bactériocine M46, produite par *Lactobacillus acidophilus* M46, a sous sa forme de monomère un poids moléculaire de 2,5 kDa. Deraz et al. (2005) ont étudié une petite bactériocine produite par *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 dont la masse moléculaire est de 6,6 kDa.

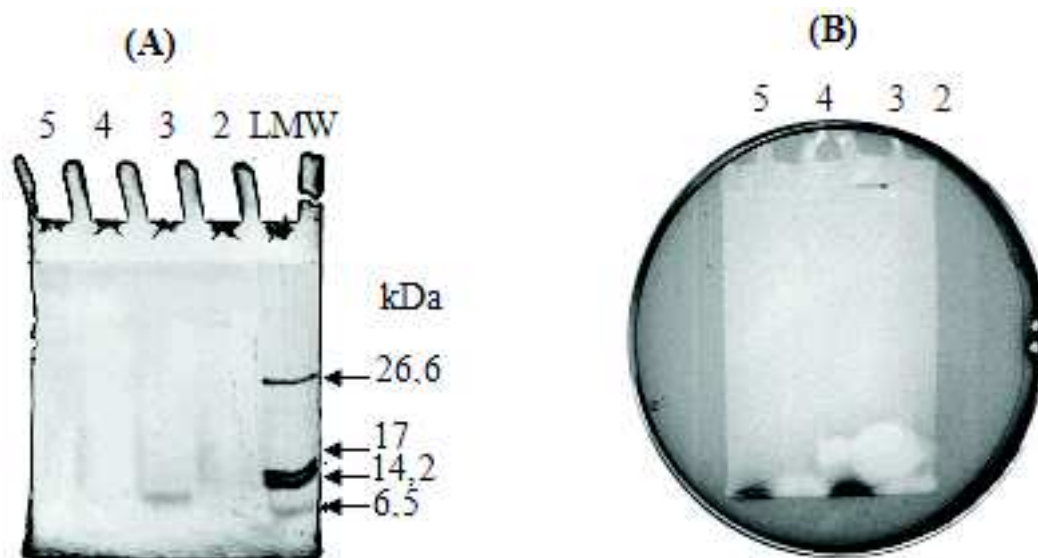


Fig. 19: SDS-PAGE et détection de l'activité antimicrobienne du composé actif issu de *Lactobacillus acidophilus* 11 (photo. originale)

(A) gel coloré avec du bleu de Coomassie; puits 1: peptides standards; puits 2, 3, 4 et 5: bactériocine de *Lb. acidophilus* purifiée

(B) gel + MRS ensemencé avec *Lb. bulgaricus* 340

Puits 1 : (The low molecular weight standards) LMW (kDa) marqueur peptides:

Triosephosphate isomerase 26,6

Myoglobin 17

α-lactalbumin 14,2

Aprotinin 6,5

· **Puits 2, 3, 4 et 5:** fractions actives éluées entre 32 et 48% d'acétonitrile

9. Suivi de production de bactériocine en bioréacteur à pH régulé

Trois fermentations ont été réalisées à 37°C à pH 6,5, 5,5 et 5,0, afin de déterminer les cinétiques de croissance et d'acidification de *Lb. acidophilus* 11. L'acidification est caractérisée par la quantité de soude consommée pour assurer la régulation du pH et par l'évolution de la conductivité électrique du milieu de culture. Les résultats de fermentation sont présentés sur les figures 20, 21 lorsque le pH est régulé à 6,5; figures 22 et 23 lorsque le pH est régulé à 5,5 et figures 24 et 25 lorsque le pH est régulé à 5,0. Quatre descripteurs sont déterminés, la consommation de la masse de la soude (m, en g), la vitesse de la consommation de la soude (dm/dt, en g/min), la conductivité (conduct., en mS) et la vitesse de la conductivité (dconduct./dt, en mS/min).

L'acide lactique est un acide carboxylique, sa formule chimique est C₃H₆O₃ (CH₃CHOH-COOH). En solution, le groupe carboxyle -COOH peut perdre un proton, donnant un ion lactate: CH₃CHOHCOO⁻. L'acide lactique est considéré comme un acide faible (pKa=3,90), c'est-à-dire que la réaction de dissociation dans l'eau n'est pas totale:



Pendant la fermentation, on trouve à la fois en solution l'acide lactique et sa forme basique (l'ion lactate). Lors de la régulation du pH avec une solution de NaOH 1N, la formation du lactate de sodium dans le milieu induit la formation d'un courant électrique traduit par la conductivité.

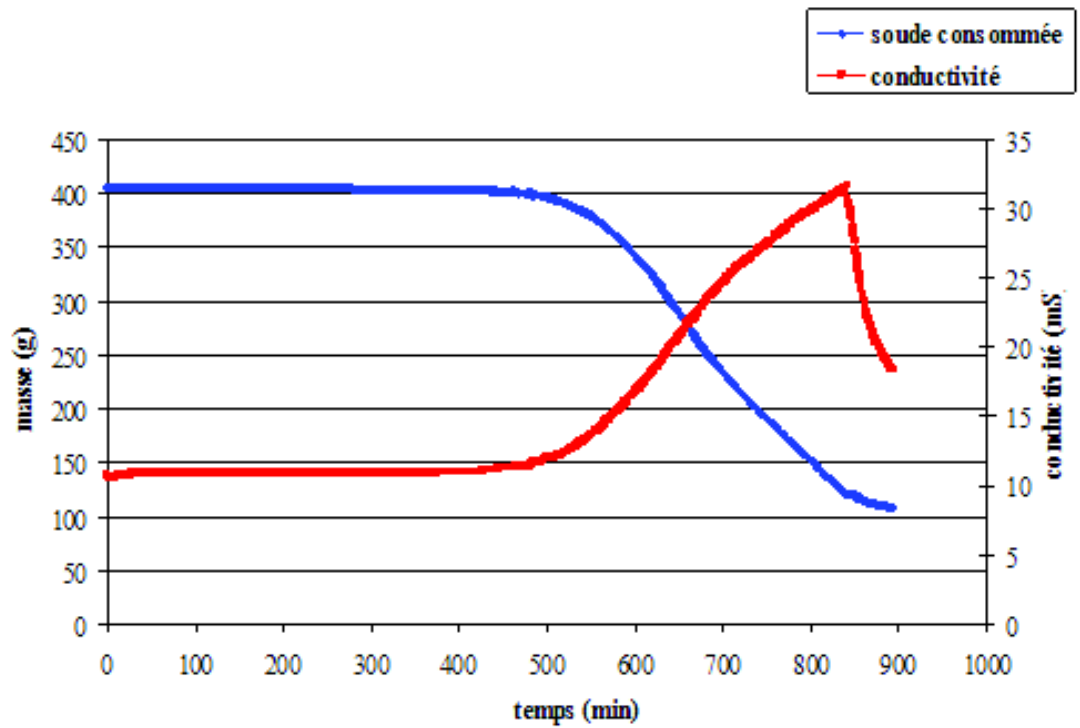


Fig. 20: Evolution de la consommation de la soude et de la conductivité en fonction du temps (pH 6,5)

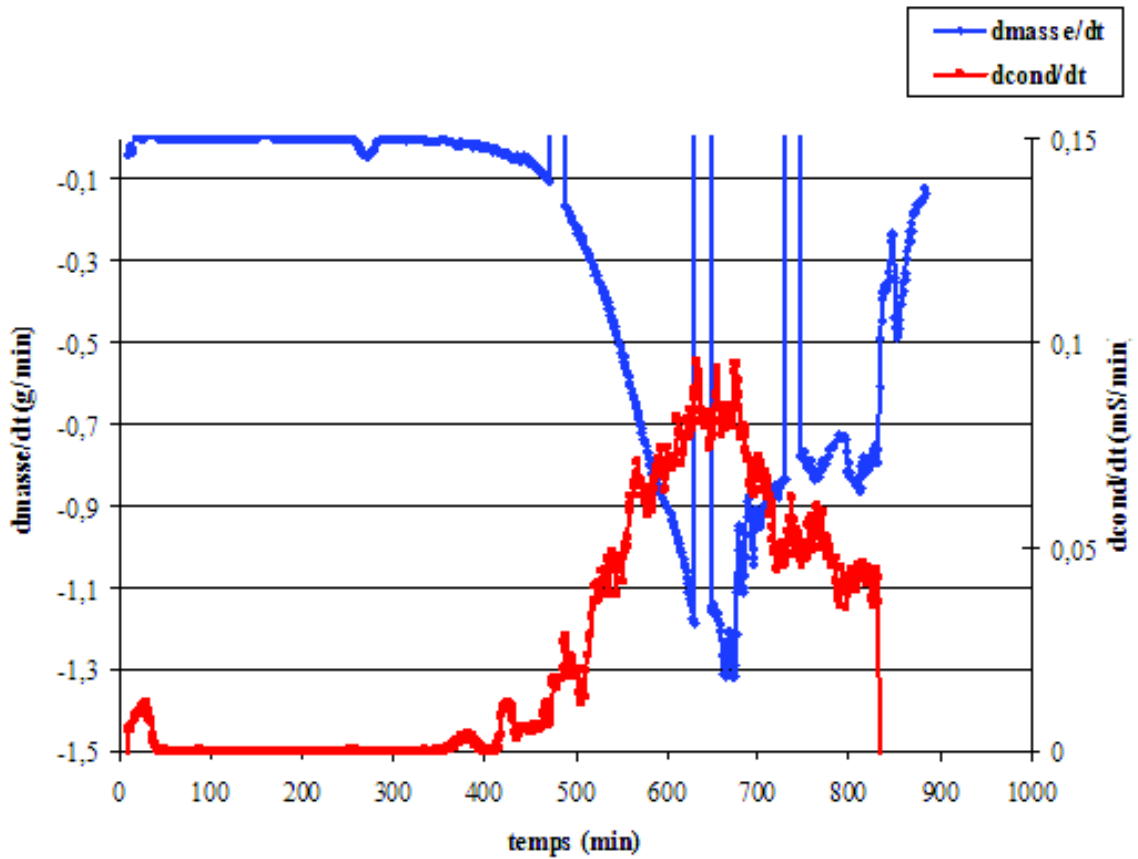


Fig. 21: Evolution des vitesses de la consommation de masse de la soude et de la conductivité en fonction du temps (pH 6,5)

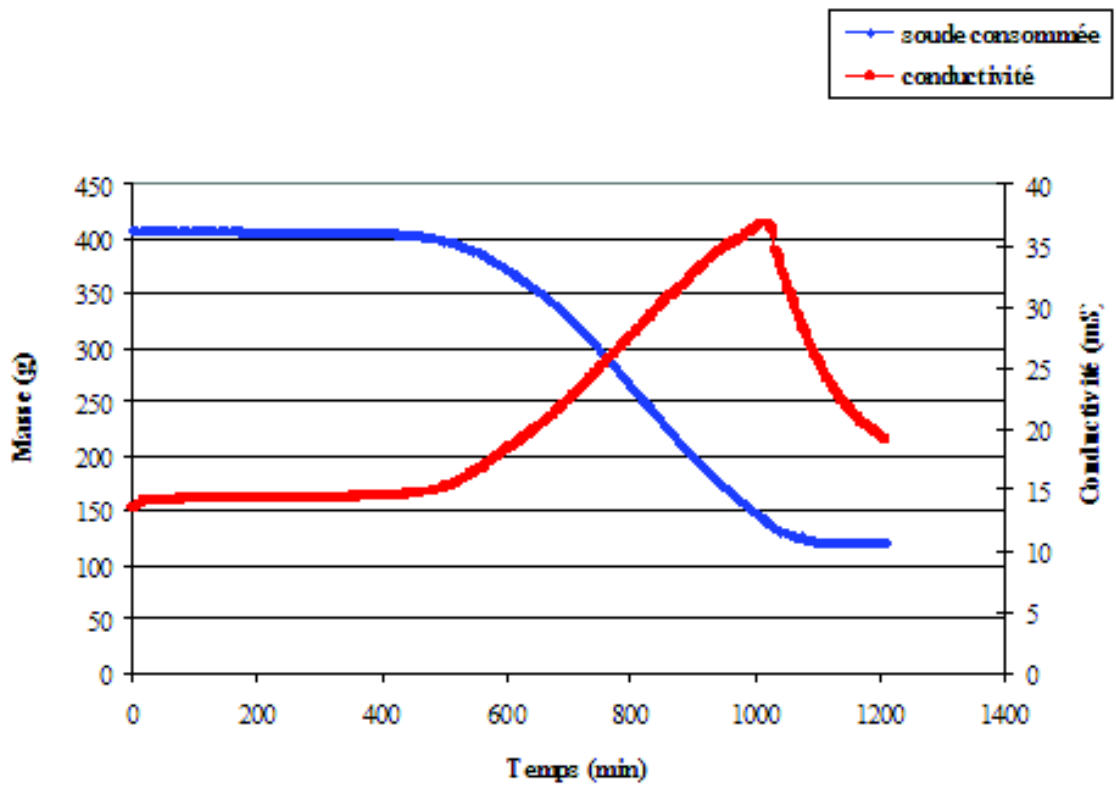


Fig. 22: Evolution de la consommation de la soude et de la conductivité en fonction du temps (pH 5,5)

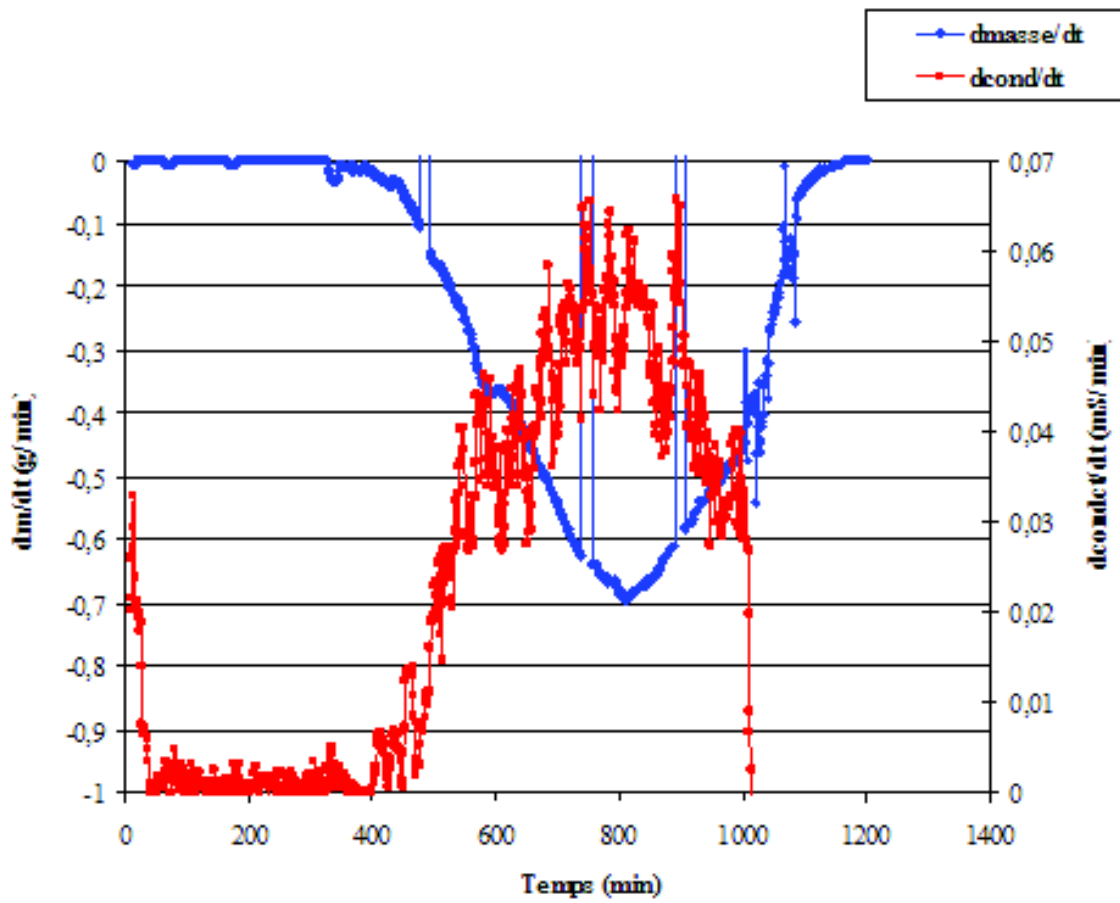


Fig. 23: Evolution des vitesses de la consommation de masse de la soude et de la conductivité en fonction du temps (pH 5,5)

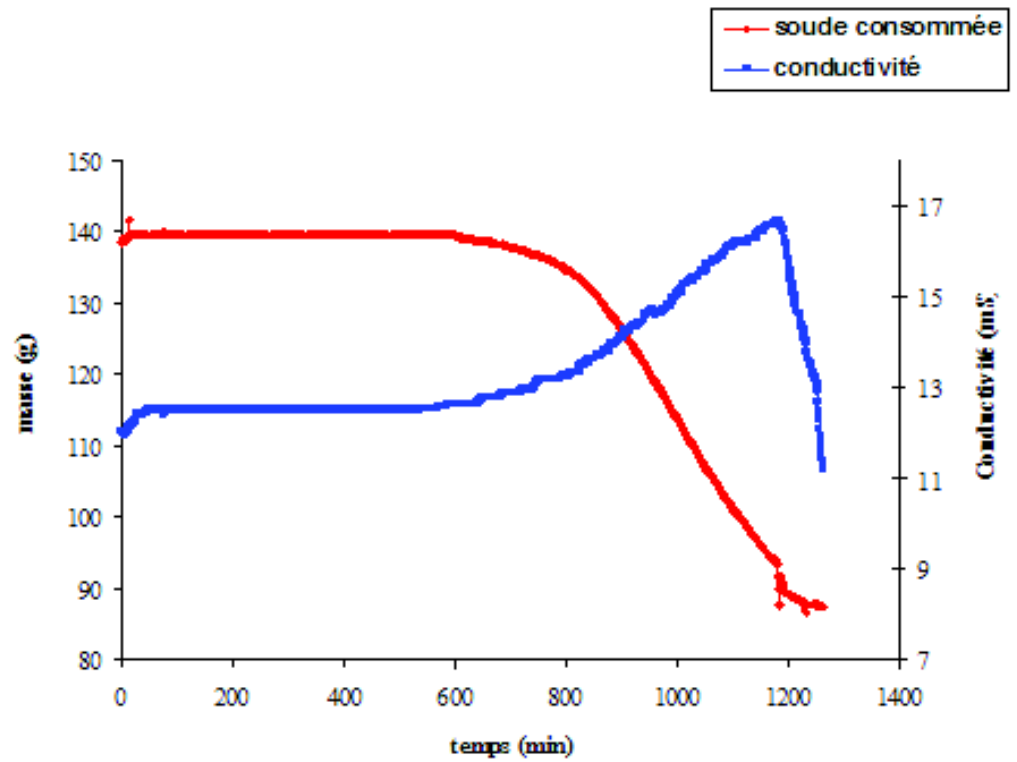


Fig. 24: Evolution de la consommation de la soude et de la conductivité en fonction du temps (pH 5,0)

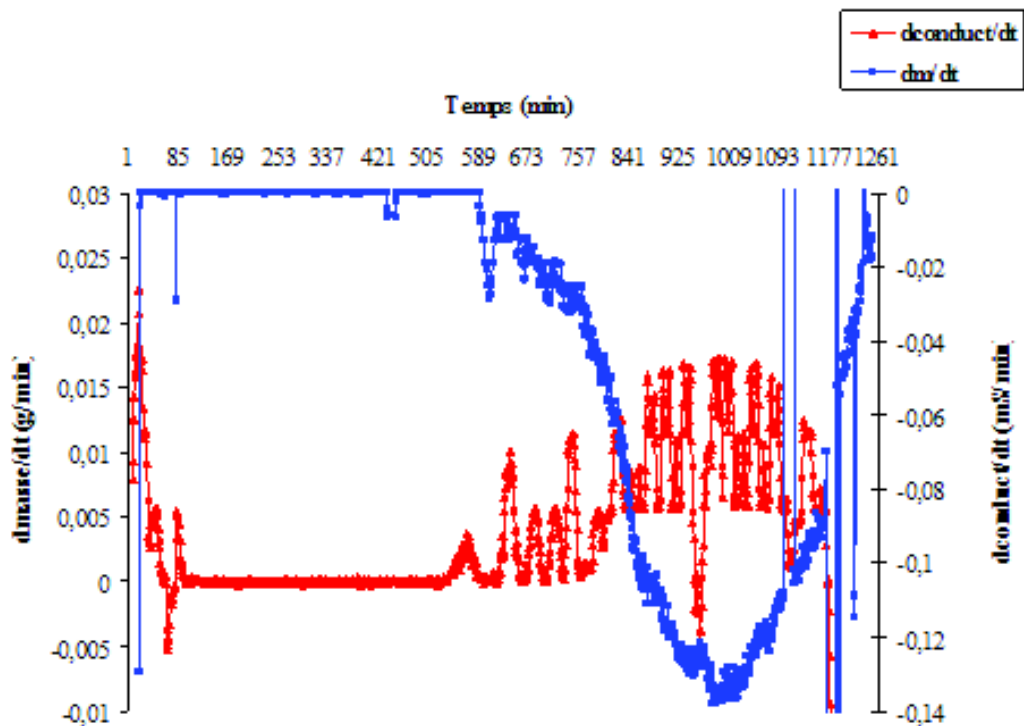


Fig. 25: Evolution des vitesses de la consommation de masse de la soude et de la conductivité en fonction du temps (pH 5,0)

Le tableau 21 présente un bilan comparatif des trois fermentations à pH régulé (6,5, 5,5 et 5,0). Un dénombrement est effectué 5 min après inoculation du fermenteur (X0) et à la fin de chaque fermentation (XF). Après centrifugation réfrigérée de la culture à 10000g le culot récupéré est pesé afin de déterminer le poids de la biomasse. D'après les résultats, les meilleurs paramètres de fermentation sont obtenus lorsque le pH est contrôlé à une valeur de 6,5. En effet la phase exponentielle de croissance débute après 427 min de fermentation correspondant à un gain de 32 min lorsque le pH est contrôlé à 5,5 et un gain de 147 min lorsque le pH est contrôlé à 5,0. Le temps nécessaire pour atteindre la vitesse maximale de fermentation est de 670 min lorsque le pH est contrôlé à 6,5. Ce temps est plus important lorsque le pH est contrôlé à 5,5 soit 900 min. Ce temps est beaucoup plus important lorsque le pH est contrôlé à 5,0 soit 990 min. Après 5 min d'inoculation du fermenteur, le nombre de cellules de *Lb. acidophilus* 11 est de $5,10^2$. Après 3h au-delà du temps nécessaire pour atteindre V_m , le nombre de *Lb. acidophilus* 11 est optimal lorsque le pH est contrôlé à 6,5 soit $1,2 \cdot 10^9$. Le poids de la biomasse après chaque fermentation est déterminé. Il est optimal lorsque le pH est contrôlé à 6,5 soit 12 g/L de surnageant brut actif.

Les quantités de soude consommées et les vitesses maximales d'acidification de cette souche sont meilleures lorsque le pH de fermentation est contrôlé à 6,5. Le pH optimal pour l'acidification de *Lb. acidophilus* 11 semble compris entre 6,5 et 5,5. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Gomes et Malcata, (1999) qui indiquent que cette espèce présente un pH optimal de 6 pour l'acidification et la production de bactériocine (Bogovic-Matijasic et Rogelj, 1998; Boyaval et al., 1998). Des fermentations complémentaires ont été conduites à pH régulé 5,0. Les résultats obtenus montrent que les conditions opératoires à pH contrôlé 5,0 ne sont pas favorables à l'acidification ni à la production de bactériocine par *Lb. acidophilus* 11.

D'après un bilan comparatif des trois fermentations à pH régulé à 6,5, 5,5 et 5,0, l'activité antimicrobienne est maximale (zone d'inhibition est de 18,0 mm) lorsque le pH est contrôlé à 6,5. Le test de l'activité antimicrobienne ainsi que le calcul des unités arbitraires de la bactériocine sont déterminés après chaque fermentation (Fig. 26). L'activité de la bactériocine dans le surnageant brut actif issu d'une fermentation à pH contrôlé 6,5 est de 25600 UA/mL.

Tableau 21: Bilan comparatif des trois fermentations

Paramètres de fermentation	Fermentation pH 6,5	Fermentation pH 5,5	Fermentation pH 5,0
Début phase exponentielle (min)	427	459	574
Temps à Vm (min)	670	900	990
t (Vm + 3h) (min)	850	1080	1170
Consommation maximale de soude (g)	143	207	12,17
Variation de conductivité maximale (mS)	11,74	19,01	2,05
Consommation finale de soude (g)	286	286	50,96
Variation de conductivité finale (mS)	21,04	13,62	2,87
(dm/dt)max (g/min)	-1,31	-0,57	-0,11
(dconduct/dt)max (mS /min)	0,095	0,047	0,016
Dénombrement X0 (nbr UFC/mL) après 5 min d'inoculation du fermenteur	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^2$
Dénombrement XF (nbr UFC/mL) à t (Vm + 3 h)	$1,2 \cdot 10^9$	10^7	$3 \cdot 10^5$
Poids biomasse en g (dans 1,8L)	21,6	13,1	9,3
Activité antimicrobienne (mm)	18,00	16,0	13,3

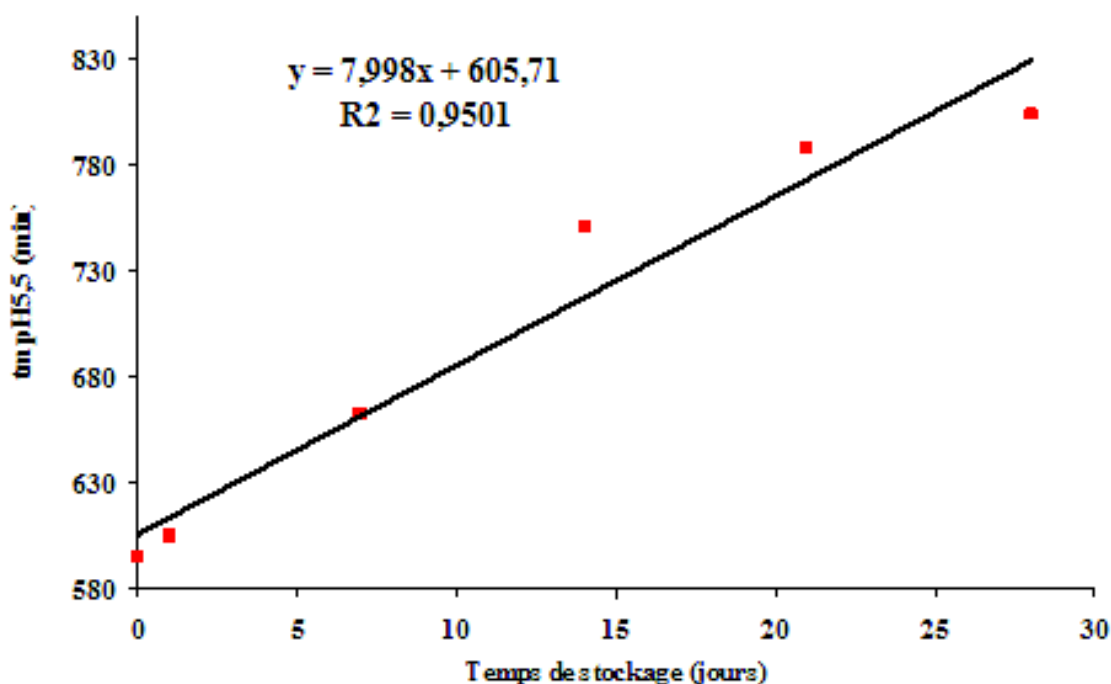


Fig. 26: Test de l'activité antimicrobienne du SBA issue de la fermentation à pH contrôlé 6,5 (photo. originale)

La production de bactériocine à un taux suffisamment élevé pour permettre sa purification constitue la première barrière qu'il faut surmonter. L'optimisation de la production n'est donc pas seulement nécessaire.

Dans la présente étude nous avons préconisé la production de bactériocine en bioréacteur à pH régulé à 6,5, 5,5 et 5,0. Les paramètres de la production par fermentation, tels que la température, l'agitation et le milieu, sont demeurés constants. D'après un bilan comparatif des trois fermentations à pH régulé (6,5, 5,5 et 5,0), un pH de fermentation de 6,5 et 5,5 semblerait optimal pour l'acidification et la production de bactériocine issue de *Lb. acidophilus* 11.

La production de bactériocine par *Lb. acidophilus* 11 active contre *Lb. bulgaricus* 340 a été étudiée en culture discontinue et en culture discontinue à pH régulé 6,5. La production de bactériocine et l'activité de la bactériocine en unités arbitraires ont été comparées. Cette production est optimale en bioréacteur à pH régulé 6,5 où les zones d'inhibitions obtenues sont de 18 mm et l'activité de la bactériocine présente 25600 UA/mL. Par contre, dans les conditions de fermentation discontinue, une production faible en bactériocine a été notée. L'activité antimicrobienne est caractérisée par des diamètres de zones d'inhibition de 9 mm de et une activité de la bactériocine de 3200 UA/mL.

Lorsque la production de bactériocine par *Lb. acidophilus* 11 est réalisée en fermentation discontinue, le milieu de culture est initialementensemencé et n'est pas renouvelé jusqu'à la fin de la fermentation. Le principal facteur limitant la production de bactériocine par cette technique réside dans l'accumulation de produits toxiques du métabolisme bactérien, principalement l'acide lactique non dissocié et le lactate. La fabrication de bactériocine en continu semble prometteuse. En effet, cette technologie permet de réaliser des fermentations à pH régulé.

Ces résultats confirment ceux de Avonts et *al.* (2004) qui ont suivi la cinétique de croissance, le métabolisme et la production de la bactériocine de sept souches probiotiques appartenant à la famille des lactobacilles dont *Lactobacillus acidophilus* sur différents milieux (bouillon MRS et lait) en bioréacteur à pH contrôlé 6,5. La production de bactériocine pour toutes les souches est meilleure dans le lait lorsqu'il est additionné d'extrait de levure. *L. acidophilus* IBB801, représente la meilleure souche en cinétique de croissance (Log 10,5 UFC/mL) et en production de bactériocine (3200 AU/mL).

Par ailleurs, Vignolo et *al.* (1996) ont étudié l'influence des conditions de culture sur la croissance et la production de lactocine 705 par *Lactobacillus casei* CRL705. Un maximum de production de bactériocine est obtenu dans le MRS à pH 6,5 et 7,5. Une grande quantité de bactériocine est obtenue lorsque le milieu MRS est additionné de 0,5 à 2% de tween 80, 2,0 % glucose, 1% tryptone et 2% extrait de levure. Une optimisation de la production de bactériocine est obtenue sur le lactosérum additionné de 2 % d'extrait de levure et 1% de tween 80. La lactocine est stable à pH 5 - 6 à 15°C. Juarez Tomás et *al.* (2002) ont étudié l'influence du pH, du milieu de culture et de la température sur la croissance et la production de la bactériocine par *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. Les meilleures conditions pour une optimisation de la croissance sont obtenues sur milieu MRS avec un pH initial de 6,5 et une température de 37°C. Une production maximale de bactériocine est obtenue sur le milieu LAPTg après 6h de fermentation à 37°C avec un pH initial de 6,5 ou 8,0. Van Den Berghe et *al.* (2005) ont constaté que les températures de fermentation comprises entre 20 et 45°C et une variation de pH 5,1 à 6,9 influent sur la production de mécédocine issue de *Streptococcus macedonicus*. La température optimale pour la production de la bactériocine est de 20 à 25°C. Par contre la meilleure température pour la biomasse est de 42,3°C. Le pH optimal pour la production de la bactériocine est de 6,0. Cependant la croissance est optimale à pH 6,4. L'activité maximale de la bactériocine est obtenue lorsque le pH est compris entre 6 et 6,5. Lejeune et *al.* (1998) ont étudié l'influence de l'addition de glucose à différentes concentrations (5, 30, 40 et 50 g/L), et l'influence de la température (30, 37 et 45°C) sur la production d'amylovorin issue de *Lactobacillus amylovorus* cultivée dans du bouillon MRS additionné de 20g/L de glucose. La production en biomasse et en bactériocine est maximale à 37°C. Une faible production de biomasse est observée lorsque le MRS est additionné de glucose à raison de 5g/L; par contre le poids de la biomasse sec (CDM) est de 2,5 g/L lorsque le MRS contient du glucose à raison de 20g/L.

Une faible concentration en NaCl (2% m/v) stimule la production de bactériocine sans affecter leur croissance de *Lactobacillus curvatus* (Verluyten et al., 2004). Callewaert et De Vuyst (2000) ont étudié l'effet de l'addition du glucose et /ou CNS (milieu contenant différentes concentrations en glucose et en source complexe d'azote) sur la production de bactériocine par *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. Une production maximale de bactériocine est de 11,2 MAU/L (Million Unité Arbitraire/litre) correspondant à une biomasse de 5,3g/L (masse sèche cellulaire/litre).

Mataragas et al. (2003) ont étudié l'influence du pH et de la température sur la croissance et la production de bactériocine par *Leuconostoc mesenteroides* L124 et *Lactobacillus curvatus* L442. Les conditions optimales de production des bactériocines n'ont pas coïncidé avec ceux de la croissance. Le pH et la température optimale pour la croissance est de 6,0-6,5 à 30°C. Par contre les conditions optimales pour la production de bactériocine issue de cette espèce est de 5,5 et à 25°C.

10. Effet de la congélation et de la durée du stockage sur l'activité acidifiante de *Lb. acidophilus* 11

La première étape de cette partie consiste à produire *Lb. acidophilus* 11 en bioréacteur dans des conditions standard de température à 37°C et à trois valeurs de pH contrôlé soit 6,5, 5,5 et 5,0. La seconde étape consiste au suivi de l'activité acidifiante CINAC de l'espèce au moment de sa production, notamment après la congélation et au cours du stockage. Le but est donc de quantifier la perte en activité acidifiante puisque la viabilité et le pouvoir acidifiant sont deux critères primordiaux déterminant la qualité d'une souche lactique.

Après concentration des cellules par centrifugation réfrigérée à 10 000g, une re-suspension bactérienne dans le surnageant brut actif est réalisée. La perte de l'activité acidifiante au cours de la congélation et du stockage à -20°C est représentée par une augmentation linéaire de T_{max} (temps nécessaire pour atteindre la vitesse maximale d'acidification à 37°C) en fonction de t_s (durée de stockage à -20°C). La différence entre les valeurs de t_m avant et après congélation quantifie le paramètre dt_m selon l'équation:

$$dt_m = t_{m0} - t_{mC}$$

t_{m0} : temps pour atteindre une activité acidifiante de la suspension concentrée avant congélation (en min)

t_{mC} : temps pour atteindre une activité acidifiante de la suspension concentrée après congélation (en min)

Les résultats de la quantification de la perte d'activité acidifiante de *Lb. acidophilus* 11 pendant la congélation et au cours du stockage selon les conditions de fermentation (pH contrôlé à 6,5, 5,5 et 5,0) sont présentés au niveau des tableaux (22, 23 et 24), tableaux (25, 26 et 27, annexe) et des figures (27, 28 et 29). La figure 30 présente, à titre d'exemple, l'évolution du pH et de la vitesse d'acidification ($d\text{pH}/dt$) avant congélation et 24h après stockage, lors de l'incubation de *Lb. acidophilus* 11 dans du lait à 37°C.

La quantification de la perte d'activité acidifiante de *Lb. acidophilus* 11 au cours de la congélation et du stockage consiste à établir une relation linéaire entre l'activité acidifiante (t_m , en min) et la durée du stockage (t_s , jours). Elle a été validée pour différentes biomasses

issues de fermentations à pH contrôlé 6,5, 5,5 et 5,0 (Fig. 27, 28 et 29). Les résultats relatifs à chaque fermentation font l'objet d'une régression linéaire de type:

$$T_{\max} = t_{m0} + k t_s$$

Où T_{\max} est le temps nécessaire pour atteindre l'activité acidifiante, t_{m0} est l'ordonnée à l'origine (en min), k est la pente de la régression linéaire (en min j^{-1}) et t_s est le temps de stockage (en jours). Les régressions linéaires sont déterminées à l'aide du logiciel Excel. La pente k représente la vitesse de perte d'activité acidifiante pendant le stockage. Ceci signifie qu'une pente élevée indique une diminution importante et rapide de l'activité acidifiante. Signifiant que la souche considérée est sensible aux conditions de stockage (-20°C). Les valeurs de k obtenus à différent pH régulé 6,5, 5,5 et 5,0 sont présentées au niveau des courbes de régression soit respectivement 7,998 min/ j , 4,28 min/ j et 15,519 min/ j . La vitesse de perte d'activité acidifiante de 15,519 min/ j^{-1} indique une pente de la régression linéaire élevée, signifiant une diminution rapide de l'activité acidifiante. Ceci suggère que les biomasses issues d'une fermentation contrôlée à pH 5,0 sont sensibles aux conditions de stockage. Les résultats montrent qu'il est préférable de cultiver des cellules à pH contrôlé 6,5 ou 5,5 pour favoriser la résistance des cellules à la congélation à -20°C et au stockage à l'état congelé. En revanche, les cellules cultivées à pH contrôlé 5,0 montrent une dégradation rapide de leur activité acidifiante.

La différence entre les valeurs de T_{\max} avant et après congélation quantifie le paramètre dtm . Ce dernier est important dans les biomasses de *Lb. acidophilus* issues de fermentation contrôlées 6,5, 5,5 et 5,0 soit respectivement -144 min, -159 min et -166 min.

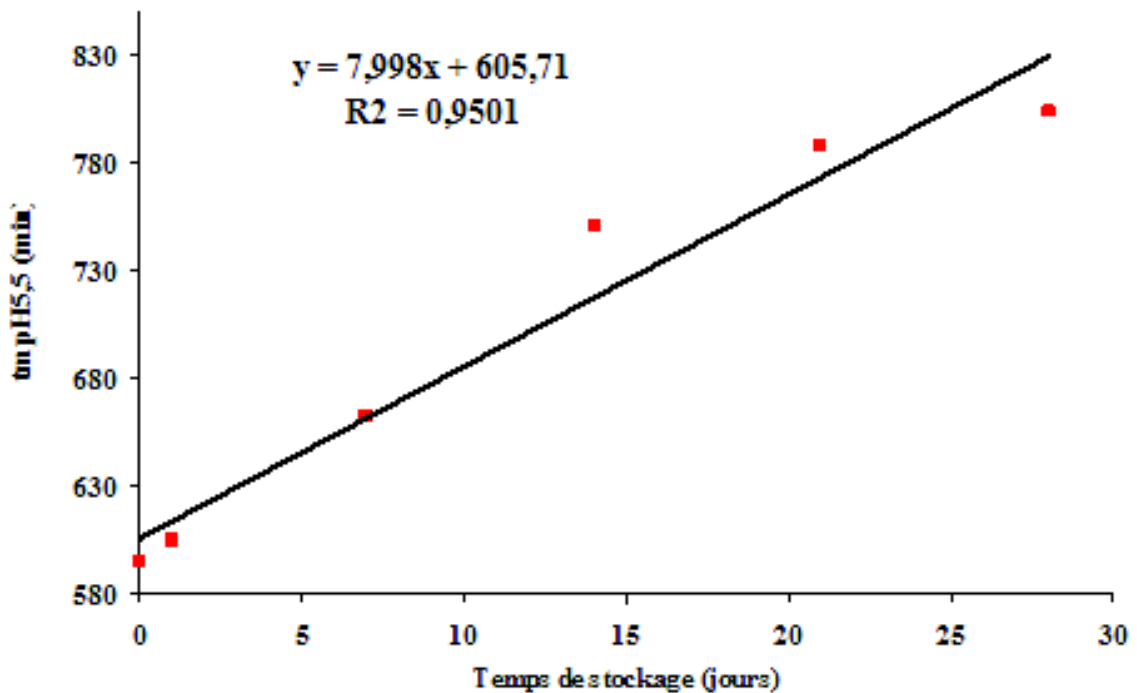


Fig. 27: Activité acidifiante de *Lb. acidophilus* 11 en fonction de la durée de stockage (t_s) à -20°C (pH contrôlé 6,5)

$$T_{\max} = 605,71 + 7,998 \cdot t_s$$

Tableau 22: Quantification de la perte d'activité acidifiante de *Lb. acidophilus* 11 pendant la congélation et au cours du stockage (pH contrôlé à 6,5)

Temps (jours)	0	1	7	14	21	28
Vmax	-0,003	-0,0034	-0,0032	-0,0033	-0,0030	-0,0039
Tmax	86	105	169	203	219	230
dtm		-19	-83	-117	-133	-144
pHmax	6,07	6,15	6,15	6,20	6	6
t pH5,8	326	344	402	434	465	491
t pH5,5	594	605	662	750	788	803
t pH5,0	1213	996	1521	1744	1966	1988

Vmax: vitesse maximale d'acidification, Tmax: temps nécessaire pour atteindre Vmax, dtm: la différence entre les valeurs de Tmax avant et après congélation ($dtm = tm_0 - tm_c$), pH max: pH maximal, t pH 5,8: temps nécessaire pour atteindre pH 5,8 et t pH 5,5: temps nécessaire pour atteindre pH 5,5, t pH 5,0: temps nécessaire pour atteindre pH 5,0.

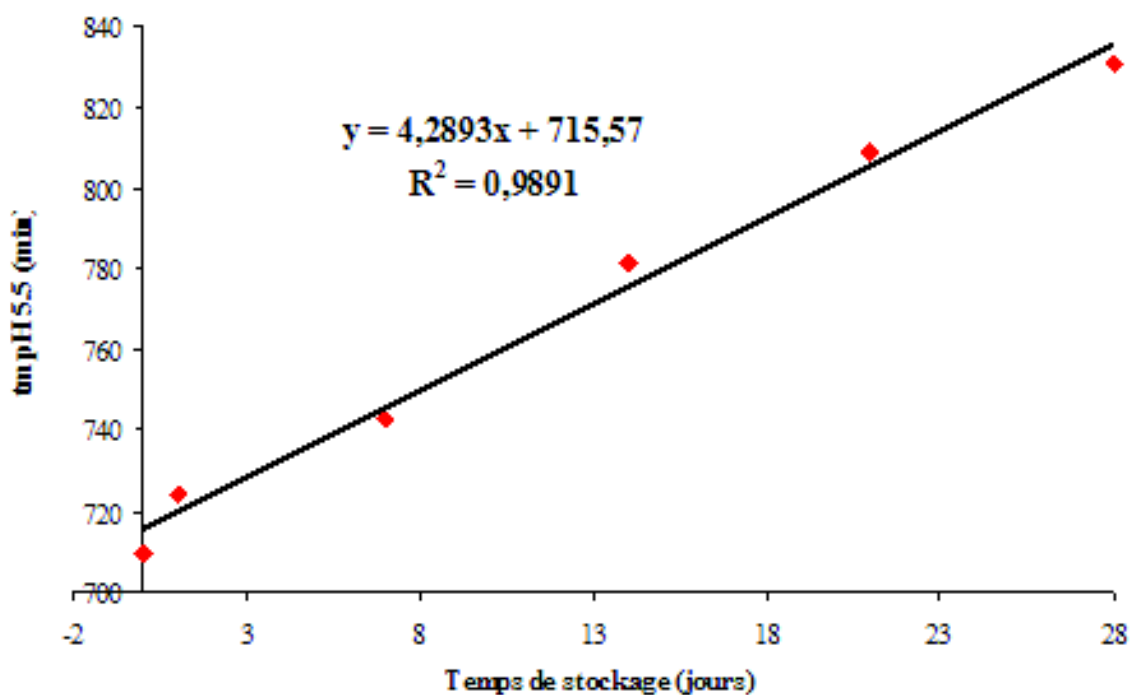


Fig. 28: Activité acidifiante de *Lb. acidophilus* 11 en fonction de la durée de stockage (t_s) à -20°C (pH contrôlé 5,5)

$$T_{\text{max}} = 715,57 + 4,2893 \cdot t_s$$

Tableau 23: Quantification de la perte d'activité acidifiante de *Lb. acidophilus* 11 pendant la congélation et au cours du stockage (pH contrôlé à 5,5)

Temps (jours)	0	1	7	14	21	28
Vmax	-0,0028	-0,0028	-0,0027	-0,0022	-0,0025	-0,0022
Tmax	102	115	211	244	252	261
dtm		-13	-109	-142	-150	-159
pHmax	6,22	6,32	6,31	6,32	6,31	6,36
tpH5,8	395	412	435	463	484	510
tpH5,5	710	724	743	781	809	831
tpH5,0	1823	1933	1945	1965	1997	2000

Vmax: vitesse maximale d'acidification, Tmax: temps nécessaire pour atteindre Vmax, dtm: la différence entre les valeurs de Tmax avant et après congélation (dtm= tm₀- tm_C), pH max: pH maximal, t pH 5,8: temps nécessaire pour atteindre pH 5,8 et t pH 5,5: temps nécessaire pour atteindre pH 5,5, t pH 5,0: temps nécessaire pour atteindre pH 5,0.

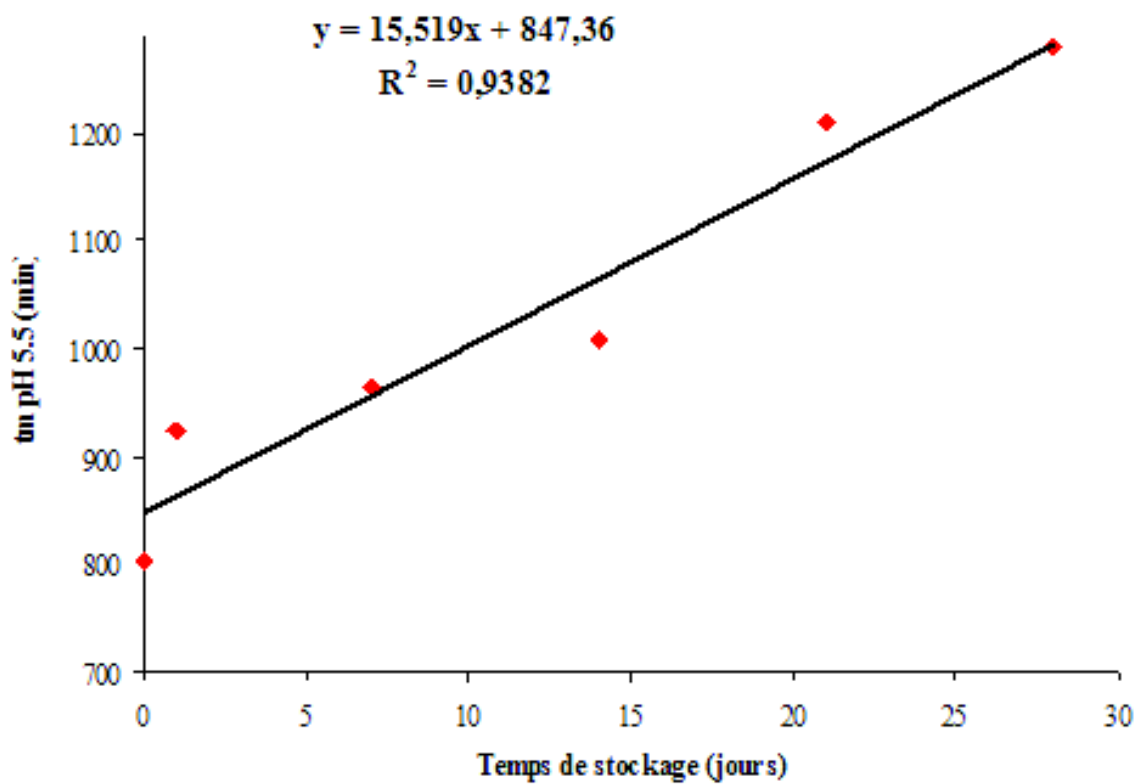


Fig. 29: Activité acidifiante de *Lb. acidophilus* 11 en fonction de la durée de stockage à -20°C (pH contrôlé 5,0)

$$Tmax = 847,36 + 15,519 \cdot ts$$

Temps (jours)	0	1	7	14	21	28
Vmax	-0,0029	-0,0034	-0,0035	-0,0022	-0,0023	-0,0026
Tmax	117	128	222	244	268	283
dtm		-11	-105	-127	-151	-166
pHmax	6,25	6,31	6,30	6,32	6,33	6,39
t pH5,8	591	615	735	852	968	985
t pH5,5	803	923	963	1009	1209	1279
t pH5,0	1907	1946	1997	2138	2446	2657

Tableau 24: Quantification de la perte d'activité acidifiante de Lb. acidophilus 11 pendant la congélation et au cours du stockage (pH contrôlé à 5,0)

V_{max}: vitesse maximale d'acidification, T_{max}: temps nécessaire pour atteindre V_{max}, dtm: la différence entre les valeurs de T_{max} avant et après congélation (dtm= t_{m0}- t_{mC}), pH max: pH maximal, t pH 5,8: temps nécessaire pour atteindre pH 5,8 et t pH 5,5: temps nécessaire pour atteindre pH 5,5, t pH 5,0: temps nécessaire pour atteindre pH 5,0.

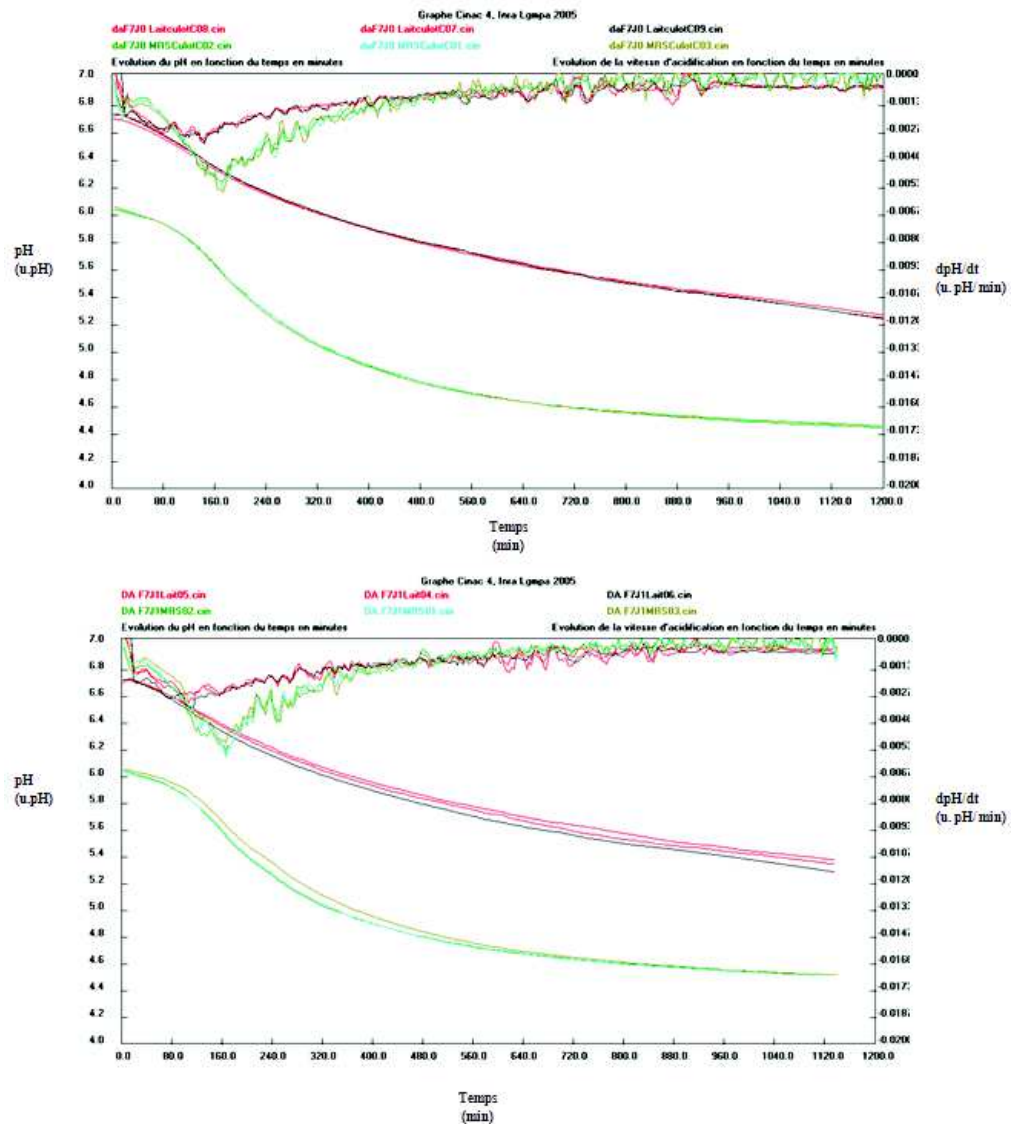


Fig. 30: Courbe d'acidification (pH) et de vitesse d'acidification (dpH/dt) d'une culture pure de Lb. acidophilus dans du lait et dans MRS à 37°C avant congélation et 24h après stockage

Les résultats obtenus dans cette étude avec *Lactobacillus acidophilus* 11, montrent que la température de congélation et de la durée de stockage a un effet sur la reprise d'activité acidifiante de la bactérie. Cet effet est négatif pour une température de congélation de -20°C. La formation des cristaux de glace (taille, localisation) et leur évolution au cours du stockage, et les mécanismes associés (plasmolyse) permettent d'expliquer ces résultats. La quantité de glace formée dans la matrice cryoconcentrée dépend de la cinétique de congélation. Par

comparaison avec une congélation à vitesse élevée (immersion dans l'azote liquide, soit une vitesse de l'ordre de 2500°C/min), une vitesse de congélation lente (5°C/min) entraîne la formation d'une quantité de glace extracellulaire plus importante associée à de plus gros cristaux de glace. Nos résultats sont en accord avec ceux de Fonseca et al. (2006). Ces derniers ont étudié la résistance de *Lactobacillus bulgaricus* à la congélation en présence de glycérol, cryoprotecteur couramment utilisé. Elle s'est avérée fortement dépendante de la cinétique de congélation et des conditions de stockage mises en oeuvre. Ainsi, les vitesses de congélation rapides, obtenues par immersion dans l'azote liquide, induisent les pertes minimales d'activité acidifiante et de viabilité, si, et seulement si, un stockage ultérieur à -196 °C ou -80 °C est appliqué. En revanche, un stockage des échantillons congelés à -20 °C, provoque les pertes maximales de viabilité et d'activité acidifiante. Toutefois, une perte modérée d'activité de ces bactéries peut être obtenue à des températures de stockage élevées (-20 °C) à condition de mettre en oeuvre de faibles vitesses de congélation (5°C/min).

Tsvetkov et Shishkova (1982) ont comparé la viabilité de *Lb. bulgaricus* après congélation à différentes températures (-20°C, -30°C, -40°C et -196°C) et concluent que l'immersion dans l'azote liquide est la meilleure méthode de congélation et de conservation. En revanche Denou et al. (2005) observent des taux de mortalité importants après congélation à -196°C de *Lb. bulgaricus* en présence de différents cryoprotecteurs. La cryotolérance de *Lb. acidophilus* 11, préalablement cultivée à 37°C et à trois pH (6,5, 5,5 et 5,0) a été déterminée. Les résultats montrent qu'il est préférable de cultiver les cellules à pH 6,5 ou 5,5 pour favoriser la résistance des cellules à la congélation à -20°C et au stockage à l'état congelé. La maîtrise de la cryotolérance de la souche d'intérêt permet la reprise normale de ses activités métaboliques telle que l'acidification et la production de bactériocine. Le suivi de la production de bactériocine en bioréacteur est réalisée sur des souches de *Lb. acidophilus* 11 en stock congelées à -20°C. L'amélioration de la qualité des ferments lactiques doués d'activité bactériocinogène, nécessite l'optimisation des conditions de sa conservation.

En Algérie, plusieurs chercheurs ont étudié les bactéries lactiques. Selon Badis et al. (2005) L'identification des 240 isolats selon les critères morphologiques, physiologiques et biochimiques a permis de les rattacher aux 28 espèces présumées dont les plus dominantes sont *Lactobacillus helveticus* (29 isolats), *Streptococcus thermophilus* (23 isolats), *Lactobacillus brevis* (20 isolats), *Lactobacillus caséi* subsp *caséi* (20 isolats), *Lactobacillus plantarum* (16 isolats), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (14 isolats) et *Pediococcus*.

Bekhouche et Boulahrouf (2005) ont effectués dénombrements et l'identification des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de vaches appartenant à six stations d'élevage de la région de Constantine. Le nombre moyen de bactéries lactiques varie de $0,579 \times 10^7$ à $11,40 \times 10^7$. Sur 1645 souches isolées 1000 souches ont pu être purifiées et identifiées aux genres *Streptococcus* (147 souches), *Lactococcus* (121), *Enterococcus* (95), *Leuconostoc* (272), *Lactobacillus* (197) et *Pediococcus*. (168).

D'après Zadi-Karamet Karam (2005) Quatre-vingt-une souches de bactéries lactiques ont été isolées et identifiées à partir du lait de chamelle. Les genres bactériens rencontrés dans les échantillons sont représentés par des souches de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. Quatre genres de bactéries lactiques ont été trouvés dans le lait de chamelle. La seule espèce de lactobacille présente dans les échantillons de lait est *Lb. plantarum* alors que

Lactococcus est représenté par ses trois sous-espèces. Parmi ces dernières certaines souches présentent la capacité de croître en présence de 6,5 % NaCl. Cette caractéristique inattendue est sans doute à relier avec les conditions alimentaires des animaux.

D'après Dilmi Bouras et Sadoun (2002) *Streptococcus thermophilus* (Sc. t.) et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Lb. b) sont relativement résistants à l'acidité gastrique, aux sels biliaires et à la flore intestinale. Ces ferments se retrouvent à des concentrations importantes, à différents niveaux du tube digestif, tant que les lapins consomment du yaourt. Après l'arrêt de l'ingestion du yaourt, la concentration de Sc. t et de Lb. b. reste à un niveau acceptable, pendant 24 heures, avec une concentration voisine de 10^5 cellules . mL⁻¹ au niveau de l'estomac, 10^7 cellules . mL⁻¹ au niveau du duodénum et 10^7 cellules . g⁻¹ de fèces au ni-veau du gros intestin. Bendali *et al.* (2008) ont étudié *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* isolée à partir des selles de nourrisson allaité au sein, identifié phénotypiquement et génotypiquement. Cette souche est douée d'une activité bactériocinogène vis-à-vis *Listeria* (*Listeria innocua* CLIP 74915 et *Listeria monocytogenes* EGDc). Une production maximale de bactériocine a été notée vers la fin de la phase exponentielle de croissance (14 h dans MRS bouillon et 18 h dans bouillons BHI).

CONCLUSION

52 espèces lactiques ont fait l'objet de cette étude, 10 souches appartenant à l'espèce *Streptococcus thermophilus* ont été isolées à partir de lait crû de vache. 13 souches appartenant à l'espèce *Lactobacillus acidophilus* ont été isolées à partir du lait de vache fermenté naturellement. Plusieurs espèces appartenant à la famille des bifidobactéries ont été isolées à partir des selles de nourrissons âgés d'un mois allaités exclusivement au sein, *Bifidobacterium bifidum* (6 souches), *Bifidobacterium longum* (7 souches), *Bifidobacterium infantis* (7 souches), *Bifidobacterium adolescentis* (4 souches), et *Bifidobacterium breve* (5 souches).

L'activité antimicrobienne des 52 souches est étudiée à l'égard de 4 espèces pathogènes *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* suivant la méthode de diffusion en milieu solide. Cette activité n'a été décelée que dans les surnageants de culture. En effet aucune activité n'a été observée dans les extraits cellulaires testés. En conclusion la bactériocine est donc extraite dans le milieu extracellulaire.

Une première sélection est effectuée sur la base de l'activité bactériocinogène. Les trois meilleures souches de chaque espèce sont retenues soit *Bf. adolescentis* 2, 3 et 4, *Bf. bifidum* 4, 5 et 6, *Bf. infantis* 1, 3 et 5, *Bf. longum* 2, 4 et 5, *Bf. breve* 2, 3 et 5, *Sc. thermophilus* 3, 6 et 7 et *Lb. acidophilus* 1, 6 et 11. Une deuxième sélection des 21 souches est réalisée sur la base de deux paramètres technologiques, le pouvoir acidifiant et la cinétique de la croissance. Seule l'espèce *Lb. acidophilus* 11 a été retenue pour la purification et la caractérisation de la bactériocine ainsi que pour la production de bactériocine en bioréacteur.

La bactériocine produite par *Lb. acidophilus* a été purifiée en trois étapes:

- Passage du surnageant brut actif en chromatographie à échangeur de cations avec une élution de la bactériocine par palier (0,1, 0,3 et 1M en NaCl), à ce stade de purification l'activité antimicrobienne est observée dans la fraction éluée à 1M en NaCl. Ceci suggère que la substance inhibitrice est probablement de nature cationique.
- Passage de la fraction active précédente en chromatographie en phase inversée, les fractions actives sont éluées entre 32 et 48% d'acétonitrile.
- Les fractions actives éluées entre 32 et 48% d'acétonitrile, sont lyophilisées puis reprises dans de l'eau distillée pour un passage en chromatographie en phase inversée analytique (HPLC). Le profil chromatographique de la fraction active révèle 4 pics. Le test de l'activité inhibitrice montre que le 4^{ème} pic est actif. Ce dernier sera analysé par spectrométrie de masse. Les résultats ont révélé que la bactériocine représente une masse de 5218Da.

La bactériocine a été soumise à l'action d'enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine, pronase et protéinase K). Ces dernières altèrent complètement l'activité antagoniste de la bactériocine. L'effet du traitement thermique a montré que cette substance reste stable pendant 30 min de 70°C jusqu'à 90°C; Elle est stable aussi pendant 15 min à 100°C. En effet elle décroît rapidement lors d'un traitement de 30 min ou de 45 min à 100°C et un traitement de 121°C pendant 30 min. L'activité inhibitrice de la bactériocine n'est pas affectée par la

variation du pH. L'étude de l'activité antimicrobienne du composé actif à partir d'un gel de SDS PAGE, révèle une protéine de faible poids moléculaire compris entre 14,2 et 6,5 kDa.

D'après un bilan comparatif des trois fermentations à pH régulé (6,5, 5,5 et 5,0), un pH compris entre 6,5 et 5,5 semblerait optimal pour l'acidification de *Lb. acidophilus* 11.

La production de bactériocine par *Lb. acidophilus* 11 par fermentation discontinue «fermentation en batch» est faible, les zones d'inhibition obtenues sont de 8 mm. Ceci peut être expliqué par l'accumulation de produits toxiques, principalement l'acide lactique non dissocié et le lactate, et par conséquent l'acidification du milieu de culture. Le pH est un facteur important limitant la production de bactériocine par cette technologie. D'où l'intérêt de production de bactériocine par *Lb. acidophilus* 11 en bioréacteur à pH régulé à 6,5, 5,5 et 5,0. Le diamètre des zones d'inhibition est important lorsque le pH de fermentation est contrôlé à 6,5 soit 18 mm avec une activité maximale de bactériocine, soit 25600UA/mL.

La cryotolérance des ferments lactiques et probiotiques concentrés congelés est un phénomène encore peu maîtrisé, principalement à cause du stress subi par les cellules, auxquelles elles répondent de façon très variable. Ce travail propose un nouveau système (CINAC) pour quantifier l'activité acidifiant de *Lb. acidophilus* 11 après fermentation, avant et après congélation et pendant le stockage. La méthode consiste à établir une relation linéaire entre l'activité acidifiante (t_m) et la durée de stockage (t_s). Cette méthode permet de déterminer la perte d'activité lors de la congélation et la vitesse de perte lors du stockage.

En perspectives il serait intéressant d'envisager de:

- Effectuer un séquençage de la bactériocine purifiée dans la présente étude.
- Suivre l'effet de la température sur la production de la bactériocine en bioréacteur.
- Optimiser la production de la bactériocine en bioréacteur.
- Etudier l'effet des cryoprotecteurs sur l'activité acidifiante et la croissance du ferment.
- Etudier l'effet des conditions de congélation-décongélation sur la structure cellulaire de la souche d'intérêt.
- Etudier l'effet de la lyophilisation sur la production de la bactériocine.

Références bibliographiques

- Abee T. 1995** – Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organism. *FEMS Microbiology Letters*, 129: 1 - 10.
- Aktypis A. and Kalantzopoulos G. 2003** – Purification and characterization of thermophilin ST-1, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0001. *Lait*, 83: 365 - 378.
- Alais C. 1984** – Science du lait, principe des techniques laitières, 4^{ème} édition, Paris, 812 p.
- Albano H., Oliveira M., Aroso R., Cubero N., Hogg T. and Teixeira P. 2007** - Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from “Alheiras ”(traditional Portuguese fermented sausages): *In situ* assays. *Meat Science*, 76: 796 – 800.
- Allison G. E., Fremaux C. and Klaenhammer T. R. 1994** - Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the Lactacin F operon. *Journal of Bacteriology*, 176, 8: 2235 - 2241.
- Altermann E., Russell W. M., Azcarate-Peril M. A., Barrongou R., Buck B. L., McAuliffe O., Souther N., Dobson A., Duong T., Callanan M., Lick S., Hamrick A., Cano R. and Klaenhammer T. R. 2005** - Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. PNAS*, 102, 11: 3906 - 3912.
- Alves V. F., Martinez R. C. R., Lavrador M. A. S and De Martinis E. C. P. 2006** - Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham, *Meat Science*, 74: 623 – 627.
- Ammor S., Tauveron G., Dufour E. and Chevallier I. 2006** - Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1 —Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17: 454 – 461.
- Anderssen E. L., Diep D. B., Nes I. F., Eijsink V. G. H. and Nissen-Meyer J. 1998** - Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11, two new peptide bacteriocins, Plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 6: 2269 – 2272.
- Aslim B., Yuksekdağ Z. N., Sarıkayab E. and Beyatlı Y. 2005** - Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT*, 38: 691 – 694
- Atanassova M., Choiset Y., Dalgalarondo M., Chobert J. M., Dousset X., Ivanova I. and Haertlé T. 2003** - Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *International Journal of Food Microbiology*, 87: 63 – 73.

- Avonts L., Van Uytven E. and De Vuyst L. 2004** - Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *International Dairy Journal*, 14: 947 – 955.
- Aymerich M. T., Garriga M., Monfort J. M., Nes I. and Hugas M. 2000** – Bacteriocin-producing *Lactobacilli* in Spanish-style fermented sausages, Characterization of bacteriocins. *Food Microbiology*, 17: 33 - 45.
- Azcarate-Peril M. A., McAuliffe O., Altermann E., Lick S., Russell W. M. and Klaenhammer T. R. 2005** - Microarray analysis of a two-component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 10: 5794 – 5804.
- Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R. 2005** - Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabia et kabyle". *Sciences et Technologie C*, 23: 30 - 37.
- Barefoot S. F., Chen Y. R., Hughes T. A., Bodine A. B., Shearer M. Y. and Hughes M. D. 1994** - Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 10: 3522 – 3528.
- Barrefoot S. F. and Klaenhammer T. R. 1983** – Detection and activity of lactacin B, a 7bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 6: 1808 – 1815.
- Baudet C. 2002** – La santé de votre intestin. *Alternative Santé*, 2, 94: 3 - 48.
- Bazarre T. L., Wu L. and Yuhas J. A. 1983** - Total and HDL-cholesterol concentrations following yogurt and calcium supplementation. *Nutrition Reports International*, 28: 1225 - 1232.
- Béal C., Fonseca F. and Corrieu G. 2000** - Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty composition. *Journal of Dairy Science*, 84: 2347 - 2356.
- Béal C., Fonseca F. and Corrieu G. 2001** - Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* related to membrane fatty Acid Composition. *Journal of Dairy Science*, 84: 2347 – 2356.
- Béal C., Deschamps N., Juillard V., De Roissart H., Richard J. et Sarauv B. 1997** - Cinétique de croissance et d'acidification des bactéries lactiques, *Bactéries lactiques*, Ed. Lorica, 401 p.
- Beerens H. 1990** - An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Letters in Applied Microbiology*, 11, 3: 155 - 157.
- Beerens H., Romond C. and Neut C. 1980** - Influence of breast-feeding on the bifid flora of the newborn intestine. *American Journal of Clinical Nutrition*, 33: 2434 - 2439.
- Bekhouche F. et Boulahrouf A. 2005** - Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d'élevage de Constantine. *Sciences et Technologie C*, 23: 38 - 45.
- Belfiore C., Castellano P. and Vignolo G. 2007** - Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. *Food Microbiology*, 24: 223 – 229.

- Bendali F., Gaillard-Martinie B., Hebraud M. and Sadoun D. 2008** - Kinetic of production and mode of action of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* anti-listerial bacteriocin, an Algerian isolate. *LWT Food Science and Technology*, **Article in Press**.
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S. and Bottazzi V. 2000** – Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50: 117 - 131.
- Blom H., Katla T., Holck A., Sletten K., Axelsson L. and Holo H. 1999** - Characterization, Production, and Purification of Leucocin H, a Two-Peptide Bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. *Current Microbiology*, 39: 43 – 48.
- Bogovic-Matijasic B. and Rogelj I. 1998** - Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221, production studies in MRS-media at different pH-values and affect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Processes in Biochemistry*, 33: 345 - 352.
- Bonaparte C., Klein G., Kneifel W. et Reuter G. 2001** - Évolution, biodiversité, taxonomie, développement d'un milieu sélectif pour le dénombrement des bifidobactéries dans les laits fermentés. *Lait*, 81: 227 – 235.
- Bouhnik Y., Flourie B., Pochart P., Marteau P., Abensour L., Morin M. C. and Rambaud J. C. 1991** - Oligo-saccharides de synthèse. Aspects nutritionnels, fructo-oligosaccharides et transgalactoside-oligosaccharides. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 26, 6: 418 - 422.
- Bower C.K. and Daeschel M. A. 1995** - Influences on the antimicrobial activity of surface-adsorbed nisin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 15, 3, 227 – 233.
- Boyaval P., Bhugaloo-Vial P., Duffes F., Merivier A., Dousset X et Marrion D. 1998** - Réacteurs à haute densité cellulaire par production de solution concentrée de bactériocine. *Lait*, 78: 129 – 133.
- Bradley D. E. 1967** - Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 31, 4: 230 - 314.
- Cai Y., Nig L. K. and Farber J. M. 1997** – Isolation and characterization of nisine producing by *Lactococcus lactis* sbsp *lactis* from bean-sprouts. *Applied and Environmental Microbiology*, 83: 499 – 507.
- Callewaert R. and De Vuyst L. 2000** - Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2: 606 – 613.
- Cenatiempo Y., Berjeaud J. M. Biet F., Fremaux C., Héchard Y. et Robichan D. 1996** – Bactériocine des bactéries lactiques, données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leur déterminant génétique. *Lait*, 76: 169 – 177.
- Challa A., Rao D. R., Chawan C. B. and Shackelford L. 1997** - *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 18, 3: 517 – 521.
- Champagne C. P. 1998** - Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. La Fondation des Gouverneurs et Edisem (ed), Sainte-Hyacinthe, Canada 213 p.

- Champagne C. P., Gardner N. J. and Roy D. 2005** - Challenges in the addition of probiotic cultures to Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 61 – 84.
- Chapon J. L. et Kiss K. 1991** - Numération des bifidobactéries dans les laits fermentés, proposition pour une méthode microbiologique. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 82, 3: 264 - 277.
- Chevalier P. , Roy D . and Ward P . 1990** - Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods. *Journal of Applied Bacteriology* , 68, 6: 619 - 624.
- Chumchalová J., Stiles J., Josephsenand J. and Plocková M. 2004** - Characterization and purification of acidocin CH5, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* CH5. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 1082 – 1089.
- Cibik R., Marcille F., Corthier G. et Dore J. 2004** - La flore intestinale, mise en place, description et influence du mode d'alimentation. *Archives de Pédiatrie*, 11: 573 – 575.
- Coconnier M. H., Lievin V., Hemery E. and Servin L. A. 1998** - Antagonistic Activity against Helicobacter Infection In Vitro and in vivo by the Human *Lactobacillus acidophilus* Strain LB. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 11: 4573 - 4580.
- Constantin E., Traldi P., Favretto D. et Schnell. A. 1996** - Spectrométrie de Masse: Principes et Applications. Technique et Documentation Lavoisier. 2ème édition, 185 p.
- Corrieu G., Spinnler H. E., Jomier Y. and Picque D. 1988** – procédé de mise en évidence et de contrôle de l'activité acidifiante d'agents de fermentation dans des bains de fermentation et dispositif pour sa mise en œuvre. *French patent*, 88: 44 - 56.
- Daba H., Lacroix C ., Huang J., Simard R.E . and Lemieux L . 1994** - Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *Journal Applied of Bacteriology*, 77, 6: 682 - 688.
- D'Aimmo M. R., Modesto M. and Biavati B. 2007** - Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology* , 115: 35 – 42.
- Dambekodi P. C. and Gilliland S. E. 1998** - Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Science*, 81: 1818 - 1824.
- Davey G. P. 1981** - Mode of action of diplococcin, a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 16: 187 - 190.
- Davey G. P. 1984.** - Plasmid associated with diplococcin production in *Streptococcus cremori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 895 - 896.
- Davey G. P. and Pearce L. E. 1982** - Production of diplococcin by *Streptococcus cremoris* and its transfer to nonproducing group N *Streptococci*, pp. 221-224. in, Schlessinger. D. (ed), Microbiology-1982. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C.
- Davey G. P. and Richardson B. C. 1981** - Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *Applied and Environmental Microbiology*, 41: 84 - 89.

- Denou E., Thammavongs B., Guéguen M. and Panoff J. M., 2005** - Interspecies protection to freezing stress within a microbial community. *Cell Preservation Technology*, 3, 75 - 83.
- Delgado S., O'sullivan E., Fitzgerald G. and Mayo B. 2007** - Subtractive Screening for Probiotic Properties of *Lactobacillus* Species from the Human Gastrointestinal Tract in the Search for New Probiotics. *Journal of Food Science*, 2: 310 – 315.
- Delves- Broughton J. 1990** – Nisine and its applications as a food preservation. *Journal of Dairy Science*, 43: 73 - 76.
- Deraz S. F., Karlsson E. N., Hedström M., Andersson M. M. and Mattiasson B. 2005** - Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal of Biotechnology*, 117: 343 – 354.
- De Roissart H. 1986** – Les bactéries lactiques, lait et produits laitiers, qualité énergie et table de composition, tome 2, Ed. Techniques et Documentation Lavoisier, Paris, 408 p.
- De Roissart H. et Luquet F. M. 1994** – Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques, 1, Uriage, Lorica, 605 p.
- Desmazeaud M. J. 1983** - L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le Lait*, 63, 629-630: 267 - 316.
- Desmazeaud M. J. 1992** - Les bactéries lactiques. Pages 49–62 in Les groupes microbiens d'intérêt laitier. J. Hermier, J. Lenoir, and F. Weber, ed. CEPIL, Paris, France.
- Desmazeaud M. J. 1994** – Les bactériocines des bactéries lactiques et leur utilisation dans l'industrie laitière. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 145, 10: 711 – 719.
- De Villiers V. 1995** - The effect of lactose maldigestion on the stools of young Tswana children. *Journal of Tropical Pediatrics*, 41: 54 - 56.
- De Vuyst, L. and Vandamme E J. 1994** - Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* : properties, biosynthesis, fermentation and application. In: De Vuyst L, Vandamme E J. , editors; De Vuyst L, Vandamme E J. , editors. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Glasgow, United Kingdom: Blackie A and P. pp. 151–221.
- Diep D. B., Havarstein L. S. and Nes I. F. 1996** – Characterization of the Locus Responsible for the Bacteriocin Production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology*, 178, 15: 4472 – 4483.
- Dilmi-Bouras A. 2006** - Assimilation *in vitro* of cholesterol by yogurt bacteria. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine AAEM*, 13: 49 – 53.
- Dilmi-Bouras A. et Sadoun D. 2002** - Survie des ferments du yaourt dans le tube digestif du lapin. *Lait*, 82: 247 – 253.
- Dorshow S.T and Lewitt M.D. 1987** - Gaseous response to ingestion of a poorly absorbed fructooligosaccharide sweetener. *American Journal of Clinical Nutrition*, 46: 61 - 65.
- Drouault S. et Corthier G. 2001** - Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research*, 32: 107 - 117.

- Dubey U. K. and Mistry V. V. 1996** - Effect of bifidogenic factors on growth characteristics of Bifidobacteria in infant formulas. *Journal of Dairy Science*, 79: 1156 - 1163.
- Duggan C., Gannon J. and Walker W. A. 2002** - Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75: 789 - 808.
- Elmer G. W., Surawicz C. M. and McFarland L. V. 1996** - Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infection. *The journal of the American Medical Association*, 275: 870 - 876.
- Ennahar S., Deschamps N. et Richard J. 2000a** - Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins. *Current Microbiology*, 41, 1: 1 - 4.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonornoto K. and Ishizaki A. 2000b** - Class IIa bacteriocins, biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 1: 85 - 106.
- FAO/WHO 2001** - Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. <http://www.who.int/foodsafety/publications/en>.
- Fernandez Murga M. L., Cabrera G. M., Font De Valdez G., Disalvo and Seldes A. M. 2000** - Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 342 – 348.
- Fillipov V. A. 1981** - Certain Properties of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus jugurti* Bacteriocines. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*, 43, 3: 373 - 375.
- Fonseca F., Beal C. and Corrieu G. 2000** - Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *The Journal of Dairy Research*, 67: 83 - 90.
- Fonseca F., Beal C. and Corrieu G. 2001** - Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology*, 43: 189 - 198.
- Fonseca, F., Marin, M. and Morris G. J. 2006** - Stabilization of frozen *Lactobacillus bulgaricus* in glycerol suspensions: freezing kinetics and storage temperature effects. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6474 - 6482.
- Fooks L. J. and Gibson G. R. 2001** - *In vitro* investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 39: 67 - 75.
- Foster J. C., Glass M. D., Courtney P. D. and Ward L. A. 2003** - Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Food Microbiology*, 20: 351 - 357.
- Fujiwara S., Seto Y., Kimura A. and Hashiba H. 2001** - Intestinal transit of an orally administered streptomycin-rifampicin-resistant variant of *Bifidobacterium longum* SBT2928, its long-term survival and effect on the intestinal microflora and metabolism. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 43 - 52.
- Fuller R. . 1989** - Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 5: 365 - 378.

-
- Gale D. C. and Smith R. D. 2005** - Small volume and low flow-rate electrospray ionization mass spectrometry of aqueous samples. *Mass Spectrometry*, 7: 1017 – 1021.
- Garnau S., Martis N. I. and Vederas J. C. 2002** – Two-peptides bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84: 577 – 592.
- Gavini F., Van Esbroeck M., Touzel J. P., Fourment A. and Goossens H. 1996** - Detection of fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK), a key enzyme of the bifid-shunt in *Gardnerella vaginalis*. *Anaerobe*, 2: 191 - 193.
- Gavini F., Pourcher A. M., Nut C., Monget D., Romond C., Oger C. and Izard D. 1991** - Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origins. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41: 548 - 557.
- Gerdes S. 2001** – Fermented foods and healthy digestive functions, Ed. Dannone Vitapole research, USA, 47p.
- Gies A., Singh J. and Teuber M. 1983** – Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 205 – 211.
- Gilliland S. E. 1985a** - Concentrated starter culture. in Bacterial starter cultures for food. Gilliland SE (ed). CRC Press Inc., Boca Raton, USA, 145 - 157.
- Gilliland S. E. 1985b** - Role of starter culture bacteria in food preservation. in Bacterial starter cultures for food. Gilliland SE (ed). CRC Press Inc., Boca Raton, USA: 175 - 185.
- Gilliland S. E. 1990** – Health and nutrition benefits for lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 87: 175 - 188.
- Gomes A. M. P. and Malcata F. X. 1999** – *Bifidobacterium* spp and *Lactobacillus acidophilus*, biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 139 - 157.
- Gomez S ., Cosson C . and Deschamps A. M . 1997** - Evidence for a bacteriocin-like substance produced by a new strain of *Streptococcus* sp., inhibitory to gram-positive food-borne pathogens. [*Research in Microbiology*](#) , 148, 9: 757 - 766.
- Gonzalez C. F. and Kunka B. S. 1987** - Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 2534 - 2538.
- Goulhen F., Meghrous J. and Lacroix C. 1998** - Characterisation of nisin-resistant variants of *Pediococcus acidilactici* UL5. *Applied and Environmental Microbiology*, 85: 387 - 397.
- Gournier-Chateau N., Larpent J. P., Castellanos M. I. and Larpent J. L. 1994** - Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Ed. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, France: 1 - 192.
- Gratia A. 1925** - Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Compte Rendu de la Société de Biologie*, 93, 1040 – 1042.
- Gueimonde M. and Salminen S. 2003** - Probiotics, efficacy in gut health promotion. *Nutrafoods*, 2, 2: 13 - 21.
-

- Gwiazdowska D. and Trojanowska K. 2006** - Antimicrobial activity and stability of partially purified bacteriocins produced by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* and ssp. *Shermanii*. *Lait*, 86: 141 - 154.
- Hamdan I. Y. and Mikolajick E. M. 1974** – Acidilin, an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. *The Journal of Antibiotics*, 27, 8: 631 - 636.
- Hastings J. W. and Stiles M. E. 1991** - Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 127 - 134.
- Hécharde Y., Derijard B., Letellierand F. and Cenatiempo Y. 1992** - Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of General Microbiology*, 138: 2725 – 2731.
- Heyman M. et Heulevin E. 2006** - Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique, le paradoxe. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20, 2: 85 - 94.
- Hirsch A. 1951** - The assay of the antibiotic nisin. *Journal of General Microbiology*, 4: 70- 88.
- Hitchins A. D. and Mc Donough A. 1989** - Prophylactic and therapeutic aspects of fermented milk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 49: 675 - 684.
- Holck A., Axelsson L., Birkeland S. E., Aukrust T. and Blom H. 1992** - Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *Journal of General Microbiology*, 138: 2715 - 2720.
- Holo H., Nilssen B. and Nes I. 1991** - Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, isolation and characterization of the protein and its gene. *Journal of Bacteriology*, 173: 3879 - 3887.
- Holzappel W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. and Huis in't Veld J. H. J. 1998** - Overview of ,gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 85 - 101.
- Jiang T., Mustapha A. and Savaiano D. A. 1996** - Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Sciences*, 79: 750 - 757.
- Jiménez-Díaz R., Ríos-Sánchez R. M., Desmazeaud M., Ruiz-Barba J. L. and Piard J. C. 1993** - Plantaricins S and T, Two New Bacteriocins Produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 Isolated from a Green Olive Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 5: 1416 - 1424.
- Jiménez-Díaz R., Ruiz-Barba J. L., Cathcart D. P., Holo H., Nes I. F., Sletten K. H. and Warner P. J. 1995** - Purification and Partial Amino Acid Sequence of Plantaricin S, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the Activity of Which Depends on the Complementary Action of Two Peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 12: 4459 – 4463.
- Joerger M. C. and Klaenhammer T. R. 1986** - Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology*, 167: 439 - 446.
- Joerger M. C. and KLaenhammer T. R. 1990** - Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 geneencoding the bacteriocin helveticin. *Journal of Bacteriology*, 172: 6339 - 6347.

- Juarez Tomás M. S., Wiese B., de Ruiz Holgado A. A. P. and Nader-Macías M. E. 2002** - Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 714 – 724.
- Jung G. and Sahl H. G. 1991** - Nisin and novel Lantibiotics, *Escom Publishers*, Leiden, The Netherlands, 490 p.
- Kanatani K., Tahara T., Yoshida K., Miura H., Sakamoto M. and Oshimura M. 1992** – Plasmid-associated bacteriocin production and immunity of *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56, 4: 648 – 651.
- Klaenhammer T. R. 1988** – Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337 – 349.
- Klaenhammer T. R. 1993** – Genetic of bacteriocines produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology*, 12: 39 - 89.
- Klaenhammer T. R., Ahn C. and Muriana P. M. 1994** - Lactacin F, a small hydrophobic heat-stable bacteriocin from *Lactobacillus johnsonii*, p. 377–396. In De Vuyst L. and Vandamme E. J. (ed.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Chapman and Hall, London.
- Kashket E. R. 1987** - Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Letters*, 46: 233 – 244.
- Kostinek M., Specht I., Edward V. A., Pinto C., Egounlety M., Sossa C., Mbugua S., Dortu C., Thonart P., Taljaard L., Mengu M., Franz C. M. A. P. and Holzapfel W. H. 2007** - Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 342 – 351.
- Lachance M. 2000** - Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *Loctococcus lactis* ssp. *lactis* MJCl5. Département des sciences des aliments et de nutrition. Québec, Université Laval. 66 p.
- Langella P., Sebastien N., Commissaire J., Bolotine A., Gruss A. et Le Loir Y. 2001** – Caractérisation des facteurs d'hôtes affectant la sécrétion des protéines hétérologues chez *Lactococcus lactis*. *Lait*, 81: 19 - 28.
- Larpent J. P. 1997** – Technique de laboratoires, microbiologie alimentaire, Ed. 2 Techniques et Documentations Lavoisier, Paris, 1073 p.
- Latrille E., Picque D., Perret B. and Corrieu G. 1992** - Characterizing acidification kinetics by measuring ph and electrical conductivity in batch thermophilic lactic fermentations. *Journal of fermentation and bioengineering*, 74, 01: 32 – 38.
- Leahy S. C., Higgins D. G., Fitzgerald G. F. and Van Sinderen D. 2005** - A Review Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1303 – 1315.
- Leclercs H., Gaillard T. L. et Simon M. 1995** – Les bactéries et le monde bactérien Ed. Doin, Paris, 182 P.
- Lee N. K. and Paik H. D. 2001** - Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal. *Food Microbiology*, 18, 1: 17 - 24.

- Lejeune R., Callewaert R., Crabbé K. and De Vuyst L. 1998** – Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. *Applied and Environmental Microbiology*, 84: 159 - 168.
- Leveau J. Y., Bouix M. et Roissart H. 1991** – La flore lactique, in technique d'analyse et contrôle dans les industries agro-alimentaire. APRIA. Ed. Techniques et Documentations, Paris: 152 - 183.
- Lewus C. B., Kaiser A. and Montville T. J. 1991** – Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocine from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 6: 1983 - 1688.
- Loghavi L., Sastry S. K. and Yousef A. E. 2008** - Effect of moderate electric field frequency on growth kinetics and metabolic activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology Progress*, 24: 148 - 153.
- Luquet F. M. et Bonjean-Linctowsky Y. 1986** – Laits et produits laitiers, vache, brebis et chèvre, Ed. ADRIA, Paris, 445P.
- Marteau P. et Rambaud J. 1998** - Probiotiques en gastroentérologie, bases rationnelles, effets démontrés et perspectives. *Hepato-Gastrology*, 4, 5: 267- 273.
- Marteau P., Flourie B., Pochart P., Chastang C., Desjeux J. F. and Rambaud J. C. 1990** - Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose, an *in vivo* study in lactase-deficient humans. *The British Journal of Nutrition*, 64: 71 - 79.
- Martinez B., Sulrez J. E. and Rodriguez A. 1995** - Antagonistic activities of wild lactococcal strains isolated from homemade cheeses. *Journal of Food Protection*, 58: 1118 - 1123.
- Martinez B., Suirez J. E. and Rodriguez A. 1996** - Lactococcin 972: a homodimeric lactococcal bacteriocin whose primary target is not the plasma membrane. *Microbiology*, 142: 2393 - 2398.
- Mataragas M., Metaxopoulos J., Galiotou M. and Drosinos E. H. 2003** - Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, 64: 265 – 271.
- Mattick A. T. R. and Hirsch A. 1944** - A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature*, 154: 551 - 553.
- Meghrou J., Lacroix C. and Simard R. E. 1999** – The effect of vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 16: 105 – 114.
- Meghrou J., Euloge P., Juneiies A. M., Bailonge J. and Petitidemange H. 1990** - Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. *Biotechnology letters*, 12: 575 - 580.
- Meile L., Ludwig W., Rueger U., Gut C., Kauffmann P., Dasen G., Wenger S. and Teuber M. 1997** - *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Systematic and Applied Microbiology*, 20, 1: 57 - 64.
- Metchnikoff E. 1907** - In the prolongation of life, optimistic studies, in, Chalmers M. (Eds.), William Heinemann, London.

- Misra A. K. and Kuila R. K. 1992** - Use of *Bifidobacterium bifidum* in the manufacture of bifidus milk and its antibacterial activity. *Lait*, 72: 213 – 220.
- Mitsuoka T. 1984** - Taxonomy and ecology of Bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora*, 3, 1: 11 - 28.
- Mitsuoka T. and Kaneuchi C. 1977** - Ecology of the bifidobacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 30: 799 - 1810.
- Modler H. W., McKellar R. C. and Yaguchi M. 1990** - Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 23: 29 - 41.
- Mofredj A., Bahloul H. and Chanut C. 2007** - *Lactococcus lactis*, an opportunistic bacterium?. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 37, 4: 200 - 207.
- Moll G. O., Ubbink-Kok T., Hildeng-Hauge H., Nissen-Meyer J. O., Nes I. F., Konings W. N and Driessen A. J. M. 1996** - Lactococin G is a potassium ion conducting two component bacteriocin. *Journal of Bacteriology*, 178: 60 - 605.
- Monnet C., Beal C. and Corrieu G. 2003** - Improvement of the resistance of *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* to freezing by natural selection. *Journal of Dairy Science*, 86: 3048 - 3053.
- Moon G. S., Pyun Y. R., Park M. S., Ji G. E. and Kim W. J. 2005** - Secretion of Recombinant Pediocin PA-1 by *Bifidobacterium longum*, using the Signal Sequence for Bifidobacterial α -Amylase. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 9: 5630 – 5632.
- Moreau M. L. C. 2001a** – Les probiotiques, des microorganismes bénéfiques pour notre système immunitaire. *CHOLE-doc*, 63, 1 – 4.
- Moreau M. L. C. 2001b** – Microflore intestinale, prébiotiques, probiotique et immunomodulation. *NAFAS Sciences*, 6: 19 – 25.
- Mortvedt-Abildgaard C. I., Nissen-Meyer J., Jelle B., Grenov B., Skaugen M. and Nes I. 1995** – Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1: 175 - 179.
- Mortvedt C. I., Nissen-Meyer J., Sletten K. and Nes I. F. 1991** - Purification and amino acid sequence of lactocin s, a bacteriocin produced by *lactobacillus sake* l45. *Applied and environmental microbiology*, 57, 6: 1829 – 1834.
- Mulders J. W. M., Boerrigter I. J., Rollema H. S., Siezen R. J. and De Vos W. M. 1991** - Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *European Journal of Biochemistry*, 201: 581 – 584.
- Muriana F. J. G., Sánchez M. C., Rodolfo J. D., Alvarez-Ossorio M. C. and Relimpio A. M. 1987** - Optimization of the cell envelope disruption of extremely halophilic bacteria. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 14, 1: 19 - 28.
- Muriana P. M. and Klaenhammer T. R. 1987** - Conjugal Transfer of Plasmid-Encoded Determinants for Bacteriocin Production and Immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 3: 553 - 560.
- Muriana P. M. and Klaenhammer T. R. 1991a** - Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 114 - 121.

- Muriana P. M. and Klaenhammer T. R. 1991b.** - Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *Journal of Bacteriology*, 173: 1779 - 1788.
- Nagawa M., Nakabayashi A. and Fujino S. 1987** - Preparation of the bifidus milk powder. *Journal of Dairy Science*, 71: 1777 – 1785.
- Naim H. Y. 2001** - Molecular and cellular aspects and regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *Histology and Histopathology*, 16: 553 - 561.
- Naito H. K., Yamaguchi A., Fujimoto N., Hasui Y., Kuramoto H., Iguchi A. and Kinukawa N. 2007** - Prevention of Recurrence With Epirubicin and *Lactobacillus Casei* After Transurethral Resection of Bladder Cancer. *The Journal of Urology*, 179: 485 - 490.
- Nes I. F., Diep D. B., Håvarstein L. S., Brurberg M. B., Eijsink V. and Holo H. 1996** - Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 2 - 4.
- Nissen-Meyer J., Holo H., Havarstein L. S., Sletten K. and Nes I. F. 1992** - A Novel Lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology*, 174, 17: 5686 - 5692.
- Nord C. E., Kager L., Philipson A. and Stiernstedt G. 1984** - Impact of imipenem/cilastatin therapy on faecal flora. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 3, 5: 475 - 477.
- Oh S., Kim S. H. and Worobo R. W. 2000** - Characterization and Purification of a Bacteriocin Produced by a Potential Probiotic Culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *Journal of Dairy Science*, 83: 2747 – 2752.
- Orla-Jensen S. 1919** – The lactic acid bacteria, *Copenhagen: Host and Son*, 74: 131 - 142.
- Osterlund B. and Janson J. C. 1997** - A strategic approach to protein purification, Part 1. *Science Tools*, 2, 3: 8 - 10.
- Osuntoki A. A., Omonigbehin E. A., Gbenebitse S. O. and Mojiminiyi U. E. 2007** - Prevention of salt induced hypertension in rats by oral administration of *Lactobacillus acidophilus* Yoghurt. *Nigerian Food Journal*, 25, 1: 184 – 189.
- Oxford A. E. 1944** - Diplococcin, an anti-bacterial protein elaborated by certain milk streptococci. *The Biochemical Journal*, 38: 178 - 182.
- Panda A. K., Rao R., Savaram S., Raju M., Sharma V. L. N. and Sita S. 2008** - Effect of probiotic (*Lactobacillus sporogenes*) feeding on egg production and quality, yolk cholesterol and humoral immune response of White Leghorn layer breeders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1: 43 – 47.
- Pasteur L. and Joubert J. F. 1877** - Charbon et septicémie. *C. R. Soc. Biol., Paris* 85, 101 – 115.
- Piard J. C. and Desmazeaud M. J. 1991** - Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le Lait*, 71, 5: 525 - 541.
- Piard J. C. and Desmazeaud M. J. 1992** - Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria, bacteriocins and other antibacterial substances. *Le Lait*, 72, 2: 113 - 142.

- Pillai S. D. and Jesudhasan P. R. 2006** - Quorum sensing: How bacteria communicate, understanding bacterial cell-to-cell communication can reduce foodborne disease and retard food spoilage. *Food Technology*, 60, 4: 42-49.
- Playne M. and Salminen S. 2002** - Health benefits of probiotics, human studies and clinical trials. *Nutrafoods*, 1, 1: 5 - 11.
- Pochapin M. 2000** - The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhea. *American Journal of Gastroenterology*, 95: 11 – 13.
- Poch M. and Bezkorovainy A. 1991** - Bovine milk #-Casein trypsin digest is a growth enhancer for the genus *Bifidobacterium*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 39: 73 – 77.
- Poupard J. A., Husain I. and Norris R. F. 1973** - Biology of the bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 37: 136 - 165.
- Prescott L. M., Harley J. P. et Kkin D. A. 2007** – *Microbiologie*, 2^{ème} édition Française, De bock édition, Paris, 1137 p.
- Proulx M., Gauthier S. F. et Roy D. 1992** - Utilisation d'hydrolysats enzymatiques de caséine pour la croissance des bifidobactéries. *Le Lait*, 72, 4: 393 - 404.
- Quadri L. E. N., Sailer M., Terebiznik M. R., Roy K. L., Vederas J. C. and Stiles M. E. 1995** - Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *Journal of Bacteriology*, 177, 5: 1144 – 1151.
- Rammelsberg M. and Radier F. 1990** - Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 69: 177 - 184.
- Rammelsberg M., Muller E. and Radler F. 1990** - Caseicin 80, purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Archives of Microbiology*, 154: 249 - 252.
- Reuter G. 2002** - The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine, composition and succession. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2: 43 - 53.
- Richard C., Ca#on R., Naghmouchi K., Bertrand D., Prévost H. and Drider D. 2006** - Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiology*, 23: 175 – 183.
- Rogers L. A. 1928** - The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*, 16: 321 – 325.
- Rollema H. S., Metzger J. W., Both P., Kuipers O. P. and Siezen R. J. 1996** - Structure and biological activity of chemically modified nisin a species. *European Journal of Biochemistry*, 241: 716 - 722.
- Romeo Y., Bouvie R. J. et Gutierrez C. 2001** - La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum*, *Lait*, 81: 49–55.
- Romond M. B. et Romond C. 1987** – *Bifidobacterium*: leur écologie et leur Importance en santé humaine. *Médecine et Chirurgie Digestives*, 16: 2 - 5.
- Romond C., Beerens H., Neut C. and Montreuil J . 1980** - Humanization of milk, "in vitro" influence of human milk, cow milk and infant formulae on the growth of "*Bifidobacterium*" (author's transl). *Annals of Microbiology*, 131, 3: 309 - 314.

- Rowland I. R., Rumney C. J., Coutts J. T. and Lievense L. C. 1998** - Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 19, 281 - 285.
- Roy D. 2005** - Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Lait*, 85, 39: 39 – 56.
- Roy D. and Ward P. 1990** – Evaluation of rapid methods of differentiation of *Bifidobacterium* species. *Journal Applied Bacteriology*, 69: 739 – 749.
- Sahi T. 1994** - Hypolactasia and lactase persistence, *Scand. J. Gastroenterol.*, 29, 1 - 6.
- Sahl A. G. and Bierbaum G. 1998** - Lantibiotics, biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 52: 41 - 79.
- Salminen S. and Salminen E. 1997** - Lactulose, lactic acid bacteria, intestinal microecology and mucosal protection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 222: 45 - 48.
- Salminen S. and Saxelin M. 1996** - Comparison of successful probiotic strains. *Nutrition Today*, 31: 32 - 34.
- Sanders M. and Huis in't Veld J. 1999** - Bringing a probiotic-containing functional food to the market, microbiological, product, regulatory and labelling issues. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 293 - 315.
- Sartor R. B. 2004** - Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: Antibiotics, probiotics and prebiotics. *Gastroenterology*, 126: 1620 - 1633.
- Schaafsma G. 1996** - State of the art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutrition Newsletter*, 5: 23 - 24.
- Schägger H. and Von Jagow G. 1987** - Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166: 368 - 379.
- Schillinger U. and Lücke F. K. 1989** - Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1901 - 1906.
- Schved F., Lalazar A., Henis Y. and Juven B. J. 1993** - Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin S J- 1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74: 67 - 77.
- Shermak M. A., Saavdra J. M., Jackson T. L., Huang S. S., Bayless T. M. and Perman J. A. 1995** - Effect of yogurt on symptoms and kinetics of hydrogen production in lactose-malabsorbing children. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62: 1003 - 1006.
- Stoddard G. W., Petzei J. P., Van Belkum M. J., Kok J. and McKay L. L. 1992** – Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* WM4. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1952 - 1961.
- Tagg J. R. 1992**. Bacteriocins of Gram-positive bacteria; an opinion regarding their nature, nomenclature, and numbers, pp. 33-36. In, *James, R., Lazdunski, C., Pattus, F.* (eds), *Bacteriocins, microcins and lantibiotics*. NATO AS1 series.

- Tagg J. R., Dajani A. S. and Wannamaker L. W. 1976** – Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 40, 3: 722 – 756.
- Tamime A. Y., Marshall V. M. and Robinson R. K. 1995** - Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Research*, 62, 1: 151 - 187.
- Tamura Z. 1983** - Nutrition of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora*, 2: 3 – 16.
- Tanaka R., Takayama H., Morotomi M., Kuroshima T., Ueyama S., Matsumoto K., Kuroda A. and Mutai M. 1983** - Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human flora. *Bifidobacteria microflora*, 2:17 – 24.
- Tannock G. W. 1997** - Probiotic properties of lactic-acid bacteria, plenty of scope for fundamental R&D. *Trends in Biotechnology*, 15: 270 - 274.
- Teixeira De Carvalho A. A., Aparecida De Paula R., Mantovani H. C. and Alencar De Moraes C. 2006** - Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. *Food Microbiology*, 23: 213 – 219.
- Ten Brink B., Huis in't veld J. H. J. and Minekus M. 1990** – Antimicrobial activity of *Lactobacillus* M46, Optimisation of production and partial characterization. *Microbiology Reviews*, 87, p 91.
- Ten Brink B ., Minekus M ., Van der Vossen J. M ., Leer R. J . and Huis in't Veld J. H . 1994** - Antimicrobial activity of lactobacilli, preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 2: 140 - 148.
- Terada A., Hara H., Kataoka M. and Mitsuoka T. 1992** - Effect of lactulose on the composition and metabolic activity of the human faecal flora. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 5, 1: 43 - 50.
- Thompson J. 1987** - Sugar transport in the lactic acid bacteria, p. 13–38. In J. Reizer and A. Peterkofsky (ed.), Sugar transport and metabolism in gram-positive bacteria. Ellis Horwood, Chichester, Great Britain.
- Thompson J. K., Collins M. A. and Mercer W. D. 1996** - Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 3: 338 - 348.
- Tichaczek P. S., NisenMeyer J., Nes I. F., Vogei R. F. and Hammes W. P. 1992** - Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curuactus* LTH 1174 and sakacin P fmm *L. sake* LYH673. *Systematic and Applied Microbiology*, 15: 460 - 468.
- Toba T., Yoshioka E. and Itoh T. 1991a** –Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT1060. *Letters in Applied Microbiology*, 12, 4: 106 - 108.
- Toba T., Yoshioka E. and Itoh, T. 1991b** - Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Letters in Applied Microbiology*, 12: 43 - 45.
- Toora S . 1995** - Partial purification and characterization of bacteriocin from *Yersinia kristensenii*. *Journal Applied of Bacteriology*, 78, 3: 224 - 228.

- Tsvetkov T. and Shishkova I. 1982** - Studies on the effects of low temperatures on lactic acid bacteria. *Cryobiology*, 19, 2: 211 - 214.
- Työppönen S., Markkula A., Petäjä E., Suihko M. L. and Mattila-Sandholm T. 2003** - Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. *Food Control*, 14: 181 – 185.
- Upreti G. C. and Hinsdill R. D. 1973** - Production and Mode of Action of Lactocin 27, Bacteriocin from a Homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7, 2: 139 - 145.
- Vadyvaloo V., Arous S., Gravesen A., Héchard Y., Chauhan-Haubrock R., Hastings J. W. and Rautenbach M. 2004** – Cell-surface in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology*, 150: 3025 - 3033.
- Van Belkum M. J., Kok J. and Venema G. 1992** - The bacteriocin lactococcin A specifically increases the permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *Journal of Bacteriology*, 173: 7934 - 7941.
- Van Belkum M. J., Haeyma B. J., Geis A., Kok J. and Venema G. 1989** - Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 5: 1187 - 1191.
- Van Belkum M. J., Hayema B. J., Jeeninga R. E., Kok J. and Venema G. 1991** - organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 492 - 498.
- Van den Berghe E., Skourtas G., Tsakalidou E. and De Vuyst L. 2005** - *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 produces the lantibiotic, macedocin, at temperature and pH conditions that prevail during cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology*. 1: 13 – 16.
- Vanderhoof J. A. and Young R. 1998** - Use of Probiotics in Childhood Gastrointestinal Disorders. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 27, 3: 323 – 332.
- Vaughan E. E., Daly C. and Fitzgerald G. F. 1992** - Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *Journal of Applied Bacteriology*, 73: 299 - 308.
- Venema K., Dost M. H., Venema G. and Kok J. 1996** - Mutational analysis and chemical modification of Cys24 of lactococcin B, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, 142: 2825 - 2830.
- Venema K., Abee T., Haandriknan A. J., Leenhouts K. J., Kok J., Konings W. N. and Venema G. 1993** - Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Locrococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1041 - 1048.
- Verluyten J., Messens W. and De Vuyst L. 2004** - Sodium chloride reduces production of curvacin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* strain LTH 1174, originating from fermented sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4: 2271 – 2278.
- Vesa T., Pochart P. and Marteau P. 2000** - Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis*

MG1363 in the human gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 14: 823 - 828.

Vignolo G., Fadda S., De Kairuz M. N., De Ruiz Holgado A. A. P and Oliver G. 1996 - Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by 'Lactocin 705', a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *International Journal of Food Microbiology*, 29: 397 - 402.

Ward P. and Roy D. 2005 - Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Lait*, 85, 23: 23 – 32.

Wijsman M. R., Johanna L. P. Hereijgers M. and Groote J. M. 1989 – Selective enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 43: 395 - 405.

Yang R., Johnson M. C. and Ray B. 1992 – Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3355 - 3359.

Yang R., Johnson M. C. and Ray B. 1994 – Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 11: 281 – 291.

Yazawa K ., Imai K . and Tamura Z . 1978 - Oligosaccharides and polysaccharides specifically utilizable by bifidobacteria. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 26, 11: 3306 – 3311.

Zadi-Karam H. et. Karam N. E. 2005 - Bactéries lactiques du lait de chamelle. *Renc.Rech.Ruminants*, 12: 339.

Zamfir M., Callewaert R., Cornea P. C. and De Vuyst L. 2000 - Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *FEMS Microbiology Letters*, 190: 305 - 308.

Zamfir M., Callewaert R., Cornea P. C., Savu L, Vatafu I. and De Vuyst L. 1999 - Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 923 - 931.

Zourari A. et Desmazeaud M. J., 1991 – caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées du yaourts artisanaux grecs – II. Souches de *Lactobacillus delbrueckii* sbsp *bulgaricus* et cultures mixtes avec *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*. *Le lait*, 71, 4, 463 – 482.

ANNEXES

- Composition des milieux:
- Milieu MRS (Man, Rogosa et Sharp):
- Glucose: 20 g
- Peptone: 10 g
- Extraits de viande de boeuf: 8 g
- Acétate de sodium, 3H₂O: 5 g
- Extrait de levure: 4 g
- K₂HPO₄: 0,2 g
- Citrate d'ammonium: 2 g
- MgSO₄.7 H₂O: 0,2 g
- MnSO₄.4 H₂O: 0,05g
- Tween 80: 1 mL
- pH à ajuster à 6,8 à 7, autoclaver à 120°C/15 mm
- Milieu MRS cystéiné:
- Milieu MRS + cystéine à raison de 0,1%
- pH à ajuster à 6,4 additionné de 15 µg/ mL d'acide nalidixique
- Milieu M17:
- Tryptone: 2,5 g/L
- Tryptone pepsique de viande: 2,5 g/L
- Extrait de viande: 5 g/L
- Extrait autolytique de levure: 2,5 g/L
- Lactose: 5 g/L
- glycerophosphate de Na: 19 g/L
- Sulfate de Mg: 0,25 g/L
- Acide ascorbique: 0,5 g/L
- Eau distillée: 1000 mL
- pH = 7,7
- Autoclaver à 120°C./ 15 min
- Gélose nutritive:
- Peptone: 5 g
- Glucose: 5 g
- Extrait de levures: 3 g
- Agar agar: 15 g
- Eau distillé: 1000 mL
- Eau physiologique:
- NaCl: 9 g
- Peptone: 1 g
- Eu distillée: 1000 mL
- Autoclaver à 120°C /20 min
- Lait écrémé reconstitué:
- Poudre de lait écrémé: 90 à 92 g

- Eau distillée: 1000 mL
- Répartir en tube à essai à raison de 9 mL et stérilisé à 110°C pendant 20 min

Tableau 2: Origines et conditions de culture des souches cibles

Bactérie	Origine de la souche	Conditions de culture
<u>Gram positive</u> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> 340 <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Bacillus subtilis</i> <u>Gram négative</u> <i>Escherichia coli</i> (EPEC) <i>Salmonella thyphimurium</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	laboratoire d'hygiène Blida Danisco, Dangé-Saint-Romain laboratoire d'hygiène, Blida Selles nourrissons âgé d'un mois Selles nourrissons âgé d'un mois Selles nourrissons âgé d'un mois (Hôpital Blida, Algérie) Institut Pasteur, Alger Institut Pasteur, Alger Institut Pasteur, Alger Institut Pasteur, Alger Hopital Ben Boulaid, Blida Institut Pasteur, Alger Institut Pasteur, Alger	MRS, 37°C MRS, 37°C M17, 42°C MRS cystéiné, 37°C MRS cystéiné, 37°C MRS cystéiné, 37°C (TSB; tryptic soy broth), 37°C (TSB; tryptic soy broth), 37°C (TSB; tryptic soy broth), 30°C (désoxycholate 1‰), 37°C (Bouillon nutritif), 37°C Bouillon nutritif, 42°C SS bouillon, 37°C Bouillon nutritif, 37°C

Tableau 3: Gel de l'électrophorèse (gel principal: 15% acrylamide, tri 0,33M, 0,1%SDS).

Composants	Gel principal	(gel de rattrapage) Staking gel
Acrylamide 40%	1,5 mL	0,2 mL
Tri 2M pH 8,8	0,665 mL	
Tri 0,8M pH 6,8	/	0,300 mL
Eau	1,835 mL	2,00 mL
Sodium dodécyl sulfate (SDS) 10%	40 µL	25 µL
persulfate d'ammonium (APS) 10% (p/v)	40 µL	20 µL
Tetraméthyl-ethylene-diamine (TEMED)	8 µL	4 µL

TEMED et APS sont les agents de polymérisation

SDS se lie aux protéines et empêche son repliement et lui confère une charge nette négative.

Tableau 4: Composition des solutions de coloration et de décoloration (SDS PAGE)

Composition	Solution de coloration	Solution de décoloration
Eau Méthanol Acide acétique glacial Coomassie Brillant Bleue R-250	45 mL 45 mL 10 mL 250 mg	45 mL 45 mL 10 mL 0 mg

Tampon de charge pH 6,8:

Tris-HCl 50 mM pH 6,8

SDS 0,1%(p/v),

bleu de bromophénol 0,1% (p/v)

Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones isolées

glycérol 10% (v/v).

Tableau 5: Résultats d'identification des lactobacilles (*Lb. acidophilus*) (galerie API 20 A).

Tests	Substrat	Résultats
ONPG	Ortho-nitro-phenyl galactoside	+
ADH	Arginine	-
LDC	Lysine	+
ODC	Ornithine	+
CIT	Citrate de Na	+
H ₂ S	Thiosulfate de Na	+
UREE	Urée	-
TDA	Tryptophane	+
IND	Inositol	-
VP	Pyruvate de Na	+
GEL	Gélatine de Kohn	+
GLU	Glucose	+
MAN	Manitol	-
INO	Inositol	-
SOR	Sorbitol	-
RHA	Rhamnose	+
SAC	Saccharose	-
MEL	Melibiose	-
ARA	Aréabinose	-

Tableau 6: Résultats d'identification des bifidobactéries (*Bf. infantis*)(galerie API 20 A).

Test	Substrat	Résultats
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-galactoside	-
ADH	Arginine	+
LDC	Lysine	+
ODC	Ornithine	-
CIT	Citrate de Na	+
H ₂ S	Thiosulfate de Na	-
UREE	Urée	+
TDA	Tryptophane	+
IND	Inositol	-
VP	Pyruvate de Na	+
GEL	Gélatine de Kohn	-
GLU	Glucose	+/-
MAN	Manitol	+
INO	Inositol	+/-
SOR	Sorbitol	+
RHA	Rhamnose	+
SAC	Saccharose	+
MEL	Melibiose	+
ARA	Aréabinose	+

Tableau7: Résultats d'identification des streptocoques (*Sc. thermophilus*) (galerie API 20 A)

Test	Substrat	Résultats
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-galactoside	+
ADH	Arginine	-
LDC	Lysine	+
ODC	Ornithine	+
CIT	Citrate de Na	-
H ₂ S	Thiosulfate de Na	+
UREE	Urée	+
TDA	Tryptophane	+
IND	Inositol	+
VP	Pyruvate de Na	+
GEL	Gélatine de Kohn	+
GLU	Glucose	+
MAN	Manitol	-
INO	Inositol	-
SOR	Sorbitol	-
RHA	Rhamnose	-
SAC	Saccharose	+
MEL	Melibiose	+
ARA	Aréabinose	-

Tableau 9: Mesures du pH du lait écrémé ensemencé avec les trois meilleures souches de chaque espèce parmi les 52 souches en fonction du temps (heures)

Souches	0	2	4	6	8	24
<i>Bf. adolescentis</i> 2	6,80	6,60	6,30	5,90	5,50	4,80
<i>Bf. adolescentis</i> 3	6,80	6,65	6,33	5,90	5,54	4,89
<i>Bf. adolescentis</i> 4	6,80	6,56	6,30	6,00	5,65	5,00
<i>Bf. bifidum</i> 4	6,80	6,40	6,10	5,80	5,46	4,60
<i>Bf. bifidum</i> 5	6,85	6,55	6,29	6,00	5,68	5,20
<i>Bf. bifidum</i> 6	6,82	6,50	6,20	5,90	5,70	5,32
<i>Bf. infantis</i> 1	6,70	6,40	6,00	5,75	5,55	5,43
<i>Bf. infantis</i> 3	6,74	6,47	6,10	5,80	5,50	5,40
<i>Bf. infantis</i> 5	6,70	6,44	6,10	5,95	5,70	5,50
<i>Bf. longum</i> 2	6,80	6,55	6,20	6,00	5,64	5,43
<i>Bf. longum</i> 4	6,80	6,50	6,30	6,00	5,64	5,42
<i>Bf. longum</i> 5	6,82	6,52	6,32	6,10	5,70	5,50
<i>Bf. breve</i> 2	6,75	6,40	6,20	5,94	5,74	5,56
<i>Bf. breve</i> 3	6,79	6,47	6,27	6,00	5,71	5,54
<i>Bf. breve</i> 5	6,70	6,35	6,10	5,70	5,57	5,35
<i>Sc. thermophilus</i> 3	7,00	6,80	6,61	6,44	6,10	5,85
<i>Sc. thermophilus</i> 6	6,90	6,81	6,60	6,42	6,00	5,80
<i>Sc. thermophilus</i> 7	6,91	6,82	6,63	6,45	6,23	5,00
<i>Lb. acidophilus</i> 1	6,70	6,53	6,34	6,00	5,84	5,10
<i>Lb. acidophilus</i> 6	6,71	6,32	5,80	5,35	5,15	4,85
<i>Lb. acidophilus</i> 11	6,70	6,30	5,75	5,30	4,90	4,50

Tableau 10: Log du nombre des UFC/mL des trois meilleures souches de chaque espèce parmi les 52 souches en fonction du temps (heures)

Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones isolées

Souches	0	2	4	6	8	24
<i>Bf. adolescentis</i> 2	9,10	9,47	9,84	10,23	11,6	5,90
<i>Bf. adolescentis</i> 3	9,40	9,75	10,10	10,45	11,00	5,90
<i>Bf. adolescentis</i> 4	8,70	9,20	9,65	10,10	10,50	4,40
<i>Bf. bifidum</i> 4	9,84	10,30	10,58	10,90	11,95	6,10
<i>Bf. bifidum</i> 5	9,00	9,35	9,70	10,10	10,53	5,50
<i>Bf. bifidum</i> 6	8,47	8,80	9,25	9,60	10,00	5,00
<i>Bf. infantis</i> 1	9,15	9,30	9,70	9,95	10,25	5,48
<i>Bf. infantis</i> 3	10,00	10,50	10,98	11,40	11,90	6,80
<i>Bf. infantis</i> 5	7,40	7,75	8,00	8,38	8,78	4,45
<i>Bf. longum</i> 2	9,32	9,60	9,95	10,30	10,60	7,70
<i>Bf. longum</i> 4	8,00	8,36	8,80	9,60	9,97	6,50
<i>Bf. longum</i> 5	10,10	10,45	10,83	11,25	11,74	6,00
<i>Bf. breve</i> 2	9,60	9,95	10,30	10,78	11,30	6,47
<i>Bf. breve</i> 3	7,54	7,93	8,40	8,80	9,34	4,68
<i>Bf. breve</i> 5	8,00	8,41	8,84	9,50	9,70	6,40
<i>Sc. thermophilus</i> 3	7,10	7,48	7,90	8,28	8,60	6,10
<i>Sc. thermophilus</i> 6	6,30	6,66	7,20	7,60	8,10	5,45
<i>Sc. thermophilus</i> 7	8,84	9,18	9,60	10,23	10,65	7,84
<i>Lb. acidophilus</i> 1	9,48	9,85	10,15	10,90	11,28	5,70
<i>Lb. acidophilus</i> 6	10,00	10,30	10,77	11,32	11,78	7,45
<i>Lb. acidophilus</i> 11	10,20	10,57	10,98	11,42	11,82	7,94

Tableau 12: Evolution de la production de la bactériocine par *Lb. acidophilus* 11 envers *Lb. bulgaricus*

340

Temps (h)	DO	pH	Zi (mm)
0		6,27	0
1	0,15	6,22	0
2	0,25	6,08	0
3	0,68	5,81	0
4	1,30	5,45	0
5	2,10	5,06	5
6	2,90	4,78	6
7	3,60	4,61	7
8	3,70	4,51	8
9	3,80	4,42	8
10	3,83	4,38	9
11	3,80	4,36	8
12	3,72	4,34	7
13	3,50	4,29	6
14	3,28	4,27	5
15	3,00	4,22	5
16	2,85	4,20	4
17	2,40	4,18	3
18	2,00	4,15	3

Zi: diamètre d'inhibition (mm)

Dilution	Log dilution	DO	Zi (mm)
1	0,00	0,000	18
0,50	-0,30	0,013	16
0,20	-0,70	0,133	14
0,10	-1,00	0,220	12
0,05	-1,30	0,357	09
0,02	-1,70	0,463	07
0,01	-2,00	0,510	05
0,005	-2,30	0,593	02
0,002	-2,70	0,660	00

Moyenne de DO de *Lb. bulgaricus* 340 de trois essais

Zi: moyenne du diamètre d'inhibition de trois essais (en mm)

Tableau 14: Mesure de la DO de *Lb. bulgaricus* 340 en fonction de la concentration du SBAet du diamètre d'inhibition (Zi) issue d'une fermentation de *Lb. acidophilus* 11 à pH contrôlé 6,5

Dilution	Log dilution	DO	Zi (mm)
1	0,00	-0,267	17
0,50	-0,30	0,127	15
0,20	-0,70	0,260	12
0,10	-1,00	0,350	10
0,05	-1,30	0,457	09
0,02	-1,70	0,557	06
0,01	-2,00	0,617	04
0,005	-2,30	0,643	00
0,002	-2,70	0,683	00

Moyenne de DO de *Lb. bulgaricus* 340 de trois essais

Zi: moyenne du diamètre d'inhibition de trois essais (en mm)

Tableau 15: Mesure de la DO de *Lb. bulgaricus* 340 en fonction de la concentration du SBA et du diamètre d'inhibition (Zi) issue d'une fermentation de *Lb. acidophilus* 11 à pH contrôlé 5,5

Dilution	Log dilution	DO	Zi (mm)
1	0,00	-0,100	14
0,50	-0,30	0,210	11
0,20	-0,70	0,303	08
0,10	-1,00	0,423	05
0,05	-1,30	0,573	02
0,02	-1,70	0,600	00
0,01	-2,00	0,643	00
0,005	-2,30	0,667	00
0,002	-2,70	0,693	00

Moyenne de DO de *Lb. bulgaricus* 340 de trois essais

Zi: moyenne du diamètre d'inhibition de trois essais (en mm)

Tableau 16: Mesure de la DO de *Lb. bulgaricus* 340 en fonction de la concentration du SBA et du diamètre d'inhibition (Zi) issue d'une fermentation de *Lb. acidophilus* 11 à pH contrôlé 5,0

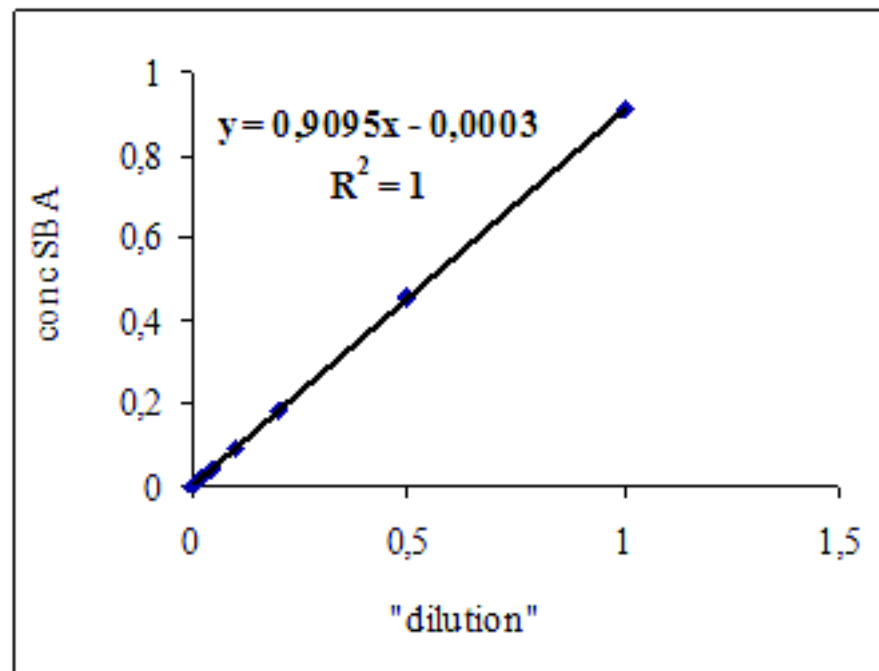


Fig. 13: Corrélation entre la dilution et la concentration en bactériocine dans le SBA

Calcul de la masse molaire de la bactériocine:

M correspond à la masse moléculaire de la molécule analysée

m_1 et m_2

Z et Z+1 charge

$$m_1 = (M + Z) / Z$$

$$m_2 = (M + Z + 1) / (Z + 1)$$

$$Z = (m_2 - 1) / (m_1 - m_2)$$

Selon les résultats du spectrophotomètre:

$$m_1 = 1305,5 \text{ et } m_2 = 1044,7$$

$$Z = (1044,7 - 1) / (1305,5 - 1044,7) = + 4$$

$$M = [m_2 \cdot (Z + 1)] - (Z + 1) = 5218,5 \text{ Da.}$$

Tableau 25: Descripteurs caractéristiques de l'acidification de *Lb. acidophilus* 11 avant et pendant le conservation à - 20°C (pH contrôlé 6,5)

Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones isolées

J0							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0031	85	6,00	76	323	591	1200
2	-0,0027	88	6,10	75	327	595	1211
3	-0,0031	86	6,12	75	328	597	1227
moyenne	-0,0030	86	6,07	75	326	594	1213
Ecart type ET	0,00	1,53	0,06	0,45	2,92	3,21	13,58
Coeff variation CV (%)	-7,58	1,77	1,06	0,60	0,90	0,54	1,12
J1							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0034	100	6,12	81	343	600	997
2	-0,0034	104	6,18	82	342	604	1000
3	-0,0033	111	6,15	81	348	610	990
moyenne	-0,0034	105	6,15	81	344	605	996
ET	0,00	5,57	0,03	0,41	3,20	5,03	5,13
CV (%)	-0,89	5,30	0,49	0,51	0,93	0,83	0,52
J7							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0033	160	6,18	93	400	665	1520
2	-0,0030	166	6,15	93	396	660	1523
3	-0,0032	180	6,12	93	410	662	1521
moyenne	-0,0032	169	6,15	93	402	662	1521
ET	0,00	10,26	0,03	0,16	7,06	2,52	1,23
CV (%)	-5,18	6,08	0,49	0,17	1,75	0,38	0,08
J14							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0032	200	6,20	97	432	740	1728
2	-0,0032	198	6,21	98	434	749	1726
3	-0,0035	210	6,20	96	436	760	1780
moyenne	-0,0033	203	6,20	97	434	750	1744
ET	0,00	6,43	0,01	1,18	1,93	10,02	30,39
CV (%)	-5,25	3,17	0,09	1,21	0,44	1,34	1,74
J21							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0031	217	6,23	99,02	467,89	785	1967
2	-0,00295	219	6,21	99,96	461,46	789	1966
3	-0,00284	220	6,2	100,37	465,58	789	1965
moyenne	-0,00296333	219	6,21	100	465	788	1966
ET	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CV (%)	-19,96	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
J28							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0039	229	6,25	118,17	488,17	800	1990
2	-0,0037	232	6,25	114,35	489,68	808	1989
3	-0,00396	228	6,23	115,08	494,84	802	1985
moyenne	-0,0039	230	6,24	116	491	803	1988
ET	0,00	2,08	0,01	2,03	3,50	4,16	2,65
CV (%)	-3,53	0,91	0,18	1,75	0,71	0,52	0,13

Tableau 26: Descripteurs caractéristiques de l'acidification de *Lb. acidophilus* 11 avant et pendant le conservation à – 20°C (pH contrôlé (5,5))

Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones isolées

J0							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0027	99	6,21	76	394	700	1821
2	-0,0029	101	6,23	66	397	712	1822
3	-0,0027	105	6,21	77	395	717	1826
moyenne	-0,0028	101,6667	6,2167	72,7100	395,2167	709,6833	1823,1800
ET	0,00	3,06	0,01	5,91	1,40	8,51	2,79
CV (%)	-3,02	3,00	0,19	8,13	0,35	1,20	0,15
J1							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0028	115	6,32	85	415	722	1929
2	-0,0025	116	6,34	89	420	726	1930
3	-0,0030	113	6,30	88	401	725	1939
moyenne	-0,0028	114,6667	6,3200	87,2833	411,7467	724,2900	1933
ET	0,00	1,53	0,02	2,19	10,07	2,27	5,23
CV (%)	-9,78	1,33	0,32	2,51	2,45	0,31	0,27
J7							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0026	200	6,32	90	431	741	1942
2	-0,0025	215	6,30	85	435	743	1945
3	-0,0029	218	6,30	88	438	745	1947
moyenne	-0,0027	211,0000	6,3067	87,6567	434,7433	742,8200	1944,8800
ET	0,00	9,64	0,01	2,53	3,86	2,20	2,49
CV (%)	-7,59	4,57	0,18	2,89	0,89	0,30	0,13
J14							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0024	243	6,32	95	461	780	1960
2	-0,0022	249	6,33	97	465	783	1966
3	-0,0021	241	6,32	92	464	782	1967
moyenne	-0,0022	244,3333	6,3233	94,6567	463,4100	781,4867	1964,5467
ET	0,00	4,16	0,01	2,50	2,44	1,81	3,74
CV (%)	-5,83	1,70	0,09	2,64	0,53	0,23	0,19
J21							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0023	255	6,32	100	482	800	1998
2	-0,0025	251	6,32	97	488	817	1997
3	-0,0028	249	6,30	101	483	809	1995
moyenne	-0,0025	252	6,31	99	484	809	1997
ET	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CV (%)	-23,34	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
J28							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0023	260	6,35	112	517	828	2000
2	-0,0020	263	6,35	116	514	834	1999
3	-0,0022	260	6,39	111	500	830	2001
4	-0,0022	261	6,36	113	510	831	2000
moyenne	-0,0022	261	6,36	113	510	831	2000
ET	0,00	1,41	0,02	2,16	7,41	2,49	0,82
CV (%)	-5,76	0,54	0,30	1,91	1,45	0,30	0,04

Tableau 27: Descripteurs caractéristiques de l'acidification de *Lb. acidophilus* 11 avant et pendant le conservation à – 20°C (pH contrôlé 5,0)

Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones isolées

J0							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0028	116	6,25	78	589	800	1911
2	-0,0030	118	6,26	76	590	802	1902
3	-0,0029	117	6,25	77	595	807	1906
moyenne	-0,0029	117,0000	6,2533	76,7100	591,4500	803,0167	1906,5133
ET	0,00	1,00	0,01	0,80	3,33	3,49	4,18
CV (%)	-2,44	0,85	0,09	1,04	0,56	0,43	0,22
J1							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0033	125	6,32	85	615	921	1949
2	-0,0035	129	6,30	85	620	922	1940
3	-0,0035	130	6,30	88	610	926	1949
moyenne	-0,0034	128,0000	6,3067	85,9500	614,7467	922,9567	1946
ET	0,00	2,65	0,01	1,52	5,29	2,41	4,94
CV (%)	-2,64	2,07	0,18	1,77	0,86	0,26	0,25
J7							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0036	220	6,30	93	731	961	1996
2	-0,0035	225	6,30	95	735	963	1998
3	-0,0033	222	6,30	93	738	965	1995
moyenne	-0,0035	222,3333	6,3000	93,6567	734,7433	962,8200	1996,5467
ET	0,00	2,52	0,00	1,14	3,86	2,20	1,48
CV (%)	-4,17	1,13	0,00	1,21	0,52	0,23	0,07
J14							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0024	243	6,32	95	851	1001	2213
2	-0,0022	249	6,33	97	849	1016	2200
3	-0,0021	241	6,32	92	856	1012	2000
moyenne	-0,0022	244,3333	6,3233	94,6567	852,0767	1009,4867	2137,8800
ET	0,00	4,16	0,01	2,50	3,73	8,05	119,40
CV (%)	-5,83	1,70	0,09	2,64	0,44	0,80	5,58
J21							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0023	268	6,32	117	962	1200	2441
2	-0,0022	269	6,32	110	968	1217	2445
3	-0,0024	268	6,34	118	973	1209	2451
moyenne	-0,0023	268	6,33	115	968	1209	2446
ET	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CV (%)	-25,71	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
J28							
échantillon	Vmax	Tmax	pHmax	Ta	tpH5,8	tpH5,5	tpH5,0
1	-0,0026	280	6,37	122	980	1269	2650
2	-0,0025	283	6,38	123	984	1278	2655
3	-0,0026	285	6,41	121	990	1289	2666
4	-0,0026	283	6,39	122	985	1279	2657
moyenne	-0,0026	283	6,39	122	985	1279	2657
ET	0,00	2,05	0,02	0,82	4,11	8,18	6,68
CV (%)	-1,84	0,73	0,27	0,67	0,42	0,64	0,25

