

***Essai de mise en évidence du rôle de  
certaines bactéries lactiques dans le  
Contrôle des infections***

**Présenté par : MEZAINI Abdelkader**  
Rapporteur **DILMI BOURAS. A** Professeur UHBC Chlef  
Année universitaire: 2010-2011

Devant le jury d'examen Président BELLAL. M.M Professeur ENSA El-Harrach Examineur OUNAN.  
G Maître de conférences ENSA El-Harrach Examineur BENS Aid. A Maître de conférences UHBC  
Chlef Examineur ALLEM. R Maître de conférences UHB Chl



# Table des matières

Dédicace . . .	4
Remerciements . . .	5
Liste des abréviations . . .	6
Résumé . . .	7
Abstract . . .	8
ص غ ل م . . .	9
Introduction . . .	10
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE . . .</b>	<b>12</b>
<b>1/ Les bactéries lactiques . . .</b>	<b>12</b>
1.1/ Caractéristiques générales des bactéries lactiques . . .	12
1.2/ Domaines d'application des bactéries lactiques . . .	16
1.3/ Activité antimicrobienne des bactéries lactiques . . .	17
<b>2/ Notion de probiotiques . . .</b>	<b>19</b>
2.1/ Critères de sélection des souches à fort potentiel probiotique . . .	19
2.2/ Les principales souches probiotiques . . .	20
<b>3/ Rôle des probiotiques dans les infections . . .</b>	<b>21</b>
3.1/ Effets directs sur les infections . . .	21
3.2/ Effets indirects de prévention . . .	21
<b>PARTIE EXPERIMENTALE . . .</b>	<b>25</b>
<b>1/ MATERIELS ET METHDES . . .</b>	<b>25</b>
1/ origine des souches . . .	25
2/ Les milieux de culture . . .	25
3/ Caractérisation des souches isolées . . .	26
4/ propriétés antibactériennes des souches . . .	29
5/ Extraction des plasmides . . .	33
6/ Modélisation de la croissance d'une souche productrice <i>Sc. thermophilus</i> T2 . . .	34
<b>2/ RESULTATS ET DISCUSSIONS . . .</b>	<b>36</b>
1/ Caractéristiques biochimiques des souches étudiées . . .	36
2/ Sélection des souches isolées . . .	37
3/ Caractérisation des souches productrices de bactériocines . . .	43
4/ Cinétique de croissance et biosynthèse de bactériocines . . .	47
5/ Survie des bactéries lactiques dans le tube digestif . . .	48
6/ Mise en évidence du plasmide . . .	51
7/ Essai de modélisation de la croissance de <i>Sc. thermophilus</i> . . .	52
Conclusion . . .	60
Références bibliographiques . . .	63
Annexes . . .	70

## Dédicace

*A la mémoire de mon père que dieu le tout puissant lui accorde sa miséricorde, A ma Mère, source de tendresse et d'amours pour son soutiens tout le long de ma vie scolaire que dieu la garde pour nous. A ma femme et mes enfants Raja, Wafa, Anes et Oussama A mes frères et nos sœurs, que j'aime beaucoup A ma grande famille. A mes cher ami (e) s, et collègues enseignants. A Tout ceux qui ont collaboré de près ou de loin à l'élaboration de ce travail. Que dieu leur accorde santé et prospérité.*

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Pr **A. Dilmi Bouras**, directeur du Laboratoire Bioressources Naturelles, qui m'a offert l'opportunité de réaliser ce travail. Je vous remercie d'avoir participé à mon développement scientifique et de m'avoir donné tant de conseils qui m'ont aidé à mener à terme ce travail. Vous trouverez ici l'expression de mon admiration et de ma reconnaissance. J'adresse aussi mes remerciements aux professeur **Jean Pierre Hornez** et le Dr **N-E Chihib** qui m'ont encadré durant le stage de finalisation de cette thèse et pour leur contribution appréciable à ce travail.

J'aimerais remercier également **Max Bechet** ingénieur de recherche au laboratoire de ProBioGem de l'université de Lille pour son aide et son soutien ainsi que son assistance durant la réalisation de la partie relative à la biologie moléculaire. Un grand merci s'adresse également au professeur **D. Guillochon**, directeur du laboratoire de ProBioGem pour son accueil chaleureux, Je te remercie de la confiance dont tu m'as témoignée en m'offrant la possibilité d'effectuer une partie de ma recherche au sein du laboratoire.

Je remercie monsieur **Bellal.M.M**, Professeur à l'ENSA d'Alger pour son amabilité, sa disponibilité d'avoir accepté de présider le jury qu'il trouve ici l'expression mes sentiments les plus dévoués.

Je tiens à remercier également Mme **Ounane. G**, maître de conférences à l'Ecole Supérieure d'Agronomie d'Alger pour sa disponibilité et sa gentillesse et pour avoir accepté de juger cette thèse.

Je remercie Monsieur **Bensaid. A**, maître de conférences à la faculté de biologie de chlef pour ses encouragements et ses remarques précieuses. Qu'il trouve ici l'expression de mes meilleures considérations.

Mes remerciements s'adresse aussi à Madame **Allem.R**, maître de conférence à la faculté de biologie de chlef Veuillez accepter mes profonds remerciements pour votre présence dans ce jury.

Enfin je tiens à rendre un vibrant hommage à toute l'équipe du laboratoire de Bio ressources Naturelles pour leur soutien et leur solidarité durant les moments difficiles.

## Liste des abréviations

- AU: Unité Arbitraire
- ATCC: American type culture collection
- BL: Bactéries lactiques
- BSH: Biliar salt hydrolase
- Cfu : unité formant colonie
- CMI: Concentration Minimale Inhibitrice
- GC: guanine /cytosine
- L: *Listeria*
- Lb: Lactobacillus
- Lc: lactococcus
- MHA: Mueller- Hinton Agar
- MLST: Multi Locus Sequency Typing
- MRS: Man Rogosa ET Sharp
- PEP: phosphoenol pyruvate
- Rpm: nombre de tours par minute
- TSA: Tris sucre Agar
- TFA: Trifluoro acetonitril

---

## Résumé

La fermentation de nombreux aliments par les bactéries lactiques constitue l'une des techniques de conservation pratiquée par l'homme depuis l'antiquité. Elles agissent par l'intermédiaire de certains de leurs produits de métabolisme, capables d'inhiber le développement de flores bactériennes d'altération et/ou pathogènes. Ces dernières années cette méthode de conservation a suscité l'intérêt des scientifiques en effet certaines bactéries lactiques sont capables de produire substances antibactériennes appelées bactériocines. Leur utilisation comme alternative aux additifs chimiques a ouvert de nouvelles voies pour l'obtention de produits alimentaires de meilleures qualités avec un temps de conservation plus long.

Les résultats ont montré que certaines souches locales de bactéries lactiques possèdent une activité antibactérienne très remarquable, les agents antimicrobiens responsables de cette activité peuvent être facilement assimilés à des bactériocines, leurs résistances à des traitements thermiques assez sévères permet de les ajouter aux produits pasteurisés sans risque d'altération.

*Streptococcus thermophilus* T2 a montré un large spectre d'activité, vis-à-vis les bactéries à gram positif. La courbe de la cinétique de croissance et de production de bactériocines montre que le maximum de production, se situe au début de la phase exponentielle de croissance (90 UA) ; soit une vitesse de production de  $9.3 \text{ (UA ml}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{)}$ . La bactériocine produite s'est montrée résistante dans une large plage de pH allant de (4 à 8).

Des tests *in vivo* ont montré que ces souches, sont bien capables de surmonter les conditions drastiques du tube digestif et reproduire ainsi les effets bénéfiques pour l'homme ou pour l'animal. Ce travail nous a permis de mettre en évidence le rôle important que peut jouer certaines souches de bactéries lactique locales à l'instar de *Sc. thermophilus* T2 dans le contrôle des infections à *Listeria*. Pour caractériser la croissance des souches dans différents milieux un plan d'expérience a permis d'établir un modèle expérimental donnant une très bonne concordance avec le modèle théorique ( $R^2 = 0,91$ ).

## Abstract

The fermentation of food by the lactic bacteria constitutes one of the techniques of preservation practised by the man since the antiquity. They act through some of their products of metabolism, able of inhibiting the development of bacterial florae of change and/or pathogenic. These last years this method of preservation aroused the interest of the scientists indeed certain lactic bacteria are capable of producing called antibacterial bacteriocins substances. Their use as alternative in chemical additives opened new ways for the obtaining of foodstuffs of better qualities with a longer shelf life.

The results showed that some local lactic bacteria strains than *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* possess antibacterial activity, the antimicrobial agents responsible for this activity can be easily likened to bacteriocins, their resistances in rather severe heat treatments allows to add them to products pasteurized without risk of change.

*Streptococcus thermophilus* T2 strain showed the wide inhibitory spectrum against the Gram positive bacteria. Growth and bacteriocin production profiles showed that the maximal bacteriocin production, by *Sc. thermophilus* T2 cells, was measured by the end of the late-log phase (90 AU ml<sup>-1</sup>) with a bacteriocin production rate of 9.3 (AU ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). In addition, our findings showed that the bacteriocin, produced by *Sc. thermophilus* T2, was stable over a wide pH range (4-8); this indicates that such bacteriocin may be useful in acidic as well as non acidic food. This preliminary work shows the potential application of autochthonous lactic acid bacteria to improve safety of traditional fermented food.

In vivo tests showed that these strains are capable of surmounting the drastic conditions of the digestive tract and of reproducing so the beneficial effects for the man or for the animal. This work allowed us to bring to light the important role that can play these lactic acid bacteria strains following the example of *Sc. thermophilus* T2 in the control of the *listeria* infections. Profiles growth of strains in different conditions) allowed to establish an experimental model giving a very good concordance with the theoretical model ( $R^2 = 0,91$ ).



## ص خلم

تعتبر بكتيريا الحليب من أهم البكتيريا التي تدخل في تخمر الأغذية وتساهم بالتالي في حفظ هذه المواد من التلف ونقل الأمراض.

لقد أثارت هذه الطريقة البيولوجية الطبيعية في الحفاظ على الأغذية اهتمام العديد من الباحثين والعلماء في السنوات الأخيرة على أساس أن هذا النوع من البكتيريا قادر على إنتاج مواد فعالة تحدد من نشاط البكتيريا الضارة والممرضة.

أن نتيجة هذا البحث تدل على أن بعض سلالات البكتيريا المحلّبة تنتج مادة البكتريوسين ذات فعالية ضد جرثوم دستيريا الذي بات يهدد صحة المستهلك.

كما بينت الدراسة أن سلالة سترابنوكوكس نر موفيليس ت2 لها فعالية عالية ضد الكثير من الجراثيم الممرضة.

سترابنوكوكس نر موفيليس ت2 أظهرت نشاطًا تثبيطيًا واسعًا ضد جراثيم موجبة الغرام، إن المنحى التفاضلي لهذه السلالة يبين أن إنتاج البكتريوسين يبلغ مداه أثناء المرحلة الأسية بإنتاج قدره 90 وحدة / مل، أي بسرعة تصل إلى 9,3 وحدة / مل / سا. إن هذه المادة الفعالة لا تتأثر بتغير حموضة الوسط وتبقى ناشطة دون أن تتأثر بدرجات حموضة فسوي (4 - 8).

إن التجارب التي أجريت على الحيوانات أثبتت قدرة هذه السلالات على مقاومة الظروف الصعبة التي توجد في الجهاز الهضمي مع بقائها حية مدة طويلة في هذه الظروف مما يدل على أنه بالإمكان استعمال هذه السلالات في معالجة بعض الأمراض البكتيرية عن طريق تناولها مع الغذاء.

وفي الأخير أوضحت دراسة زرع هذه البكتيريا في ظروف بيئية مختلفة مدى تحملها في هذه الظروف مع عامل توافق تحليل  $R^2 = 0,91$  مقارنة بالنموذج النظري.

## Introduction

Les bactéries lactiques sont des microorganismes très utiles pour l'homme, et bénéficient de ce fait d'un statut bien particulier en tant que bactéries dites GRAS (Generally Recognized As Safe) (Klaenhammer *et al.*, 2005). Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent aux aliments de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (Abee, 1995; Hugenholz *et al.*, 1999).

Ces bactéries lactiques ont de nombreuses propriétés métaboliques dont les industriels et les nutritionnistes cherchent à tirer le meilleur parti. Par ailleurs en plus de leur intérêt dans la fabrication et la préservation des produits alimentaires, certaines souches de bactéries lactiques ont été décrites comme ayant des effets bénéfiques sur la santé humaine. En effet, des travaux de plus en plus nombreux montrent ou suggèrent les effets bénéfiques de ces bactéries. C'est ainsi qu'un certain nombre d'études cliniques chez l'homme ou sur des modèles animaux ont bien confirmé l'effet bénéfique des laits fermentés et des yaourts dans les troubles gastro-intestinaux: infections digestives bactériennes et virales, intolérance au lactose, diarrhées, gaz, ballonnements, constipations... (Parker, 1974; Gibson et Fuller., 2000; Varcoe *et al.*, 2003; Marelli *et al.*, 2004, Lin *et al.*, 2005). Les microorganismes impliqués dans ces fermentations sont dès lors considérés comme favorables pour la santé de l'homme et de l'animal et ont reçu le nom de «Probiotiques». Ainsi, les probiotiques peuvent se comparer à de véritables usines actives capables de véhiculer des principes actifs qu'ils contiennent. Ces principes actifs peuvent être des enzymes qui aident à la digestion des fibres, des substances antibactériennes comme les acides organiques et les bactériocines, pour combattre plusieurs micro-organismes putréfiants et pathogènes (Sreekumar et Hosono 1998).

L'étude des modèles animaux a apporté la preuve que certaines bactéries probiotiques, pouvaient inhiber la croissance de bactéries pathogènes telles *Salmonella typhimurium*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* et *Shigella* sp. (Silva *et al.* 1999). Il a été démontré par ailleurs que les bifidobactéries de la flore intestinale de l'enfant exerçaient une activité antimicrobienne, suggérant qu'elles participaient à l'effet barrière de la flore intestinale (Lievine *et al.* 2000). Une protection contre l'infection par *E. coli* pathogène a été démontrée chez les cochons par l'ingestion de souches non pathogènes d'*E. coli*, qui agissent par compétition en occupant les sites d'adhésion (Davidson et Hirsh 1976). Chez l'homme, les probiotiques sont considérés comme des agents protecteurs vis-à-vis des risques d'apparitions de pathologies digestives. Parmi les effets les mieux connus figurent l'effet antidiarrhéique dans le cadre d'une antibiothérapie (Gill, 2003; Surawicz *et al.*, 1989, Taylor *et al.*, 1949; Orrhage *et al.*, 1994, Ryan *et al.*, 1998; Galvin *et al.*, 1999).

À vrai dire nombreuses études précliniques et cliniques plaident en faveur de potentialités thérapeutiques des probiotiques en particulier vis-à-vis des pathologies digestives. Cependant, certaines études décrivant le devenir des bactéries du yaourt, *Lb. bulgaricus* et *Sc. thermophilus*, démontrent que leur survie est faible dans les parties hautes du tractus digestif (Marteau *et al.*, 1993). En effet l'activité des bactéries lactiques dans des conditions gastro-intestinales, ou l'impact des conditions stressantes sur la production

de bactériocines par exemple constitue un véritable handicap pour l'expression des effets bénéfiques chez le consommateur (Havenaar et *al.*, 1992).

Le but du travail présenté dans cette thèse est de caractériser *in vitro* et *in vivo* l'activité antibactérienne de certaines souches de bactéries lactiques isolées localement et d'évaluer la capacité des souches productrices à prévenir et traiter une infection bactérienne. Pour ce faire nous avons adopté le plan suivant :

- Isoler le maximum de souches de bactéries lactiques à partir de différents biotopes et niches écologiques qui caractérisent certaines régions du haut et moyen cheliff.
- Screening des souches isolées à travers certains tests d'aptitudes technologiques et biotechnologiques.
- Etude de la survie des bactéries lactique dans les conditions extrêmes du tube digestif.
- Etude de l'activité antibactérienne des souches et essai d'isolement du principe actif.
- Essai de modélisation de la cinétique de croissance des souches.

# PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1/ Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène de microorganismes, produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. En dehors de ce point commun, les nombreux genres et espèces qui constituent ce groupe présentent une grande diversité de caractéristiques morphologiques et physiologiques. Cela se traduit par l'existence au sein des espèces, de nombreuses souches possédant des propriétés technologiques différentes. (Desmazeaud, 1996). Les bactéries lactiques colonisent de nombreux produits alimentaires, comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. (Stiles et al, 1997; Klaenhammer et al., 2005).

Les bactéries lactiques sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires et sont de fait largement utilisées en tant que starters dans les produits alimentaires fermentés, où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation. (Abee, 1995 ; Hugenholtz et al., 1999).

### 1.1/ Caractéristiques générales des bactéries lactiques

---

Selon De Roissart, (1986) les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. A quelques exceptions près, les bactéries lactiques ont pour principale caractéristiques d'être : à gram positif, généralement immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotoles et sont catalase négative, en outre elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni hydrogène sulfureux, seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles.

Toutes les bactéries lactiques, ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytiques, qui en utilisant des glucides, produisent soit exclusivement de l'acide lactique (bactéries homolactiques strictes), soit de l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives) soit de l'acide lactique de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> (bactéries hétérolactiques strictes). Certaines espèces ou certaines souches peuvent, en outre, produire de l'acide formique ou de l'acide succinique. Aucune souche du groupe lactique n'est capable de produire des acides volatiles ayant plus de deux atomes de carbone. Le groupe de bactéries lactiques est formé de bactéries en forme de coques : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc* et des bactéries en forme de bacilles : *Lactobacillus* et *Carnobacterium*. La différenciation taxonomique des bactéries du groupe lactique s'appuie sur un ensemble de caractères physiologique et biochimique facilement mesurables.

#### 1.1.1/ Classification et taxonomie

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-jensen. Elle est basée sur divers critères morphologiques et physiologiques (catalase, nitrite réductase, type de fermentation...).

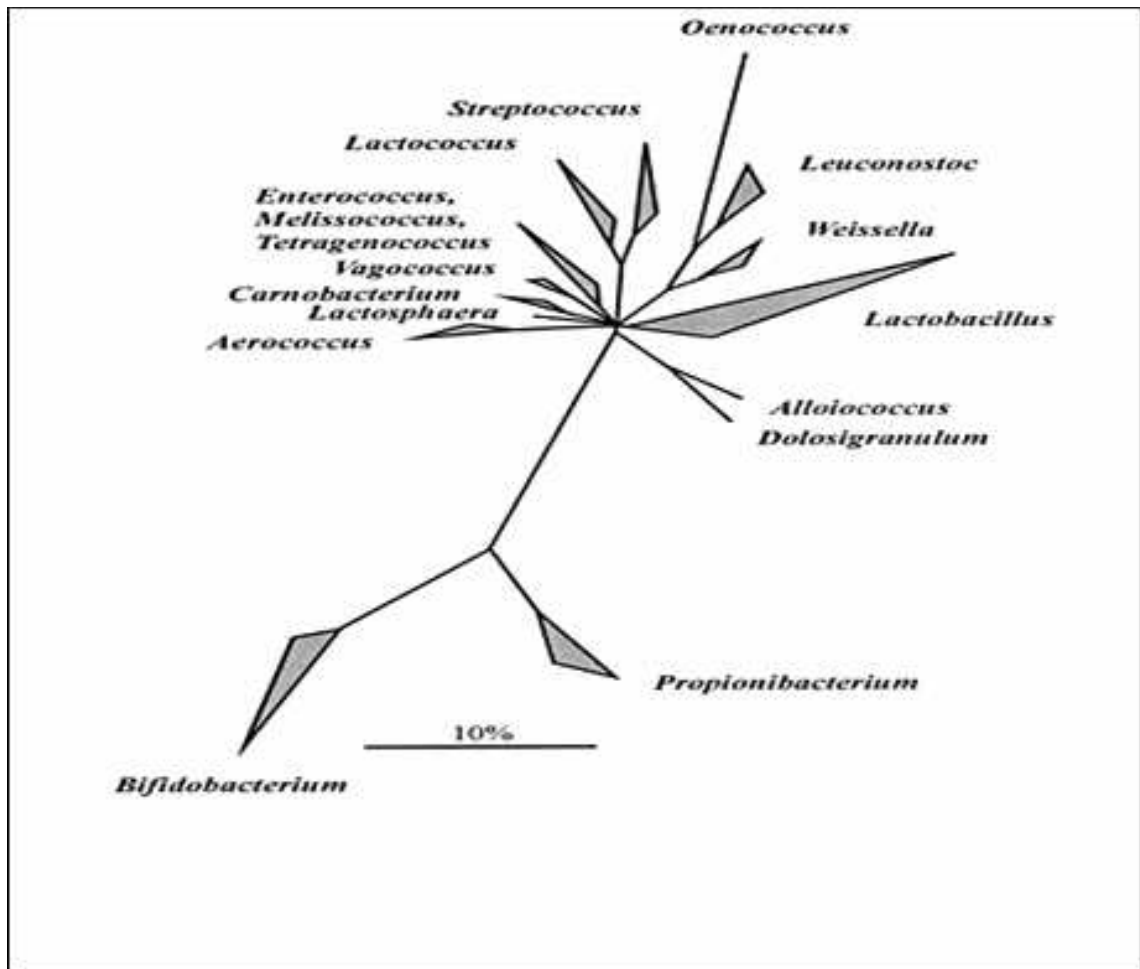


Figure 1: Arbre phylogénique des bactéries lactiques selon (Woese et Fox 1977)

### 1.1.2/ Les principaux genres de bactéries lactiques

Parmi les bactéries lactiques à morphologie coccoïde, les streptocoques sont les plus connus, et peu être les plus répandus. Récemment, ils ont été redistribués dans des genres différents, en fonction de leurs caractéristiques physiologiques et génétiques. Par son habitat qui est le lait l'espèce *Sc. thermophilus* se démarque nettement des autres espèces du genre *Streptococcus*, elle n'est jamais pathogène et est souvent associé aux lactocoques dans les produits laitiers fermentés. La plupart des autres espèces du genre *Streptococcus* ont un caractère pathogène bien connu et ne présentent, par conséquent, aucun intérêt technologique (Schleifer et al., 1985).

*Streptococcus thermophilus* est donc la seule espèce à intérêt industriel et nutritionnel du genre *Streptococcus*. Ses cellules de forme ovoïde, se groupent en longues chaînes, sont homofermentaires et produisent de l'acide lactique L(+). Elles se caractérisent par l'absence d'antigène et connu par sa température de croissance minimal de 19 à 21°C et optimal 42 à 43°C, par sa résistance à un chauffage de 60°C pendant 30 minutes.

Les lactobacilles regroupent plusieurs espèces bactériennes omniprésentes dans la nature mais rarement pathogène dont les principales caractéristiques sont d'être gram positif, catalase négative en forme de bâtonnet, coccobacilles isolés ou en chaînes quelquefois très longues Immobiles ou mobiles grâce à des flagelles péritriches, asporogènes, anaérobies facultatives. Possédant un métabolisme fermentatif (l'acide lactique représente au moins 50 % des produits de fermentation) et présentant des exigences nutritionnelles complexes variables d'une espèce à l'autre et un large spectre de température de croissance (2 à 52°C), elles sont acidophiles avec un pH optimal de croissance de 5,5 à 6,2 (Collins et Aramaki, 1980). A coté des streptocoques et des lactobacilles les autres principaux genres de bactéries lactiques sont répertoriés dans le tableau 1.

Tableau 1: Les différents genres de bactéries lactiques d'intérêt en microbiologie des aliments et leurs principales caractéristiques:

Genre	Morphologie	Fermentation	Caractéristiques principales	Habitats principaux
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaires et hétérofermentaires	Thermophiles ou mésophiles	Homme, produits laitiers carnés, végétaux
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaires	psychrotrophes, peu acidotolérants	Produits carnés, poissons, produits laitiers
<i>Lactococcus</i>	coques	Homofermentaires	Mésophiles, croissance à 45 et non à 10°C, thermorésistants	Produits laitiers, végétaux.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	coques	Homofermentaires	Thermophiles	Produits laitiers
<i>Enterococcus</i>	coque	Homofermentaires	Mésophiles, halophiles	Intestin de l'homme et des animaux, produits laitiers.
<i>Pediococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaires	Mésophiles, halophiles	Bière, produits végétaux, saucissons.
<i>Tetragenococcus</i>	Coques en tétrades	Homofermentaires	Mésophiles	Saumures
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Produits végétaux, produits laitiers
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaires	Mésophiles	Vin
<i>Bifidobacterium</i>	Forme irrégulière	Acide acétique et lactique	Mésophiles	Intestin de l'homme et des animaux

Sources: FEDERIGHI, (2005)

### 1.1.3/ Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques

La croissance des bactéries lactiques reste un phénomène fastidieux nécessite un apport complexe, aussi bien qualitativement que quantitativement, en éléments nutritifs. Outre les besoins en oligo-éléments, vitamines et nucléotides, les exigences nutritionnelles les plus remarquables concernent certainement les besoins en acides aminés. Il est en effet,



général n'exigent ni acide folique ni thiamine ou cobalamine pour leur croissance (Marshall et LAW, 1984). (Tableau 2)

### 1.1.4/ Métabolisme générale et voies fermentaires

Le métabolisme des bactéries chimiotrophes s'opère par une succession de réactions d'oxydoréduction, ou l'oxydation consiste en la perte d'électron par un donneur d'électron et la réduction consiste en l'acquisition d'électron par un accepteur d'électron.

Dans le cas des bactéries lactiques (chimioorganotrophes), le donneur est un substrat organique qui par définition est hydrogéné, l'oxydation correspond à une déshydrogénation, et la réduction à une hydrogénation. Le métabolisme énergétique des bactéries lactiques s'effectue donc par un enchaînement de réaction couplée de déshydrogénation et d'hydrogénation.

L'énergie libérée dans les réactions de déshydrogénation est couplée à la phosphorylation du substrat et est utilisée pour la synthèse de l'ATP (molécule énergétique par excellence). D'autre part le PEP précurseur phosphorylé du pyruvate constitue une réserve énergétique et intervient avec l'ATP comme source énergétique dans le transport des différents substrats à travers la membrane cytoplasmique. Selon l'espèce bactérienne et les conditions de culture, le catabolisme du glucose peut suivre une voie homofermentaire ou hétérofermentaire.

Les bactéries lactique homofermentaires transforment une molécule de glucose en 2 molécules de lactate par la voie des hexoses diphosphate (encore appelé voie de la glycolyse ou (voie d'Embden Meyerhoff-Parnas); les bactéries lactiques hétérofermentaires, transforment une molécule de glucose par la voie des pentoses phosphate en une molécule de lactate, une molécule de CO<sub>2</sub> et une molécule d'éthanol ou d'acétate et génèrent parallèlement 2 molécules d'ATP et du NADH<sub>2</sub> qui est réoxydé en NAD pour assurer la poursuite du processus fermentaire.

La distinction entre les espèces homolactiques et hétérolactiques dépend de la proportion relative des produits issus de la fermentation des sucres, à savoir chez les homolactiques, environ 90% de lactate, et chez les hétérolactiques, environ 50% de lactate; ces derniers forment aussi d'autres composés en particulier de l'acétate, de l'éthanol et de l'anhydride. Ces deux types fermentaires ont été ensuite différenciés par la présence chez les homo fermentaires, d'une enzyme clé, le fructose diphosphate aldolase, mais l'étude systématiques des enzymes intervenant dans le catabolisme des sucres, a montré que la réalité était moins tranché il en résulte une nouvelle division des bactéries lactiques en trois groupes sur la base de leur équipement enzymatique :

- Les homofermentaires stricts qui contiennent une fructose diphosphate aldolase mais ne contient pas de glucose-6-P déshydrogénase ni de phosphogluconate déshydrogénase et suivent la voie des hexoses diphosphates.
- Les hétéro fermentaires stricts qui contiennent les deux déshydrogénases mais pas de fructose diphospho aldolase suivent la voie des pentoses- phosphates.
- Les hétéro fermentaires facultatifs qui contiennent les trois enzymes.

## 1.2/ Domaines d'application des bactéries lactiques

---

La fermentation lactique des aliments constitue l'une des plus anciennes formes de conservation de la nourriture. Les bactéries lactiques sont utilisées empiriquement depuis



des siècles dans la fabrication de nombreux aliments fermentés comme les produits laitiers (yaourts et fromages). Ces bactéries interviennent également dans la fabrication des salaisons, du vin et des ensilages. L'action de la flore lactique sur la conservation d'un aliment est liée à l'abaissement du pH consécutif à la production d'acide lactique. Les bactéries lactiques peuvent aussi produire de nombreux agents anti-bactériens tels que les bactériocines (Moll et *al.*, 1999; Naidu et *al.*, 1999). Ces substances contribuent à inhiber la croissance de flores indésirables. Certaines bactéries lactiques ont une action déterminante sur les qualités organoleptiques des produits fermentés (texture et arôme par exemple). Enfin Certaines bactéries comme *Leuconostoc helveticus* sont utilisées pour produire industriellement de l'acide lactique employé comme additif en alimentation et dans les produits cosmétiques ou pharmaceutiques. L'acide lactique est aussi transformé en acide polylactique, polymère biorésorbable utilisé dans la fabrication d'implants pour la chirurgie osseuse ou pour la fabrication de films plastiques biodégradables. *Leuconostoc mesenteroides* est utilisé pour la production de dextrane, médicament utilisé dans les cas d'hypovolémie sanguine (Peneaud 2006).

Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être ajoutées comme starter dans des produits fermentés ou comme culture protectrice. Elles doivent être capables de croître et de produire des bactériocines dans l'aliment à conserver. La composition du produit (nutriments accessibles, pH, additifs alimentaires, etc.), les conditions de stockage (température, atmosphère, activité d'eau, etc.) doivent donc permettre la croissance et la production de bactériocines. Ces bactéries peuvent être également ajoutées en combinaison à d'autres starters qui confèrent les propriétés organoleptiques désirables. Dans ce cas, la bactérie productrice de bactériocines ne doit pas détériorer les qualités organoleptiques de l'aliment fermenté et la bactériocine produite ne doit pas avoir d'activité contre le starter (Deegan et *al.*, 2006; Galvez et *al.*, 2007). Si la bactérie est appliquée en tant que culture protectrice, elle doit être capable de produire sa bactériocine sans modifier les propriétés organoleptiques (Rodgers, 2001). La concentration cellulaire maximale atteinte dans le produit doit, par ailleurs, être inférieure à la limite de  $10^6$  CFU·g<sup>-1</sup> généralement admise pour les produits non fermentés.

### 1.3/ Activité antimicrobienne des bactéries lactiques

La capacité de compétition des bactéries lactiques dans différents environnements résulte de leur activité fermentaire associée à la production de divers composés antimicrobiens. Ces activités antimicrobiennes sont ainsi essentielles à l'innocuité et à la préservation des aliments fermentés. Diverses substances peuvent être impliquées dans cette activité, c'est le cas de certaines substances antagonistes tels que des acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et des protéines antimicrobiennes.

#### 1.3.1/ Production d'acides organiques

Les acides lactiques et acétiques excrétés par ces bactéries sont des principaux accepteurs d'électron et les produits terminaux du métabolisme fermentaire. Ces acides organiques peuvent assurer deux importantes fonctions antimicrobiennes sous leurs forme indissociés ils traversent facilement la membrane cytoplasmique et pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire annulé (Kachet, 1987). Ainsi l'accumulation

d'acide organique est directement inhibitrice pour les microorganismes nuisibles qui présentent un seuil bas de résistance aux changements de pH intracellulaire. D'autre part, en condition acide la compétitivité des bactéries lactiques se trouve améliorée étant donné leur plus grande tolérance aux bas pH, extra et intra cellulaire.

### 1.3.2/ Production de peroxyde d'hydrogène

La production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut avoir lieu selon plusieurs modes, mettant en jeu des oxydases (Deaschel, 1989) et probablement une super oxyde-dismutase (Collins et Armaki, 1980). Le niveau d'accumulation varie selon la souche bactérienne il peut être autoinhibiteur révélant une activité plus intense des réactions génératrices de réactions peroxydasiques provoquant son élimination. Le peroxyde d'hydrogène est reconnu depuis longtemps comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celles des lactobacilles (Price et Lee, 1970). En plus de son effet bactéricide direct, les systèmes actoperoxydase thyocyanate présents dans le lait des mammifères, génèrent par oxydation deux puissants agents inhibiteurs microbiens, à savoir l'hypothiocyanate et l'acide hypothyocianeux. L'utilisation de certaines souches de Lactocoque comme inoculum dans le lait cru génère du peroxyde d'hydrogène, et ce fait active le système peroxydase thyocyanate (Juffs et Babel, 1975).

### 1.3.3/ Production de bactériocines

Selon Ennahar et al., (2000); Cleveland et al., (2001); Mcauliff et al., (2001). Les bactériocines appartiennent à un grand groupe de peptides synthétisés par voie ribosomale, de nature cationiques, amphiphiles et hydrophobes; se sont des molécules à activité antimicrobiennes particulièrement actives contre les souches phylogéniquement proches.

La première utilisation des bactériocines dans le secteur industriel remonte à 1988, lorsque les états- unis ont approuvés la nisine comme "substance généralement reconnue comme inoffensive" en tant qu'agent conservateur des fromages fondus, la nisine inhibe le développement de microorganismes sporulés anaérobies, tels que le *Clostridium botulinum*. (Delves, 1990).

Les bactériocines sont un Moyen de défense ou plutôt d'attaque d'une bactérie contre une autre, leur rôle est de détruire des voisines gênantes, constituant des compétiteurs pour les ressources alimentaires disponibles dans le milieu. Leur action est fortement spécifique de sorte qu'elles peuvent être actives contre un type de bactérie en particulier.

Les bactériocines peuvent être appliquées sous une forme purifiée, semi purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat alimentaire. Les bactéries productrices peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires. Les bactériocines purifiées ou semi purifiées sont appliquées après production en fermenteur, soumises à purifications ou semi purifications et conditionnement se font par des techniques adéquates, qui peuvent être relativement coûteuses.

. Cette préparation est considérée comme un ingrédient fermenté. Un autre mode d'application des bactériocines consiste en leur immobilisation sur les cellules productrices, dans des gels ou des films telle que l'alginate de calcium, la gélatine, la cellulose, les protéines de soja, des films de polysaccharides, etc. La bactériocine sera alors libérée dans le produit au cours de la conservation. Depuis peu, des emballages en polyéthylène ou d'autres films plastiques contenant des bactériocines ont été développés. Ces emballages permettent de réduire la croissance des microorganismes pathogènes ou indésirables

---

pouvant se développer en surface durant la conservation du produit (Luchansky et al., 2004 ; Deegan et al., 2006 ; Ghalfi et al., 2006 ; Galvez et al., 2007).

## 2/ Notion de probiotiques

La notion de probiotiques a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff (1907) qui avait suggéré que la longévité des paysans bulgares était directement liée à leur consommation de laits fermentés. C'est dans les années 1980 que les probiotiques sont entrés dans l'ère moderne lorsque est réapparue l'idée que certains micro-organismes peuvent avoir une action bénéfique chez l'humain s'ils sont consommés en quantités suffisantes et s'implantent dans l'intestin. On redéfinit ainsi les probiotiques comme étant des suppléments microbiens vivants, qui agissent de façon bénéfique sur l'hôte, tout en améliorant son équilibre microbien intestinal (Fuller, 1989). Plus récemment, le concept des probiotiques a été revu afin d'inclure les cellules vivantes et mortes qui peuvent provoquer un effet bénéfique chez un hôte qui est exposé au probiotique (Salminen et al., 1999).

Les probiotiques peuvent aussi être considérés comme un moyen de véhiculer des principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, peptides immunomodulateurs, substances antibactériennes...) jusqu'à leur cibles d'action dans le tractus digestif (Marteau, 2001). La définition officielle retenue par la FAO (Food and Agriculture Organization) désigne des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte. Dans toutes les définitions prononcées, la notion de viabilité apparaît comme un critère de sélection important. En alimentation humaine, les genres bactériens les plus utilisés comme probiotiques sont *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

### 2.1/ Critères de sélection des souches à fort potentiel probiotique

---

Le choix des probiotiques dépend de ses propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Selon le rapport de la FAO/WHO (2002), un micro-organisme probiotique doit essentiellement être capable de Résister au pH acide de l'estomac et aux concentrations biliaires présentes dans l'intestin grêle.

Le grand intérêt porté pour les probiotiques grâce à leurs divers effets bénéfiques sur la santé de l'homme, a fait qu'aujourd'hui cette catégorie de microorganismes est devenu un outil indispensable pour véhiculer des constituants actifs (enzymes, bactériocines), pour exercer leur effet au niveau du tractus gastro-intestinal .

Ainsi afin de pouvoir survivre et agir, les probiotiques doivent résister à plusieurs éléments retrouvés dans le système digestif tels que l'acidité gastrique, les sels biliaires et les sécrétions pancréatiques. L'acide gastrique constitue le premier mécanisme de défense et les sels biliaires sont le deuxième facteur important tandis que les sécrétions pancréatiques peuvent également exercer une certaine activité antimicrobienne. Cependant, le passage dans l'estomac représente une importante difficulté pour les bactéries qui doivent atteindre l'intestin dans un état viable.

Certains probiotiques ingérés sont rapidement détruits dans l'estomac, tandis que d'autres survivent mieux au-delà de l'estomac, mais sont détruits par la flore endogène qui est répartie dans différents compartiments du tractus digestif (Figure 2).

Certains probiotiques ont une survie élevée tout au long de la région gastro-intestinale. Des études et des recherches sont toutefois intéressantes afin de porter de nouvelles données sur la tolérance ou la résistance des souches probiotiques aux stress digestifs, et qui doivent être prises en considération pour la mise au point de préparations probiotiques efficaces.

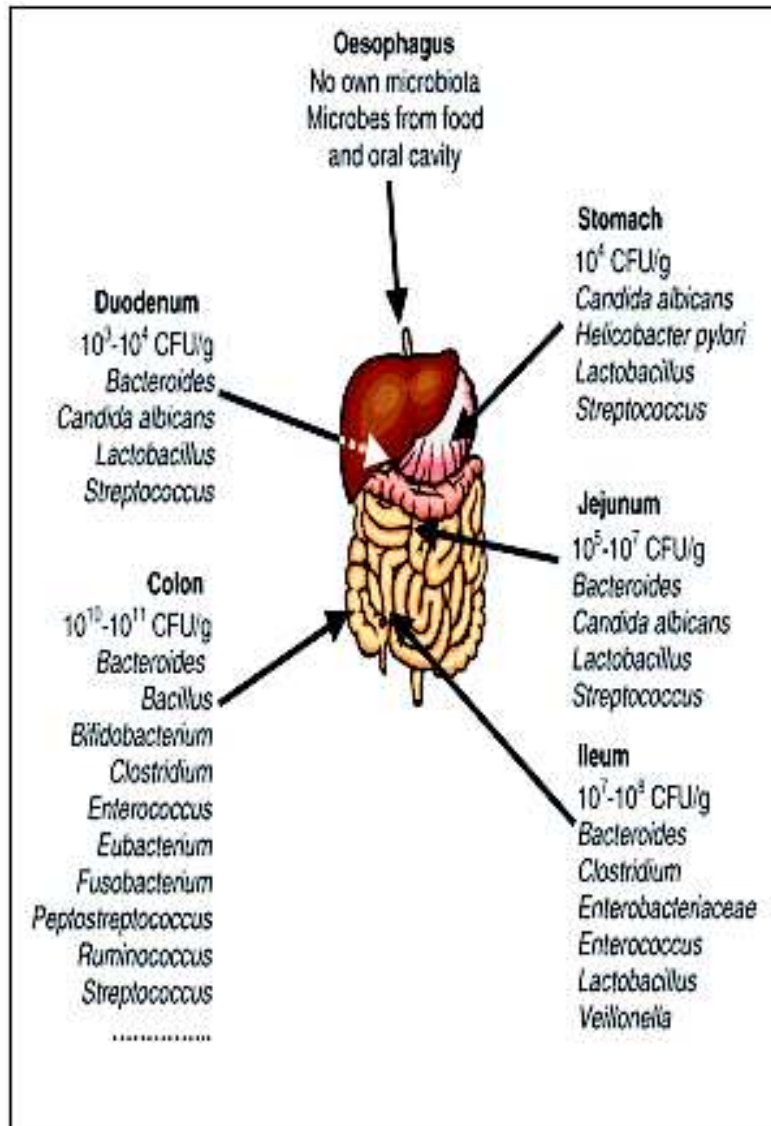


Figure 2: Les genres dominants dans les différents compartiments du tractus digestif (Isolauri et al., 2004)

## 2.2/ Les principales souches probiotiques

Les membres des lactobacilles et des bifidobactéries sont pour le moment les plus étudiés. Les lactobacilles ayant des effets bénéfiques sur la santé humaine sont *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lanthanum* et *Lactobacillus casei* (tableau1).

De nombreuses autres souches ont montré des effets intéressants *in vitro*, mais aucune étude clinique n'a encore validé leurs effets. Les bifidobactéries sont des bâtonnets aux formes variées dont la plus caractéristique est en forme de Y. Les bifidobactéries sont gram positif, hétérofermentaires, anaérobies stricts. Plus de 30 espèces sont maintenant connues, dont 10 ont été isolées chez l'homme (Tableau 3). Les bifidobactéries, ayant des effets probiotiques et utilisées commercialement, sont moins nombreuses que les lactobacilles. La souche la plus étudiée est *Bifidobacterium lactis*.

## 3/ Rôle des probiotiques dans les infections

### 3.1/ Effets directs sur les infections

Des études cliniques telles que celles effectuées par Mercenier et al, (2002), Turchet et al, (2003), Wang et al, (2004), Tursi et al, (2004), Plummer et al, (2004) permettent d'attribuer certaines allégations santé aux produits probiotiques. Les mécanismes les plus probables qui peuvent rendre compte des effets probiotiques des bactéries lactiques et leur rôle dans les infections microbiennes sont:

- La compétition au niveau de l'adhésion à la muqueuse intestinale.
- La compétition dans l'utilisation des nutriments.
- La production des substances antimicrobiennes.

En effet La flore microbienne du tractus intestinal est un écosystème complexe qui exerce de nombreuses fonctions physiologiques, dont la plus importante est la protection du système digestif contre les bactéries pathogènes, en formant une barrière au mouvement des germes indésirables. Chez les individus en bonne santé cette barrière est stable, de ce fait protégeant l'hôte et assurant la fonction intestinale normale. En effet, les probiotiques pourraient agir en inhibant l'implantation des germes pathogènes, par compétition pour la colonisation, au niveau de la muqueuse intestinale. A titre d'exemple pour ce mécanisme d'action, certaines souches de lactobacilles adhèrent aux villosités intestinales et inhibent la fixation d'*Escherichia coli* entéropathogènes. La capacité d'adhérence des probiotiques à l'épithélium digestif, peut être étudié *in vitro* avec des lignées cellulaires.

L'implantation des germes indésirables pourrait être également empêchée, par des probiotiques, qui exercent un effet antagoniste en venant à bout des nutriments présents dans le milieu privant ainsi les germes pathogènes d'une source d'énergie.

La stabilisation de la flore intestinale par compétition avec les bactéries pathogènes au niveau des substances nutritives n'est pas bien élucidée dans la littérature. Du point de vue physiologique, il est connu que les bactéries probiotiques se caractérisent par leur activité enzymatique leur permettant d'utiliser de nombreux sucres, comme le glucose, le lactose, le galactose, le sucrose, le raffinose, ..., de produire de l'acide lactique et de l'acide acétique (Yildirim et Johnson, 1998) ainsi que d'autres métabolites. Ces substances produites seront utiles pour empêcher l'implantation des microorganismes indésirables au niveau du tractus gastro-intestinal. Le (tableau 4) montre quelques souches probiotiques pour lesquelles des effets bénéfiques sur la santé sont bien connus (Mattila-Sandholm et al., 1999).

### 3.2/ Effets indirects de prévention

Certains types d'infections sont causés par la consommation d'aliments contaminés par les bactéries qui se trouvent généralement dans le sol, la végétation, les aliments du bétail et les matières fécales des humains et des animaux, dans divers produits laitiers, légumes, poissons et produits carnés.

Parmi ces bactéries les *Listeria*, constituent un problème majeur pour l'industrie agroalimentaire (Berche, 1991). En effet, cette bactérie qui contamine fréquemment les matières premières animales et végétales, est responsable de plusieurs infections. Par ailleurs, elle peut persister durant de longues périodes aux différentes étapes de la chaîne de production industrielle y compris sur des surfaces inertes sur lesquelles elle peut former de véritables biofilms (Gandhi, Chikindas, 2007). La bactérie est ainsi difficilement maîtrisable par les différents procédés de bio nettoyage et de décontamination couramment utilisés, ainsi que par l'utilisation des basses températures. Des chercheurs ont démontré que l'utilisation de la souche *Carnobacterium divergens* ou de sa bactériocine, la divergicine M35, a permis de contrôler la croissance de *Listeria monocytogenes* et de *Clostridium botulinum* pendant 21 jours d'entreposage, à 4 °C (Tahiri et al., 2004). De même aucun effet négatif n'a été observé au niveau des caractéristiques organoleptiques et sensorielles du saumon fumé traité. D'autres études ont montré l'utilisation des bactériocines comme agent antimicrobien dans l'emballage des produits carnés (Ming et al, 1997). Ainsi des sacs enduits de pédiocine ont permis d'inhiber complètement la croissance de *Listeria monocytogenes* inoculés dans divers produits carnés conservés pendant douze semaines à 4 °C.

Lactobacilles		Bifidobacteries
<i>Lb. lactotolerans</i>	<i>Lb. jensenii</i>	<i>B. animalis</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. kandelavii</i> <i>B. bifidum</i>	<i>B. asteroides</i>
<i>Lb. agilis</i>	<i>Lb. kefir</i>	<i>B. boum</i>
<i>Lb. alimentarius</i> L	<i>Lb. kefiranosens</i>	<i>B. brevis</i>
<i>Lb. amylophilus</i>	<i>Lb. malefermentans</i>	<i>B. catenulatum</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb. mali</i>	<i>B. choerinum</i>
<i>Lb. avarius</i>	<i>Lb. minor</i>	<i>B. coryneform</i>
<i>Lb. bifementans</i>	<i>Lb. murinu</i>	<i>B. cuniculi</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. oris</i>	<i>B. dentium</i>
<i>Lb. buchenen</i>	<i>Lb. parabushnei</i>	<i>B. gallicum</i>
<i>L. b. casei</i>	<i>Lb. rhamnimosus</i>	<i>B. gallinarum</i>
<i>Lb. colonoides</i>	<i>Lb. ruminis</i>	<i>B. globosum</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>B. indicum</i>
<i>Lb. farciminis</i>	<i>Lb. salivarius</i>	<i>B. infantis</i>
<i>Lb. fermentium</i>	<i>Lb. sanfrancisco</i>	<i>B. lactis</i>
<i>Lb. fructivorans</i>	<i>Lb. sharpeae</i>	<i>B. longum</i>
<i>Lb. fructosus</i>	<i>Lb. pentosis</i>	<i>B. angulatum</i>
<i>Lb. Gallinarum</i>	<i>Lb. pontis</i>	<i>B. merisicum</i>
<i>Lb. confius</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>Lb. coryneformis</i>	<i>Lb. reuteri</i>	<i>B. minimum</i>
<i>Lb. crispatus</i> l.	<i>Lb. suebicus</i>	<i>B. pseudoacutimilatum</i>
<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. vaccinistrericus</i>	<i>B. pseudolongum</i>
<i>Lb. Gasseri</i>	<i>Lb. vaginalis</i>	<i>B. pullorum</i>
<i>Lb. graminis</i>	<i>Lb. viridescens</i>	<i>B. ruminantium</i>
<i>Lb. halotolerans</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>	<i>B. secular</i>
<i>Lb. hamsteri</i>		<i>B. subtile</i>
<i>Lb. helveticus</i>		<i>B. suis</i>
<i>Lb. hilgardii</i>		<i>B. thermophilum</i>
<i>Lb. homohiochii</i>		
<i>Lb. intestinalis</i>		

Tableau 3 : Espèces de Lactobacilles et de Bifidobacteries connues (Vaughan et al., 2002)

<b>Souches probiotiques</b>	<b>Effets cliniques sur l'Homme</b>
<i>Lactobacillus GG ATCC 53103</i>	Adhésion aux cellules intestinales humaines, réduction de l'activité des enzymes fécales. prévention des diarrhées associées aux antibiotiques, prévention et traitement des diarrhées à rotavirus et autres diarrhées, modulation de la réponse immunitaire
<i>Lactobacillus johnsonii J-1 (LA-1)</i>	Prévention de la diarrhée du voyageur, modulation de la flore intestinale, réduction des symptômes de l'intolérance au lactose, traitement de la constipation, amélioration de l'immunité, adjuvant dans le traitement de <i>Helicobacter pylori</i>
<i>Bifidobacterium lactis bifidum Bb12</i>	Prévention de la diarrhée du voyageur, traitement des diarrhées virales (rotavirus), modulation de la flore intestinale, traitement de la constipation. modulation de la réponse immunitaire.
<i>Lactobacillus reuteri ATCC 55730</i>	Colonisation du tractus intestinal, réduction de la durée des diarrhées aux rotavirus. traitement des diarrhées virales
<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	Modulation de la flore intestinale, réduction de l'activité des enzymes fécales, effets positifs sur le cancer superficiel.
<i>Lactobacillus plantarum DSM 9843</i>	Adhésion aux cellules intestinales humaines, modulation de la flore intestinale

Tableau 4 : Exemples de souches probiotiques et de leurs effets cliniques (Adapté de Mattila et al. 1999)



# PARTIE EXPERIMENTALE

## 1/ MATERIELS ET METHDES

### 1/ origine des souches

---

Les souches de bactéries lactiques isolées au cours de cette étude (Tableau 5) ont été isolées à partir de laits crus ou fermentés (Raib).

Le prélèvement des échantillons est effectué directement du trayon de la vache en prenant la précaution de les laver avec une serviette et tirer quelques jets de lait pour réduire le nombre de bactéries dans le canal du trayon, le lait est récupéré directement dans un tube tenu horizontalement pour limiter la contamination par la litière. Le lait est refroidi rapidement en le déposant sur la glace au fond d'une glacière. La conservation des échantillons de lait se fait soit par réfrigération ou par congélation.

Les cultures commerciales utilisées ont été obtenues directement auprès des fournisseurs. La composition de ces cultures commerciales nous est généralement inconnue, elles peuvent contenir une ou plusieurs souches.

### 2/ Les milieux de culture

---

La préparation préalable des suspensions bactériennes au test d'acidification se fait sur bouillon complexe. Les souches de *streptococcus* et *lactococcus* sont cultivées sur bouillon Elliker ou M17. (Elliker *et al.*, 1956) additionné de 35 g/l de lactose et de 5 g/l de glycérophosphate de sodium. Le pH du bouillon est ajusté à 6,8. Les souches de lactobacilles sont cultivées sur bouillon MRS (Man *et al.*, 1960) additionné de 30 g de lactose. Le pH du bouillon est ajusté à 5,8. Les deux bouillons sont stérilisés à 120 °C pendant 15 min.

Souches	Source	Milieu de culture
R1	Raib	M17
R2	Raib	M17
R3	Raib	M17
R4	Raib	M17
R5	Raib	M17
L1	Lait cru	M17
R6	Raib	M17
R7	Raib	M17
L2	Lait cru	M17
R8	Raib	M17
L3	Lait cru	M17
R9	Raib	M17
R10	Raib	M17
L4	Lait cru	M17
L5	Lait cru	M17
R11	Raib	M17
R12	Raib	M17
R13	Raib	M17
R14	Raib	M17
R15	Raib	MRS
R16	Raib	MRS

Tableau 5: Origine des souches isolées

### 3/ Caractérisation des souches isolées

#### 3.1 / Essai d'identification des souches

Les colonies obtenues sont observées à la loupe binoculaire afin de déterminer leurs caractères culturels (couleur, disposition, forme et aspect). Les cellules sont examinées au microscope optique pour différencier la morphologie et la disposition.

La coloration de Gram est effectuée selon la méthode classique (Guiraud, 1998). Les tests biochimiques et physiologiques effectués sur les souches isolées sont:

- L'activité catalytique mise en évidence en émulsionnant la culture dans l'eau oxygénée à 20 volumes pour observer la production de gaz par effervescence,

- La citratase déterminée par la transformation du citrate contenu dans la gélose au lait en acide citrique et en gaz (Bourel *et al.*, 2001), Différentes températures de croissance ont été testées : Sur le milieu complexes à 10, 40 et 45°,
- La croissance des souches dans des conditions hostiles est étudiée : Sur le milieu de Naylor et Sharpe à pH 9,6,
- Les bactéries ont été testées en présence de différentes concentrations de Na Cl (2%, 4% et 6,5%).
- La thermo résistance des souches a été testé à 65°C durant 30 min.
- Pour l'étude des différentes réactions, l'incubation est généralement faite à 37°C pendant 24 à 48 h Les tests suivants ont été réalisés:
- Culture dans le lait de Sherman (lait à 0,1 % de bleu de méthylène).
- La production d'acétoïne est détectée par la réaction de Voges Proskawer sur milieu Clark et Lubs,
- Le métabolisme protéique est déterminé par l'hydrolyse de la gélatine. L'hydrolyse de l'amidon est caractérisée au lugol après trois jours d'incubation de l'espèce dans la gelose ordinaire additionnée de 0,3 % d'amidon soluble (Guiraud , 1998),
- L'effet de tolérance aux acides biliaires a été étudié selon la méthode décrite par Gilliland, (1990). Toutes les cultures ont été réalisées dans le bouillon MRS en présence de 0.3 % (p/v) de sels biliaires. L'inoculum est toujours ajouté à raison de (1 %, v/v) dans le MRS et incubées à la température de croissance optimale,
- Les caractères homofermentaires et heterofermentaires sont testés selon la technique de Gibson et Abdel-Malek,
- L'étude de la fermentation des sucres est réalisée sur le milieu spécifique à chaque genre, additionné d'un indicateur de pH. Plusieurs sucres ont été testés (lactose, saccharose, glucose, le fructose, maltose, melibiose, mannitol, raffinose ...)

### 3.2 / Mesure de la croissance

Au départ de l'expérience chaque souche doit être préalablement standardisé sur le plan physiologique de façon à obtenir une concentration cellulaire bien définie. Ainsi, chaque souche est incubée sur bouillon complexe à 37°C jusqu'à ce que le pH diminue d'une valeur 0,5 unité. On effectue alors un transfert sur bouillon de même nature par ensemencement à 5%. Cette culture est incubée jusqu'à atteindre un pH de  $4,8 \pm 0,1$ . A l'issue de l'incubation, on procède au dénombrement sur boîte de pétri par la méthode des dilutions décimales. La concentration cellulaire des suspensions est déterminée par turbidimétrie à 650 nm dans une cuve de 1cm de chemin optique à l'aide d'un spectrophotomètre.

### 3.3/ Conditions expérimentales et suivie d'acidification

200 ml de lait sont inoculés à 1% (V/V) à partir d'une suspension cellulaire standardisée. Deux types d'incubation sont utilisés:

- Incubation à la température constante de  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  pour les bactéries mésophiles
- Incubation à la température constante de  $44 \pm 1^\circ\text{C}$  pour les souches bactéries lactiques thermophiles.

Les mesures sont effectuées toutes les deux heures pendant 24 h par utilisation

de pH-mètre enregistreur. En règle générale, pour chaque analyse nous effectuons au moins trois répétitions ( la préparation de la suspension standard est toujours suivi d'acidification pour caractériser l'activité acidifiante d'une souche ou d'une culture.

### **3.4/ Antibiogramme**

L'analyse d'antibiogramme a pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de chacun des antibiotiques à l'égard des souches. Par définition (O.M.S.), la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée.

Tous les tests ont été effectués sur milieu Mueller- Hinton Agar (MHA). Les antibiotiques utilisés sont la pénicilline G, gentamicine, streptomycine et oxacilline et chloramphénicol (tous Sigma).

### **3.5/ Survie des bactéries lactiques dans le tube digestif du lapin**

Les lapins qui ont servi à cette expérimentation, sont tous de races locales rencontrées dans les élevages, un peu partout en Algérie. Ils sont élevés au sein de l'établissement dans un clapier du département de biologie. La salle est bien aérée, la température ambiante tourne autour de 20 à 25 degrés centigrade, pendant la période d'expérimentation. Le tube digestif de ces animaux est représenté dans la figure 3.

Ces lapins appartiennent à l'espèce *Oryctolagus cuniculis*, ils sont de sexe masculin âgés de 5 à 6 mois et pressentent un poids variant entre 1600 à 1700 g. Ils sont placés séparément dans des cages métalliques à l'intérieur d'une enceinte bien aérée. Avant de lancer les tests tous les animaux ont été soumis à un régime standard pendant une durée de 15 jours. A la fin de cette période d'adaptation les régimes alimentaires ont été supplémentés par un apport régulier de préparation à base de lait contenant les souches étudiées. Le taux de survie a été estimé par l'analyse microbiologique des selles ou par intubation.

#### **3.5.1/ Prélèvement des selles**

Les prélèvements des selles étaient effectués d'une façon aléatoire avant l'incorporation des souches dans l'alimentation, puis une fois que les souches sont ajoutées au régimes, les prélèvements sont effectués tous les jours d'une façon régulière à une heure précise jusqu'à la fin de l'expérimentation.

L'analyse microbiologique des selles, consiste à diluer 1g de selles dans 9ml d'eau physiologique stérile, le tout est broyé puis filtré sur papier filtre stérile, le filtrat est récupéré pour être cultivé sur milieu M17 ou MRS.

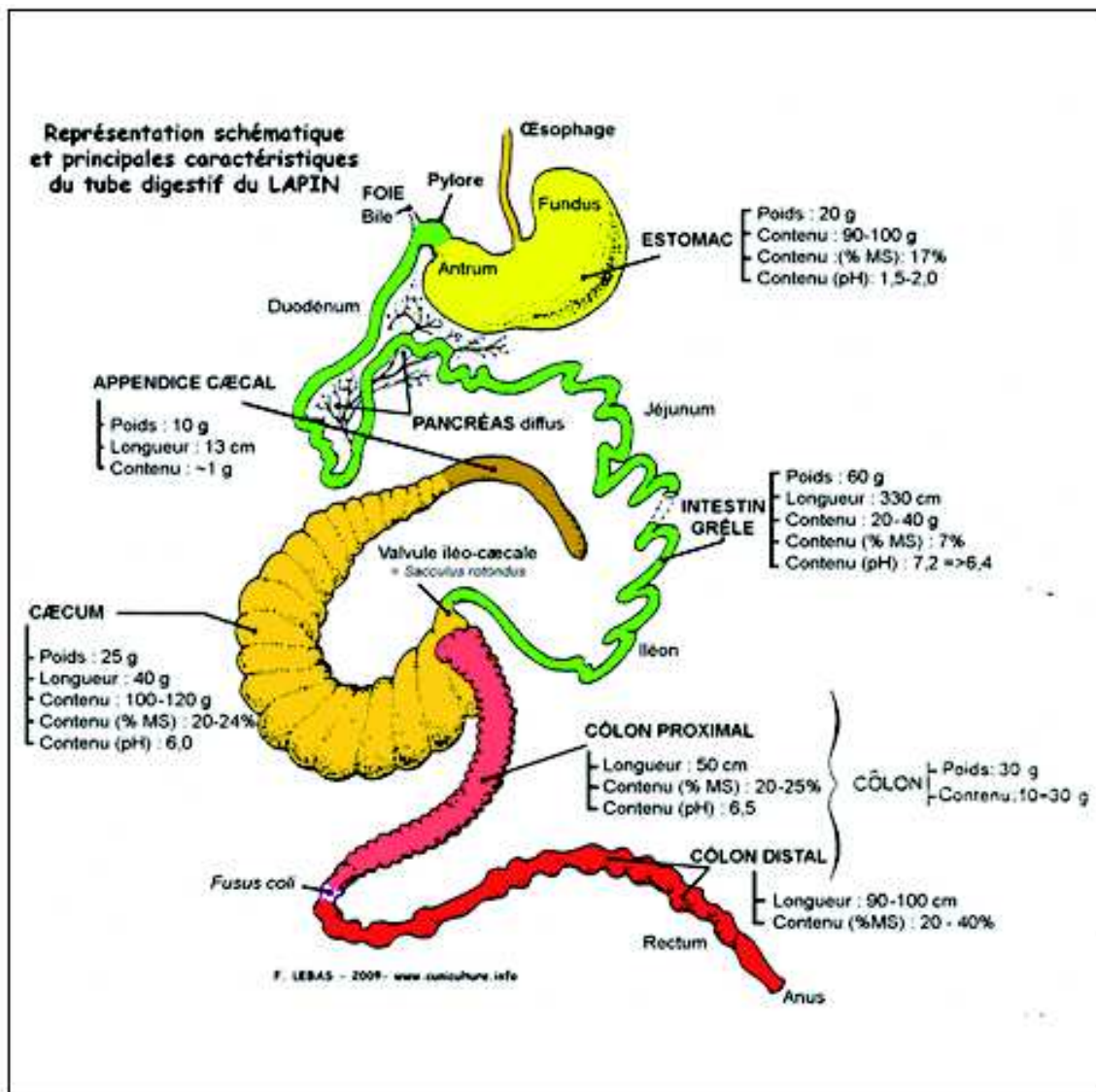


Figure 3 : Schéma du tube digestif du lapin (Lebas et al., 1996)

### 3.5.2/ Prélèvement du liquide duodénale

Le liquide duodéal est prélevé au niveau du duodénum du lapin, à l'aide d'une sonde après sacrifice de celui-ci, après filtration du liquide le filtrat est récupéré pour les tests de dénombrement sur boîte. Cette analyse permet de déterminer l'action des cellules biliaires sur les souches de bactéries lactiques locales.

## 4/ propriétés antibactériennes des souches

### 4.1/ Activité antibactérienne sur milieu solide

Les nombreuses méthodes décrites pour la détection de souches lactiques productrices de bactériocines, sont basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi solide qu'on inocule préalablement avec une

souche cible. La production de bactériocine est détectée par le pouvoir inhibiteur du filtrat du micro-organisme testé sur la croissance du germe cible.

Les souches de bactéries lactiques après culture sur milieu MRS 37°C pendant 18h sont testées pour leur pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion de Barefoot et al. (1983).

#### 4.2/ Activité antibactérienne sur milieu liquide

On détermine le titre antibactérien en quantifiant les effets sur une bactérie sensible: *Listeria innocua* qui présente les mêmes caractéristiques que celles d'une autre bactérie *L. Monocytogenes* tout en présentant l'avantage de n'être pas pathogène. Pour cela : 5 ml de filtrats de surnageant des cultures obtenu par filtration sur filtre millipore 0,2 µm seront dilués au demi, jusqu'à une valeur critique le dispositif expérimental comporte plusieurs étapes, comme énumérés dans les figures 4, 5, 6 et 7.

#### 4.3/ Nature de la substance inhibitrice

Le surnageant doté d'activité inhibitrice des souches productrices est testé en présence de trypsine chymotrypsine pronase protéase k catalase et amylase jusqu' à une concentration finale de 1 mg/ml le mélange est incubé à 37°C pendant 3 h. La stabilité de la substance active aux pH acides a été étudiée en ajustant le pH aux valeurs de 3, 4, 5. Les bactériocines étant connues pour être des protéines résistantes à des températures élevées la thermo stabilité des substances inhibitrices a été testée par l'action d'un chauffage à 70 et 100°C pendant 0, 15, 20, et 30 min. Comme précédemment, on utilise la méthode de diffusion en milieu gélosé TSA pour mettre en évidence le pouvoir bactéricide des souches.

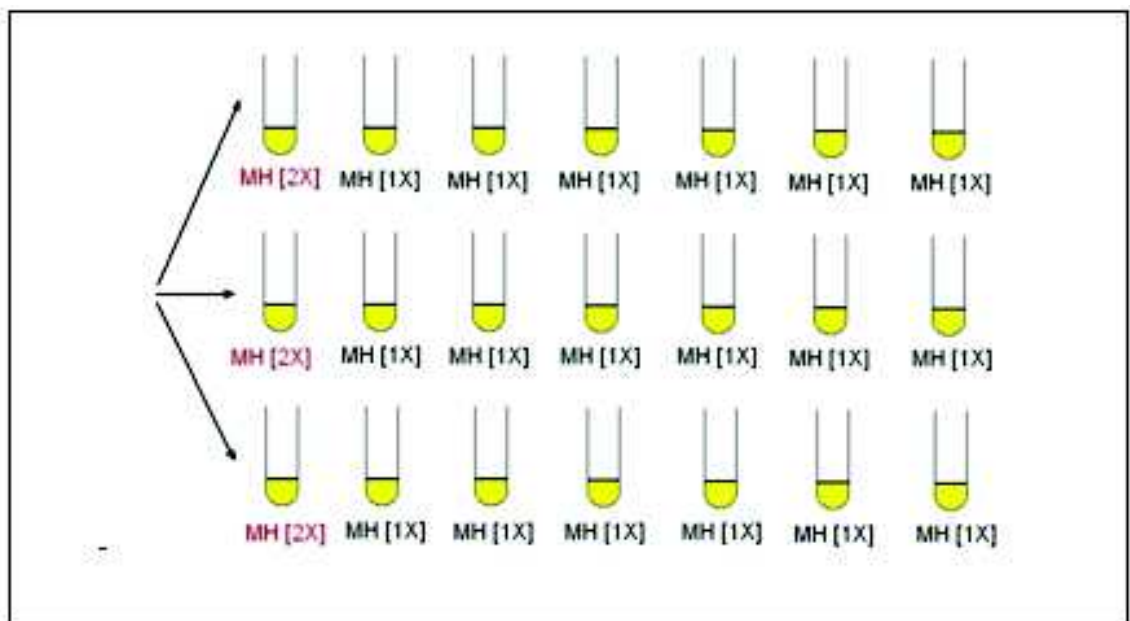


Figure 4: préparations des milieux de culture

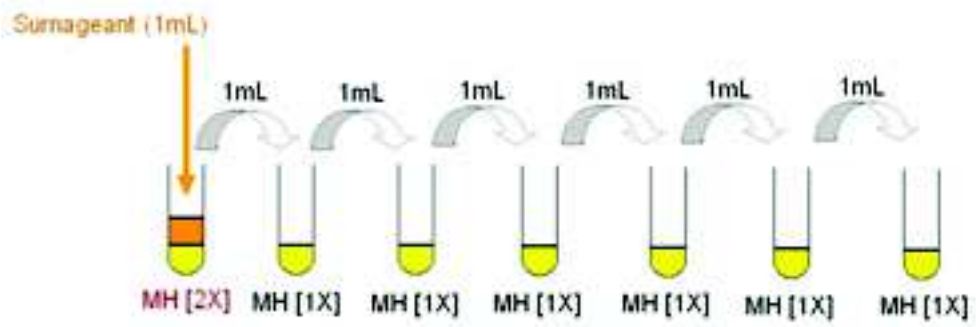


Figure 5: Dilution au 1/2 du surnageant actif

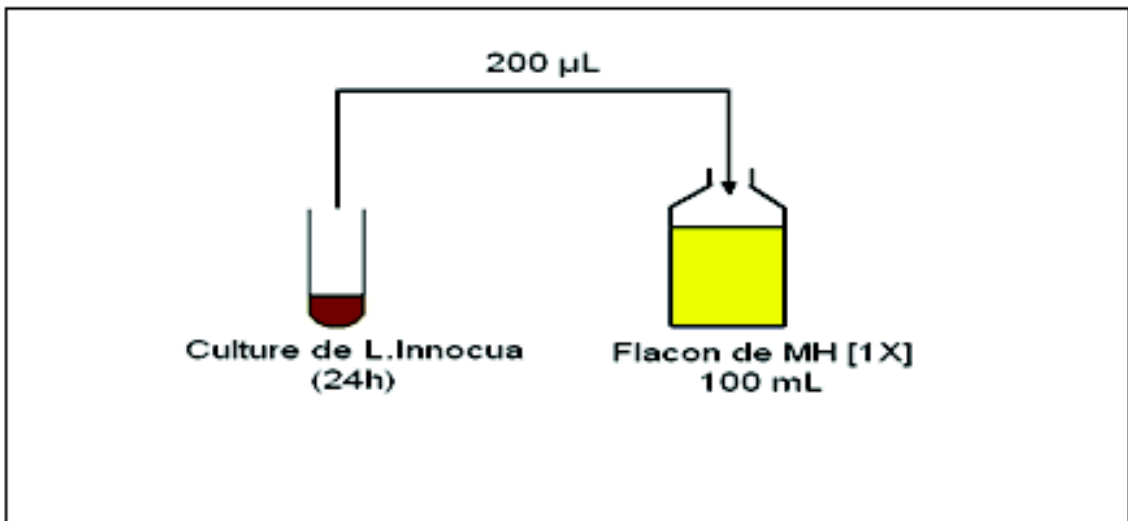


Figure 6 : Préparation de l'inoculum

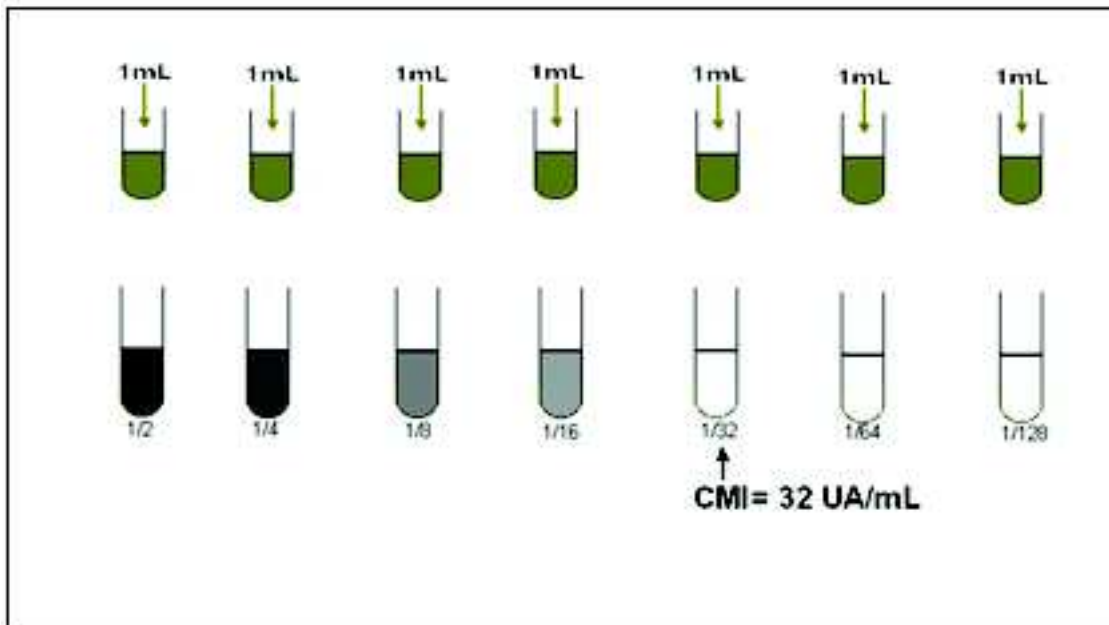


Figure 7 : Evaluation du titre antibactérien

#### 4.3.1/ Extraction des bactériocines

L'extraction des bactériocines a été faite selon la méthode de (Burianek et Youssef, 2000). 1L du milieu de culture MRS est inoculé à raison de 1 /100 V/V par une pré culture de la souche souches étudiée. Après 18 h d'incubation à 37°C la culture est centrifugée à 8500g pendant 20 min à 12°C. Le surnageant est récupéré. Pour extraire le principe actif le même volume de chloroforme est ajouté au surnageant, le mélange est agitée énergiquement pendant 20 min. On laisse décanter dans des ampoules le principe actif est représenté par la phase intermédiaire entre le chloroforme et la phase aqueuse. La phase intermédiaire ou interphase est récupérée dans des tubes à hémolyse.

Les échantillons sont évaporés dans le speedvac puis resuspendus dans de l'eau déminéralisée stérile. La concentration antibactérienne de chaque échantillon a été conduite avec la méthode de dilutions critique (Mayr-Harting, et *al.* 1972). La concentration de bactériocine calculée en Unité Arbitraire (AU. ml<sup>-1</sup>) est définie comme étant l'inverse de la concentration minimale inhibitrice. Toutes les expériences ont été répétées trois fois.

#### 4.3.2/ Purification par HPLC de la bactériocine

La substance active a été purifiée par la méthode HPLC sur une colonne C18 (silice Uptisphere120A, 5um, 15 cmL, ODB, 4,68 mm, interchim). Le système de solvant utilisé est composé de l'acétonitrile (solvant B) acidifié avec 0,1% du TFA et l'eau ultra pure (milliQ) acidifiée avec du TFA 0,1% (Solvant A).

Le débit d'élution est de 1ml par minute et le temps d'analyse est de 120 mn. L'élution de l'extrait se fait en augmentant progressivement la proportion du solvant B). Les solutions de la phase mobile et le programme du système gradient utilisé sont les suivants :

A: Eau ultra pure contenant 0,1 % de TFA

B: Acétonitrile contenant 0,1 % de TFA

Le programme utilisé est le suivant :

Temps (mn)	B (%)	A (%)
0	100	0
100	50	50
105	100	0
120	100	0

600 µl d'extrait brut (extrait au chloroforma diluées dans 600 ul d'eau pure et filtrée à travers le filtre millipore (0.22 um). Un ml d'extrait est introduit dans le système d'injection.

La détection en sortie de colonne est réalisée par la lecture de l'absorbance à 226 nm. Les fractions éluées toutes les 5 min sont récupérées est conservées à 4°C. Elles sont ensuite séchées par évaporation au "speedvac" les fractions sont ensuite récupérées dans 200 µl. Les fractions qu présentent une activité sont conservées -20°C pour l'analyse en spectrométrie de masse.



---

## 5/ Extraction des plasmides

---

Pour l'extraction des plasmides on a adopté le protocole indiqué dans le kit Miniprep avec les différents tampons de la firme (QUIAGEN, hilden ,germany). Pour cela nous avons suivis les étapes suivantes :

- A partir d'une colonie on effectue une pré culture de 250 ml durant une nuit à 37°C, dans du milieu MRS avec agitation, diluer au 1/50 et incuber cette subculture à 37°C pendant 12 à 16 h avec agitation forte de façon à obtenir  $4 \cdot 10^9$  cellule par ml .
- Centrifuger les cellules à 9000 rpm pendant 15 min à 4 °C, vider le surnageant et bien décanter le reste du milieu sur du papier filtre. Remettre en suspension d'une façon homogène le culot bactérien dans 10 ml du tampon P1 contenant 5mg / ml, incuber 30 min à 37°C.
- Ajouter 10 ml de tampon P2 (refermer le flacon immédiatement) et mélanger en inversant doucement 4 à 6 fois le pot à centrifuger. Un lysat visqueux doit être obtenu, pendant ce temps préparer le QA filter munie de son bouchon.
- ajouter 10 ml de tampon P3 glacé au lysat et inverser le tube immédiatement 4 à 6 fois, la solution doit devenir laiteuse.
- Verser le lysat dans la cartouche QA filter et laisser reposer à température ambiante pendant 10 min un précipité de l'ADN génomique des protéines et des détergents va flotter au sommet de la cartouche.
- Equilibrer une cartouche QIAGEN-tip 500 en appliquant 10 ml de tampon QBT et laisser la colonne se vider par gravité.
- Retirer le bouchon de la cartouche QA filter, insérer le piston et filtrer le lysat cellulaire dans la cartouche QAGEN –tip 500; laisser couler par gravité.
- Laver la colonne QAGEN tip 500 avec 3 x 10 ml de tampon QC.
- Eluer l'ADN plasmidique par 15 ml de tampon QF dans deux tube à centrifuger de 30 ml stériles.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 10,5 ml d'isopropanol , mélanger par inversion et centrifuger à 9000 trs / mn à 4°C. Décanter soigneusement le surnageant dans un pot stérile.
- Laver le culot d'ADN plasmidique par 5 ml d'éthanol 70% et recentrifuger ; puis décanter soigneusement le surnageant.

### 5.1/ Electrophorèse sur gel d'agarose

L'analyse de l'ADN de *Streptococcus Thermophilus* est effectuée par la méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose, la migration se fait pendant une heure ,le réglage du voltage est fixé à 100 volts, le gel étant constitué de 0,7% d'agarose. Les échantillons sont analysés sous UV dans un analyseur Bio-rad.

Pour la préparation du gel on suit les étapes suivantes :

1. On Mélange tampon TBE et agarose à raison de 0,8 g d'agarose pour 100 mL de tampon (la proportion d'agarose dépend de la taille des molécules d'ADN à séparer).
2. Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes en surveillant pour éviter les projections ou au bain marie. On Agiter de temps à autre pour homogénéiser le mélange.
3. Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue.
4. Couler lentement le gel sur 3 à 5 mm d'épaisseur jusqu'au niveau maximale.
5. Laisser refroidir, enlever le peigne et les joints. Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons. (figure 8).

Pour la préparation de l'échantillon, on suit les étapes suivantes :

1. Mélanger le colorant de charge et l'ADN sur un morceau de parafilm et prélever le mélange avec une micropipette réglée sur le volume approprié en changeant de cône à chaque prélèvement.
2. Placer le support avec le gel chargé dans la cuve d'électrophorèse en positionnant les puits du côté de la cathode (pôle noir).
3. Remplir la cuve de tampon TBE (réutilisable plusieurs fois) en versant délicatement et très lentement lorsque le gel commence à être recouvert pour éviter les fuites d'ADN vers le tampon.
4. Fermer la cuve, brancher les fils et mettre sous tension.
5. Laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel (environ 55 min à 100 V pour un gel de 80 mm dans une mini cuve) comme indiqué à la figure 8.

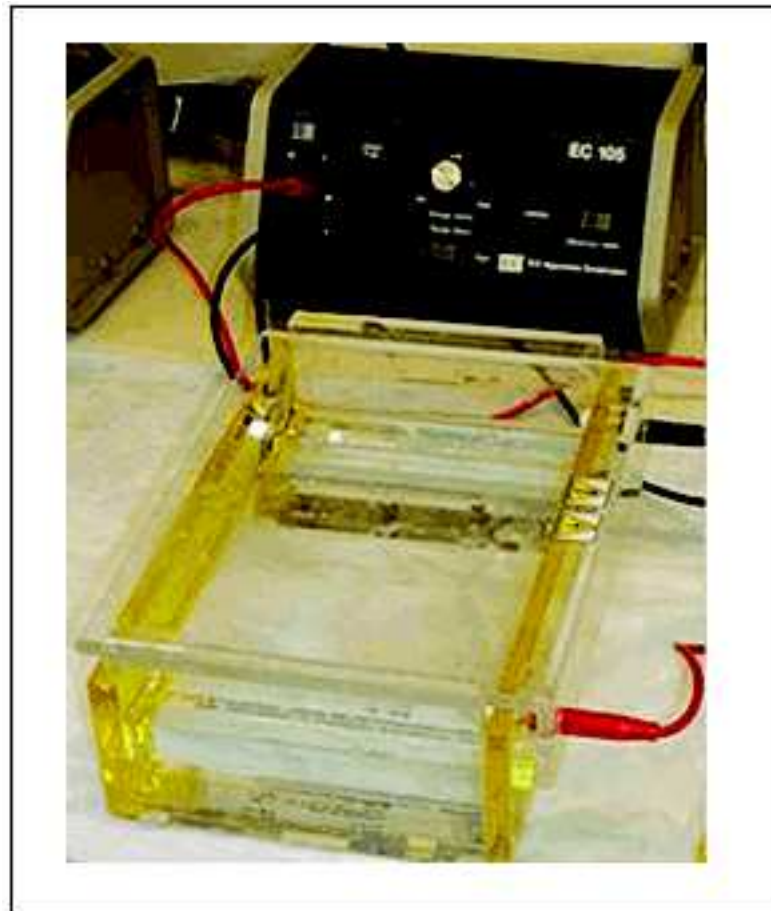


Figure 8: Cuve d'électrophorèse

## 6/ Modélisation de la croissance d'une souche productrice *Sc. thermophilus* T2

L'effet du pH, de la température et du Na Cl du milieu de culture sur la croissance et le pouvoir acidifiant de *Sc. thermophilus* a été étudié à trois niveaux différents : 5, 6 et 7, pour

le pH, et de 32, 37 et 42°C pour les température et 0, 30 et 60 g/l pour les concentrations en sel (tableau 6).

<b>[Na Cl] en g.l<sup>-1</sup></b>	<b>Température en °C</b>	<b>pH</b>	<b>Fermentation n°</b>
0	32	5/6/7	1
30	37	5/6/7	2
60	42	5/6/7	3
0	32	5/6/7	4
30	37	5/6/7	5
60	42	5/6/7	6
0	32	5/6/7	7
30	37	5/6/7	8
60	42	5/6/7	9

*Tableau 6 : Niveau des paramètres retenus pour la modélisation de la croissance de Sc. thermophilusT2*

Pour chaque expérience, un Erlenmeyer contenant 250 ml du milieu MRS dont le pH et la salinité sont préalablement ajustés , estensemencé (par une culture de 24h), homogénéisé, puis immédiatement réparti en tubes de 10ml . Ils sont par la suite incubés à la température désirée (figure 9). On effectue un point d'analyse toutes les deux heures, et ce jusqu'à ce que la croissance des microorganismes atteint la phase stationnaire de développement. Chaque point comporte :

- Une mesure de l'absorbance à  $\lambda = 660 \text{ nm}$

Celle-ci permet d'apprécier l'évolution relative de la population bactérienne et donc de décider des dilutions à effectuer pour le dénombrement. Les mesures sont effectuée par rapport à un témoin constitué du surnageant ayant subi les mêmes traitement (ajustement du pH puis stérilisation)

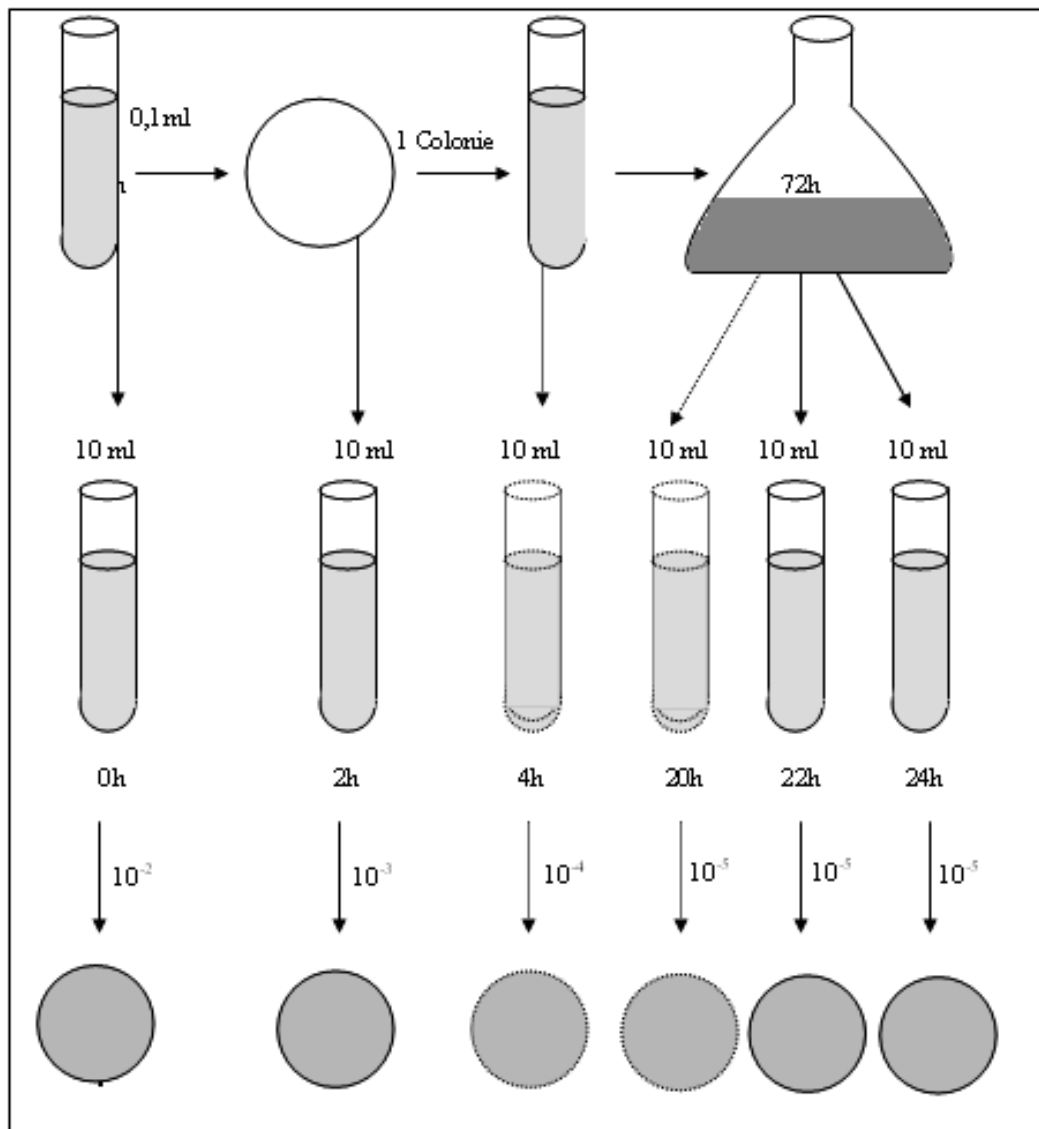


Figure 9: Schéma montrant les Différentes étapes d'isolement et de dénombrement de *Sc. thermophilus* T2 en vue d'élaboration d'un plan d'expérience

- Le pH est mesuré à l'aide d'un pH mètre étalonné entre 4 et 7
- Le suivi de la cinétique de croissance est réalisé par la numération des cellules bactériennes sur boîte de pétri. Pour chaque point de la cinétique, une série de dilutions successives est réalisée dans des tubes contenant 9 ml d'eau physiologique. 100  $\mu$ l de chaque dilution est étalée en surface sur milieu solide.

## 2/ RESULTATS ET DISCUSSIONS

### 1/ Caractéristiques biochimiques des souches étudiées

21 souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir du lait cru ou fermenté produits par des vaches locales. Les résultats obtenus sur les 21 souches isolées ont montré que la plupart des espèces sont Gram positif, immobiles, catalase négative, peroxydase négative. La plupart des souches sont capables de se développer à 10 et 40°C et à pH 9.6 mais incapables, hormis deux souches, de se développer en présence de 6.5 % de NaCl.

L'analyse des résultats des caractères culturels, biochimiques et physiologiques des souches nous a permis de mettre en évidence 4 espèces différentes où la prévalence du genre *Lactococcus* est bien nette (tableau 7 et 8). Les formes plus fréquemment rencontrées sont surtout des coques. Des résultats similaires ont été rapportés par (Bekhouche et Boulehrouf, 2005). Les trois espèces sous formes cocoides, localisées dans l'ensemble des échantillons de laits, sont représentées par *Lactococcus lactis* (les plus abondants), *Streptococcus thermophilus* et *Lactococcus cremoris*. Dans le genre *Lactobacillus*, une seule espèce est identifiée, il s'agit de *Lactobacillus bulgaricus*.

## 2/ Sélection des souches isolées

### 2.1/ Paramètres de croissance et pouvoir acidifiant

Pour la sélection des souches des bactéries lactiques, nous avons tenu compte de deux paramètres importants, le pouvoir acidifiant des souches et leurs taux de croissance respectif. Ainsi les souches susceptibles d'être pathogènes ou présentant un pouvoir hémolytique ont été écartées d'office. Les résultats pour ces deux paramètres sont consignés dans le tableau 9.

Nous avons remarqué que contrairement aux espèces mésophiles les espèces thermophiles ont un taux de croissance bien plus grand, en tenant compte de ce caractère de sélection c'est *Streptococcus thermophilus* qui vient en première position secondé immédiatement par *Lactobacillus bulgaricus*. Par ailleurs, concernant le pouvoir acidifiant, c'est toujours les mêmes espèces qui viennent en première position avec un pH final de 4.5 pour *Sc. thermophilus T1* et un pH final de 4.3 pour *Lb bulgaricus*.

### 2.2/ Sensibilité des souches aux antibiotiques (Antibiogramme)

De plus en plus de souches possèdent des résistances aux antibiotiques. Cette résistance aux antibiotiques présente chez une souche peut être transférée à une autre souche. Ceci présente un risque de dissémination, facteur de risque de résistance aux antibiotiques. Pour l'ensemble nous pouvons dire que peu de souches ont montré une résistance aux antibiotiques étudiés, c'est le cas de quelques souches de *Lactococcus*, notamment la souche S6 qui s'avère multirésistante. A mentionner par ailleurs qu'aucune souche n'a pu résister à l'action de la streptomycine. L'essentiel des résultats du test antibiogramme est présenté dans le tableau 10.

### 2.3/ Activité antibactérienne des souches

L'étude de la production de substances antagonistes a été réalisée dans des conditions excluant toutes inhibitions éventuelles qui pourraient être dues à l'acidité ou à la production de peroxyde d'hydrogène. Nous utilisons respectivement des milieux de culture tamponnés et la catalase. Le tableau 11 regroupe l'ensemble des souches bactériennes testées par la méthode de double couche. Nous remarquons que par rapport aux autres bactéries les 2 souches de *Sc. thermophilus T1* et *T2* présentaient les effets antibactériens les plus

prononcés. Ceci peut s'expliquer par l'aptitude des dites souches à produire un agent anti-*Listeria* spécifique dont les propriétés peuvent être assimilées à celles des bactériocines. Les zones d'inhibition pour certaines souches sont très significatives (figure 10).

Espèces	Arudon	Arabinose	cellobiose	galactose	glycérol	inuline	Lactose	Maltose	Mannitol	Melbiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Sorbitol	Trehalose	saccharose	Catalase
R1= <i>L.c.l S1</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
R2= <i>L.c.l S2</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
R3= <i>L.c.l S3</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
R4= <i>L.c.l S4</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+		-
R5= <i>L.c.l S5</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
L1= <i>L.c.l S6</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
R6= <i>L.c.l S7</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
R7= <i>L.c.l S8</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
L2= <i>L.c.l S9</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
R8= <i>L.c.l S10</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
L3= <i>L.c.l S11</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
R9= <i>L.c.l S12</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
R10= <i>L.c.l S13</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
L4= <i>S.c.t T11</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
L5= <i>S.c.t T2</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
R11= <i>L.b.b B1</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
R12= <i>L.b.b B2</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
R13= <i>L.c.c R1</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	
R14= <i>L.c.c R2</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
R15= <i>L.c.d D1</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	
R16= <i>L.c.d D2</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-

Tableau 7 : Tests biochimiques d'identification des souches isolées

Espèces	Croissance dans /à:								Résistance à 5 °c 30mn	Gaz à partir du glucose	Hydrolyse de			Voges proskauer	Lait de sherman
	mobilité	Na Cl 2%	Na Cl 4%	Na Cl 6.5%	pH 9.6	10°C	40°C	45°C			PH3.5	Esculine	Gélatine		
R1= <i>Lc.lactis</i> S1	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
R2= <i>Lc.lactis</i> S2	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-
R3= <i>Lc.lactis</i> S3	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
R4= <i>Lc.lactis</i> S4	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
R5= <i>Lc.lactis</i> S5	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-
L1= <i>Lc.lactis</i> S6	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
R6= <i>Lc.lactis</i> S7	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-
R7= <i>Lc.lactis</i> S8	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-
L2= <i>Lc.lactis</i> S9	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
R8= <i>Lc.lactis</i> S10	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
L3= <i>Lc.lactis</i> S11	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
R9= <i>Lc.lactis</i> S12	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
R10= <i>Lc.lactis</i> S13	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
L4= <i>Sc. thermophilus</i> T1	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+

Tableau 8 : Croissance dans les milieux hostiles

#### 2.4/ Résistance à l'action des sels biliaries

D'après les résultats du tableau 12 le comportement des souches en présence de sels biliaries n'est pas le même ; certaines souches sensibles à l'action des sels biliaries sont incapables de se développer c'est le cas de quelques *Lactococcus* (S4, S5, S6). D'autres souches, moins sensibles arrivent quand même se développer mais à des taux assez faibles assez faibles, de l'ordre de  $10^2$  à  $10^3$ . Par ailleurs, des souches comme *Sc. thermophilus* T2 ou *Lactobacillus* B1 ne semblent que peu affectées par la présence de sels biliaries dans le milieu, et leurs activité inhibitrice reste sensiblement la même. En effet, Russell et al., (1992) qui ont clairement démontré, *in vitro*, que les sels biliaries avaient un effet bactéricide, alors que plusieurs micro-organismes de la flore intestinale, y compris quelques bactéries lactiques, peuvent métaboliser les sels biliaries. Il semble que les sels biliaries auraient un effet détergeant sur les membranes cellulaires résultant de l'augmentation de la perméabilité cellulaire,

Pour (Noriega et al, 2004) l'inhibition exercée par les sels biliaries peut être levée par une adaptation progressive à des concentrations croissantes de bile. Au vu des résultats nous pouvons dire que *Sc. thermophilus* a poussé d'une manière satisfaisante dans le bouillon MRS bilié avec des taux appréciables qui sont de l'ordre de  $10^7$  cellules / ml.

La même remarque est faite pour les deux souches de *Lb. bulgaricus*. Cependant, la croissance des autres souches de *Lc. lactis* est très faible voire nulle pour certaines

d'entre elles. Ces résultats montrent bien que seulement certaines bactéries lactiques soient capables de se développer en présence de sels biliars. Chez les lactobacilles, il semble que les acides biliars seraient métabolisés par les hydrolases de sels biliars (BSH) en glycine ou en taurine. Cette hydrolyse a pour conséquence d'altérer les propriétés de la bile et notamment diminue sa solubilité à baspH ainsi que son activité comme détergents (Adamowicz et al., 1991; De Smet et al., 1995).

<b>Souches</b>	<b>Acidité finale après 18h d'incubation</b>	<b>Taux de croissance h<sup>-1</sup></b>
<i>Lc. lactis</i> S1	5.2	0.92
<i>Lc. lactis</i> S2	5.3	0.85
<i>Lc. lactis</i> S3	5.5	0.95
<i>Lc. lactis</i> S4	5.0	0.77
<i>Lc. lactis</i> S5	5.2	0.98
<i>Lc. lactis</i> S6	5.4	0.77
<i>Lc. lactis</i> S7	4.8	1.01
<i>Lc. lactis</i> S8	4.7	1.22
<i>Lc. lactis</i> S9	4.9	0.69
<i>Lc. lactis</i> S10	5.1	1.15
<i>Lc. lactis</i> S11	5.2	0.88
<i>Lc. lactis</i> S12	4.8	1.00
<i>Lc. lactis</i> S13	5.3	0.88
<i>Sc. thermophilus</i> T1	4.5	1.33
<i>Sc. thermophilus</i> T2	4.6	1.4
<i>Lc. cremoris</i> R1	5.1	0.79
<i>Lc. cremoris</i> R2	5.4	0.81
<i>Lc. diacetylactis</i> D1	5.0	0.74
<i>Lc. diacetylactis</i> D2	4.8	0.85
<i>Lc. bulgaricus</i> B1	4.3	1.22
<i>Lc. bulgaricus</i> B2	4.5	1.13

Tableau 9: Pouvoir acidifiant des souches



<b>Souches</b>	<b>Peni.G</b>	<b>Genta</b>	<b>Strepto</b>	<b>Oxac</b>	<b>Chlora</b>
<i>Lc. lactis</i> S1	S	S	S	S	S
<i>Lc. lactis</i> S2	S	S	S	S	S
<i>Lc. lactis</i> S3	S	S	S	S	R
<i>Lc. lactis</i> S4	S	S	S	S	S
<i>Lc. lactis</i> S5	S	S	S	S	S
<i>Lc. Lactis</i> S6	R	S	R	S	R
<i>Lc. lactis</i> S7	S	S	S	S	S
<i>Lc. lactis</i> S8	S	S	S	R	S
<i>Lc. lactis</i> S9	R	S	S	S	S
<i>Lc. lactis</i> S10	S	S	S	S	S
<i>Lc. lactis</i> S11	S	S	S	S	S
<i>Lc. lactis</i> S12	S	S	S	S	R
<i>Lc. lactis</i> S13	R	S	S	S	S
<i>Sc. thermophilus</i> T1	S	S	S	S	S
<i>Sc. thermophilus</i> T2	S	S	S	S	S
<i>Lc. cremoris</i> R1	S	S	S	S	S
<i>Lc. cremoris</i> R2	S	S	S	S	S
<i>Lc. diacetylactis</i> D1	S	S	S	S	S
<i>Lc. diacetylactis</i> D2	S	S	S	S	S
<i>Lb. bulgaricus</i> B1	S	S	S	S	S
<i>Lb. bulgaricus</i> B2	S	S	S	S	S

Peni.G : Pénicilline G, Genta : Gentamicine, Strepto : Streptomycine,

Oxac : Oxacilline, Chlora : Chloramphénicol

Tableau 10 : Antibiogramme des différentes souches

Peni.G : Pénicilline G, Genta : Gentamicine, Strepto : Streptomycine,

Oxac : Oxacilline, Chlora : Chloramphénicol

Souches	Activité anti- <i>Listeria</i>
<i>Lactococcus lactis</i> S1	+
<i>Lactococcus lactis</i> S2	+
<i>Lactococcus lactis</i> S3	-
<i>Lactococcus lactis</i> S4	-
<i>Lactococcus lactis</i> S5	-
<i>Lactococcus Lactis</i> S6	-
<i>Lactococcus lactis</i> S7	+
<i>Lactococcus lactis</i> S8	
<i>Lactococcus lactis</i> S9	+
<i>Lactococcus lactis</i> S10	-
<i>Lactococcus lactis</i> S11	-
<i>Lactococcus lactis</i> S12	-
<i>Lactococcus lactis</i> S13	-
<i>Streptococcus thermophilus</i> T1	++
<i>Streptococcus thermophilus</i> T2	+++
<i>Lactococcus cremoris</i> R1	-
<i>Lactococcus cremoris</i> R2	-
<i>Lactococcus diacetylactis</i> D1	-
<i>Lactococcus diacetylactis</i> D2	+
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> B1	+
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> B2	+

(+) faible inhibition ; (++) inhibition moyenne; (+++), forte inhibition  
 (-), absence d'inhibition

Tableau 11: Activité anti- *Listeria* des différentes souches

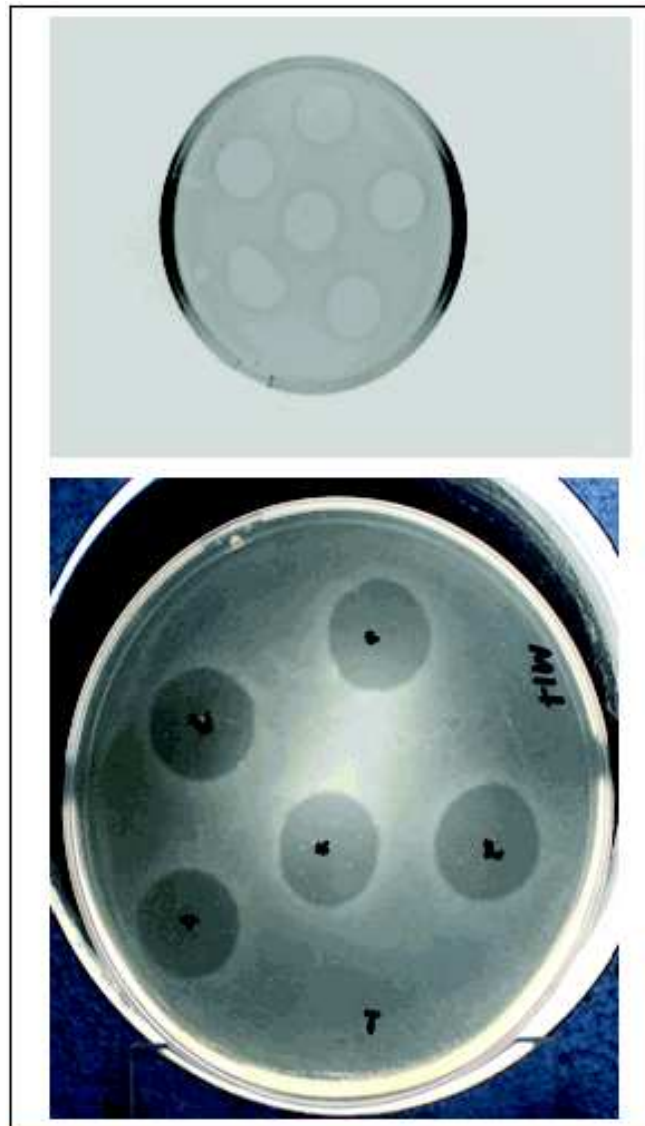


Figure 10 : Culture sur boîte de pétri montrant les zones d'inhibition Exercées par les souches actives contre : *listeria innocua*

### 3/ Caractérisation des souches productrices de bactériocines

#### 3.1/ Spectre d'action

Les bactéries lactiques sont généralement sélectionnées pour leur propriété technologique: bonne croissance et participation au développement de flaveur au cours de la fermentation du lait ou encore résistance aux bactériophages. Mais depuis quelques années, avec le développement des connaissances relatives à l'effet bénéfique des bactéries lactiques sur la santé, d'autres propriétés sont prises en compte. Un déterminant essentiel dans la sélection d'un micro-organisme potentiel probiotique est sa capacité d'atteindre, de survivre voire de persister dans l'environnement dans lequel il doit agir. C'est pourquoi de nombreuses études visent à sélectionner des souches capables de tolérer l'acidité gastrique et les sels

biliaires, d'adhérer in vitro aux cellules épithéliales et enfin être capable de produire plusieurs substances antimicrobiennes.

Les souches de bactéries lactiques testées pour leur activité inhibitrice contre *L. monocytogenes* ont montré une activité assez nette. Les diamètres des halos d'inhibition étaient dans tous les cas dans la gamme de 7,7 à 9,5 ml. La plupart des souches testées ont montré une activité anti-listeria (tableau 13) Pour les autres bactéries pathogènes certaines souches comme *Sc. thermophilus* ont présenté un spectre d'action large contrairement à d'autres souches tel que *Lc. diacetylactis* dont l'action inhibitrice étroite ne concerne qu'une seule espèce.

Vers la fin des années 1980, seuls les lactobacilles, les lactocoques et les pédiocoques avaient révélé la présence de bactériocines (Klaenhammer, 1988). Actuellement, il a été montré, que presque tous les genres comportent des souches productrices de bactériocines. Si le nombre de bactériocines connues n'a cessé de croître, le nombre réel de structures nouvelles semble stagner, dans la mesure où plusieurs laboratoires disséminés dans le monde ont récemment caractérisé des bactériocines identiques ou très proches (Hastings et al., 1991; Héchard et al., 1992; Felix et al., 1994).

### **3.2/ Extraction d'une bactériocine produite par *Streptococcus thermophilus*** **T 2**

L'extraction de la bactériocine par le chloroforme est une méthode qui, permet de concentrer la bactériocine à l'interface entre le chloroforme et la phase aqueuse. La purification par HPLC a montré l'existence de deux pics actifs F1 et F2 élués respectivement après 17 et 110 min (figure 11).

<b>Souches</b>	<b>Survie en présence 0.3% de sels biliaires (CFU)</b>
<i>Lactococcus lactis</i> S1	$1,5 \cdot 10^5$
<i>Lactococcus lactis</i> S2	$2,1 \cdot 10^5$
<i>Lactococcus lactis</i> S3	$1,1 \cdot 10^5$
<i>Lactococcus lactis</i> S4	$1,9 \cdot 10^2$
<i>Lactococcus lactis</i> S5	-
<i>Lactococcus Lactis</i> S6	-
<i>Lactococcus lactis</i> S7	-
<i>Lactococcus lactis</i> S8	
<i>Lactococcus lactis</i> S9	$1,7 \cdot 10^5$
<i>Lactococcus lactis</i> S10	$1,5 \cdot 10^2$
<i>Lactococcus lactis</i> S11	
<i>Lactococcus lactis</i> S12	-
<i>Lactococcus lactis</i> S13	-
<i>Streptococcus thermophilus</i> T1	$3,5 \cdot 10^7$
<i>Streptococcus thermophilus</i> T2	$4,5 \cdot 10^6$
<i>Streptococcus cremoris</i> R1	-
<i>Streptococcus cremoris</i> R2	-
<i>Lactococcus diacetylactis</i> D1	-
<i>Lactococcus diacetylactis</i> D2	-
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> B1	$3,0 \cdot 10^7$
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> B2	$1,1 \cdot 10^7$

- : pas de croissance.

Tableau 12: Résistance des bactéries lactiques en présence de 0.3% de sels biliaires

Tableau 13: Spectre d'action des souches actives

Souches	Espèces inhibées
<i>Lctococcus lactis</i> S1	<i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactococcus lactis</i> S2	<i>Listeria innocua</i>
<i>Lactococcus lactis</i> S7	<i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactococcus lactis</i> S9	<i>Listeria innocua</i> , <i>Bacillus cereus</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i> T2	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>epidermitidis</i> , <i>Staphylococcus epidermitidis</i>
<i>Streptococcus cremoris</i> R3	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactococcus diacetylactis</i> D1	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> B2	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>

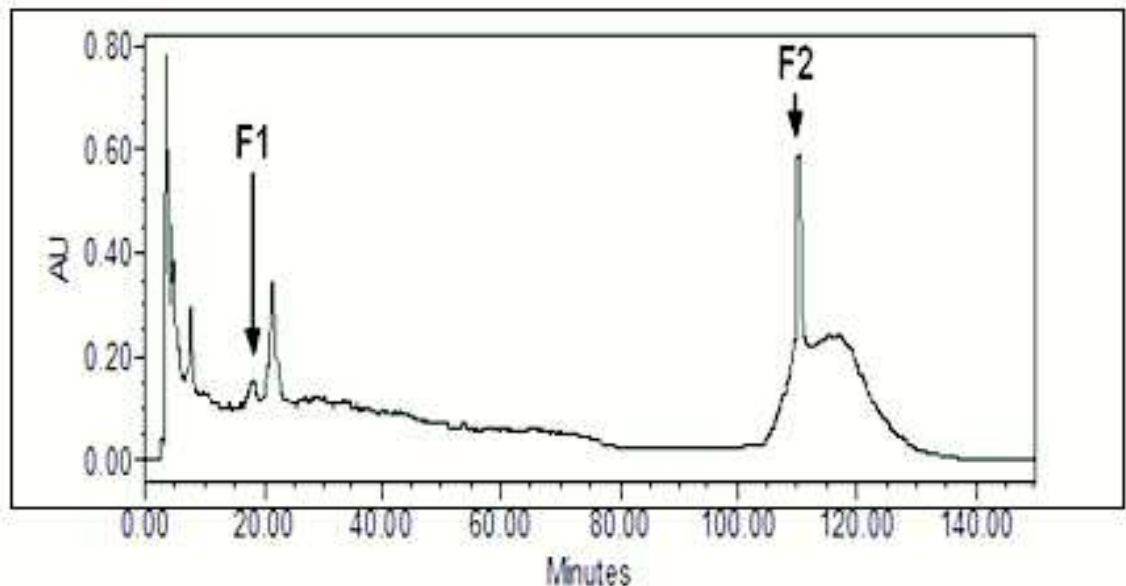


Figure 11 : Purification de la substance active par RPHPLC (reversed- phase high-performance liquid chromatography).

### 3.3/ Nature de la substance active

Les résultats que nous avons trouvés montrent que le surnageant reste actif, contre les bactéries cibles sensibles, à pH 7. Cependant, quand le surnageant ou l'extrait de chloroforme sont soumis à l'action des enzymes protéolytiques aucune activité inhibitrice n'a été observée contre *Listeria innocua*. Les résultats sont toujours comparés par rapport à un témoin celui-ci reste toujours actif sur les bactéries cibles. La sensibilité de l'agent actif à l'action des protéases suggère la nature biochimique peptidique de la molécule produite par le *Sc thermophilus* T2. De plus, l'activité antimicrobienne ne semble pas être affectée par la chaleur ce qui montre que ces molécules soient très thermo résistantes. L'activité inhibitrice de l'extrait de chloroforme était aperçue même après un traitement thermique de 30minutes à 90°C. Les résultats montrent que la substance inhibitrice reste active pour des valeurs de pH assez faible, au alentour de 4 (tableau 14).

Traitements	activité Relative
<b>Action des enzymes</b>	
Protéinase K	-
Pronase E	-
$\alpha$ -chymotrypsine	-
Trypsine	-
$\alpha$ -amylase	++
Catalase	++
Témoin	+++
<b>Action du pH</b>	
4	+++
5	+++
6	+++
7	+++
8	+++
Témoin	+++
<b>Traitements thermiques</b>	
60°C	+++
70°C	+++
80°C	++
90°C	++
95°C	+
témoin	+++

Tableau 14: Effet des différents traitements du surnageant de la culture *Sc. thermophilus* T2

L'activité relative a été mesurée par un test de diffusion agar contre *Listeria innocua*

(-): Aucune inhibition; (+): inhibition légère; (++) : inhibition modérée; (+++) : inhibition forte.

#### 4/ Cinétique de croissance et biosynthèse de bactériocines

La croissance et la production de bactériocine par *Sc. thermophilus* T2 ont été étudiées en utilisant le MRS comme milieu de croissance, la température choisie est 37°C, le pH est ajusté à 6,5. Dans ces conditions l'activité de la bactériocine n'apparaît qu' après 4 heures d'incubation, juste au début de la phase exponentielle, à une concentration cellulaire d'à peu près  $10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>, elle est d'environ (12 AU ml<sup>-1</sup>). Les résultats de la Figure 12 montrent que la production de bactériocine augmente parallèlement avec l'augmentation de

la concentration cellulaire, pour atteindre un maximum de  $90 \text{ AU ml}^{-1}$  avec une vitesse de production de bactériocine de  $9.3 (\text{AU ml}^{-1} \text{ h}^{-1})$ . Cette concentration maximale est atteinte au bout de 12 à 14 h d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ .

La concentration en bactériocine et la concentration cellulaire demeurent constantes pendant toute la phase stationnaire de croissance. L'activité antibactérienne s'affaiblit par la suite pour atteindre des valeurs faibles après 24 h d'incubation. A ce titre, les travaux de Barefoot et Klaenhamme (1984) révèlent que la sécrétion de bactériocines est fortement dépendante du pH initial et du milieu de production. Ceci suggère que le pH du milieu facilite à la fois la sécrétion et la solubilité de la bactériocine dans le milieu de production. L'étude entreprise par Yang et Ray] (1992) a montré que la production de bactériocine par les bactéries lactiques est fortement dépendante : des souches, de la composition du milieu de culture, du pH final du milieu, du temps d'incubation et de la température optimale de croissance.

## 5/ Survie des bactéries lactiques dans le tube digestif

L'étude de la survie des bactéries lactiques dans le tractus gastro-intestinal est importante pour une meilleure connaissance du devenir des bactéries lactiques ingérées avec l'aliment et une meilleure compréhension de l'action des probiotiques chez l'homme et l'animal. Il est probable que pour exercer un effet probiotique significatif, les bactéries doivent arriver vivantes et en nombre suffisant dans l'intestin. (Drouault et Corthier, 2000). Pour que la flore lactique puisse atteindre vivante le gros intestin, il lui faut franchir certaines barrières : acidité gastrique, enzymes digestives, pouvoir bactéricide des sels biliaires etc...

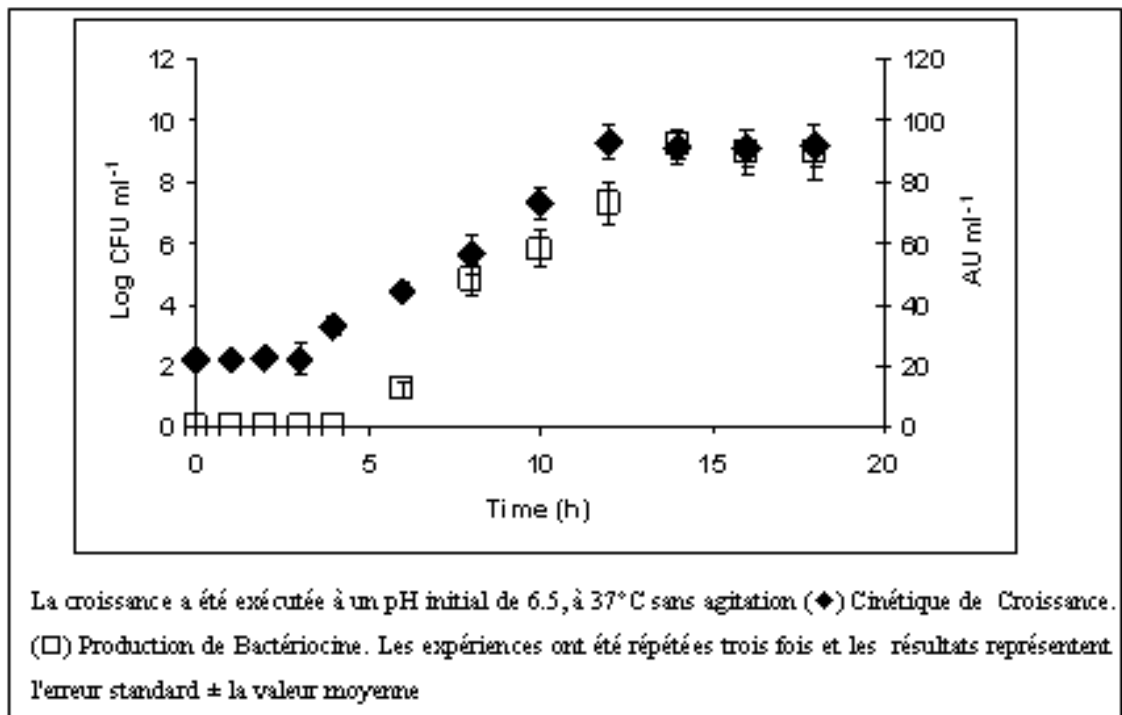


Figure 12: cinétique de Croissance et production de bactériocine par *Streptococcus thermophilus*



. Certains ferments lactiques sont connus pour leur capacité à franchir le tractus digestif avec un taux de survie intéressant. Les taux de survie sont cependant variables d'une souche à l'autre. Certaines espèces comme *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, ou encore *Bifidobacterium* résisteraient mieux que d'autres ( Marteauet *al.* 1992). Même si la totalité des bactéries ingérées est éliminée en quelques jours voire quelques heures, leur concentration dans les laits fermentés, et leur taux de survie dans le tube digestif sont cependant tout à fait compatibles avec une activité probiotique.

Dans cette étude seules les souches qui présentaient une activité antibactérienne suffisante et qui peuvent résister à l'action des sels biliaries en l'occurrence *Sc. thermophilus T1 et T2* *Lb. bulgaricus B2* et *L. diacetyllactis D2* ont été retenus pour les tests *in vivo*. Parmi les souches testées seule *Sc. thermophilus T2* a donné satisfaction. Les souches testées ont présenté des performances étonnantes du moment où celles-ci ont pu atteindre l'estomac à des taux appréciables durant toute la période de supplémentation.

Comme le montre la figure 13 , on peut dire que tant il y'a apport de bactéries lactiques avec les aliments leurs concentration se stabilise à des taux appréciables, en effet les deux souches testées *Sc. thermophilus T2* et *Lb. bulgaricus B2* malgré le stress gastrique continuent toujours à être décelé à des taux relativement élevés qui sont l'ordre de  $10^8$  cfu / ml. Ce résultat peut s'expliquer par l'effet tampon de l'aliment fermenté et qui servait de vecteur aux souches étudiées. Ces bactéries lactiques atteignent le duodénum à des taux qui ne dépassent pas  $10^5$  pour *Sc thhermophilus* et  $10^6$  pour *Lb. bulgaricus*, (figure14), cette concentration demeure relativement stable tant qu'il y'ai apport de ces deux souches avec l'alimentation. Néanmoins on constate une nette diminution de leur concentration une fois la supplémentation interrompue, vers le 7<sup>eme</sup> jour environ, cela dénote une sensibilité accrue de nos souches à l'action des sels biliaries.

La présence des souches de bactéries lactiques dans les selles (figure15) montre que les conditions drastiques du tube digestif n'empêchent pas la croissance des souches à des taux raisonnables, compatibles avec leurs rôles en tant que bactéries probiotiques. On note vers la fin que le nombre de bactéries commence à diminuer graduellement, après l'arrêt de supplémentation, pour disparaître complètement après une quinzaine de jours. Ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux de (Dilmi bouras et Sadoun, 2002a). Ces résultats sont d'un grand intérêt pour d'éventuelles utilisations de ces souches à des fins thérapeutiques ou métaboliques (réduction du cholestérol excessif dans le sang, hydrolyse du lactose, dans les infections intestinales... (Dilmi bouras et Sadoun, 2002b). D'autre part Le tractus digestif héberge des milliers d'espèces de bactéries différentes formant la flore intestinale (ou microbiote). Cette flore participe à la « bonne santé » de l'organisme (protection contre les pathogènes, développement et stimulation du système immunitaire, digestion...). Des perturbations ou des déséquilibres au niveau de la flore (dues par exemple à une prise d'antibiotiques) peuvent affecter cette bonne santé de l'organisme, la flore lactique peut ainsi jouer un rôle intéressant dans le renforcement des défenses naturelles de l'organisme .

Il faut noter vers la fin qu'il n'ya que peu de souches de bactéries lactiques peuvent supporter les conditions drastiques du tube digestif . Plusieurs hypothèses peuvent être faites pour expliquer ces différences. Certains auteurs incriminent des différences de résistance de la paroi cellulaire (Rallu, 1999). Certaines études ont montré que la résistance à l'acidité n'est pas acquise suite à une diminution soudaine de pH extérieur mais elle dépend de la

souche. (Hartke et al., 1995; Takahashi et al., 2004. Quoi Qu'il en soit il apparaît que le facteur souche joue un rôle très important dans l'adaptation au stress du tube digestif.

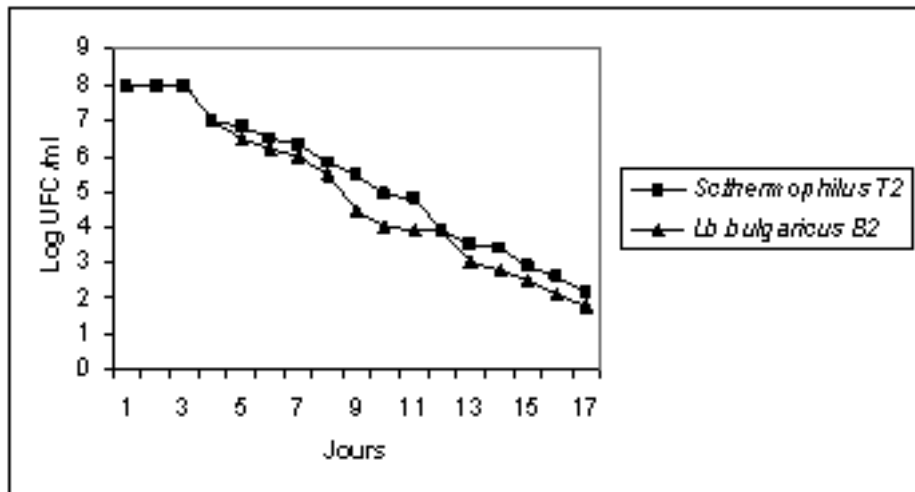


Figure 13: Courbe montrant l'évolution de la population lactiques au niveau de l'estomac du lapin.

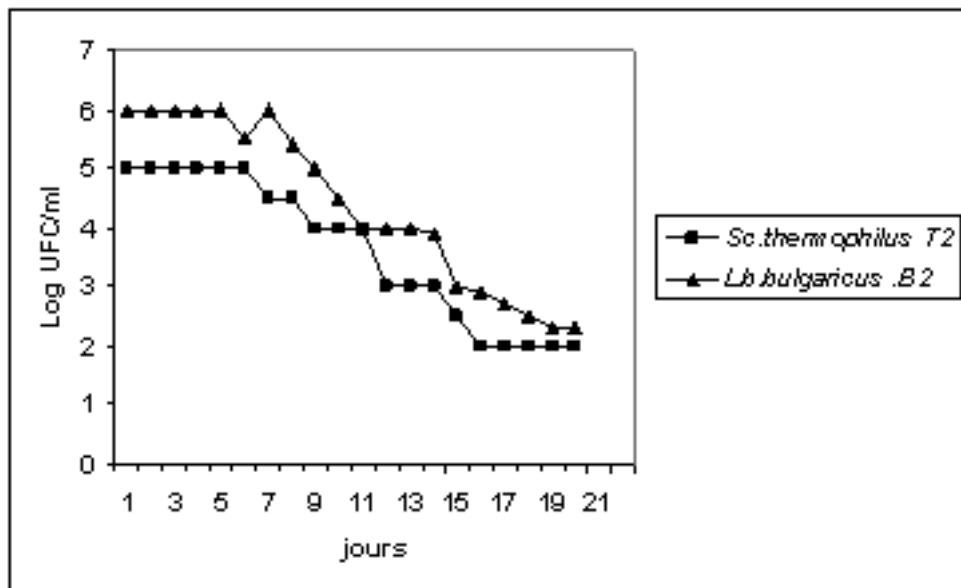


Figure 14 : Courbe montrant l'évolution de la population lactiques au niveau du duodénum du lapin

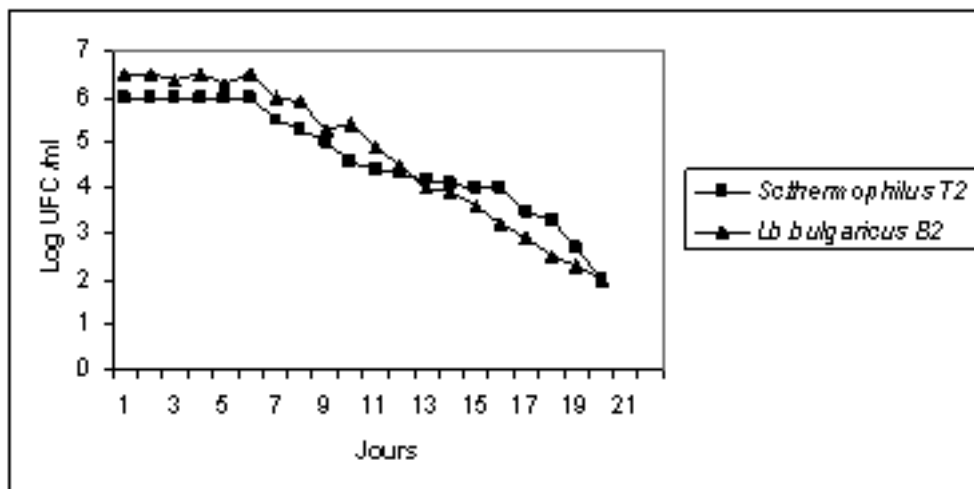


Figure 15 : Courbe montrant l'évolution de la population lactiques **Dans les selles**

## 6/ Mise en évidence du plasmide

L'ensemble des déterminants génétiques responsables de la production d'une bactériocine sont, en général, trouvés au voisinage les uns des autres groupés en une ou plusieurs unités transcriptionnelles. Elles sont portées par des éléments génétiques mobiles (transposons, plasmides) et exceptionnellement localisées sur le chromosome bactérien. Selon Joerger et Klaenhammer, (1986) la synthèse de bactériocines se retrouve souvent sur un plasmide. Il arrive rarement que ces gènes soient retrouvés sur le chromosome, comme pour l'helveticine. Il est possible que les gènes codant pour la production de la bactériocine retrouvés sur le chromosome aient été intégrés sur celui-ci à partir d'un plasmide par l'intermédiaire de transposons.

Le but de cette étude préliminaire est de vérifier la présence de plasmide chez certaines souches de bactéries lactiques, ainsi que leur éventuel rapport avec la production de bactériocine. L'analyse de l'extraction d'ADN plasmidique a montré que *Sc. thermophilus* T2 semble être doté d'un seul plasmide (simple) comme indiqué dans la Figure 16. Plusieurs études ont montré l'implication de l'ADN extra chromosomique dans l'expression des caractéristiques spécifiques des souches industrielles. Ainsi l'ADN plasmidique est connu pour déterminer les métabolismes des sucres, de l'azote, de la production des exopolysaccharides, des mécanismes de résistance aux phages et de la production des bactériocines. Certaines espèces de bactéries lactiques, à l'image des *Leuconostoc* contiennent un ou plusieurs plasmides de tailles différentes (Orberg et Sandine, 1984).

La digestion de ce plasmide unique par des enzymes de restriction découpe celui-ci en trois fragments distincts avec approximativement 2.2 Kb, 1.5 Kb et 0.5 Kb. Ainsi la taille du plasmide est estimée à au moins 4.2 Kb (Figure 17) Ce résultat préliminaire est important du moment où chez plusieurs bactéries lactiques les caractères tels que : la production de bactériocines, la fermentation des sucres, la production d'exopolysaccharides et les mécanismes antiphages sont portés par le même plasmide (Martinez et al., 1990 ; Turgeon et Moineau, 2001).

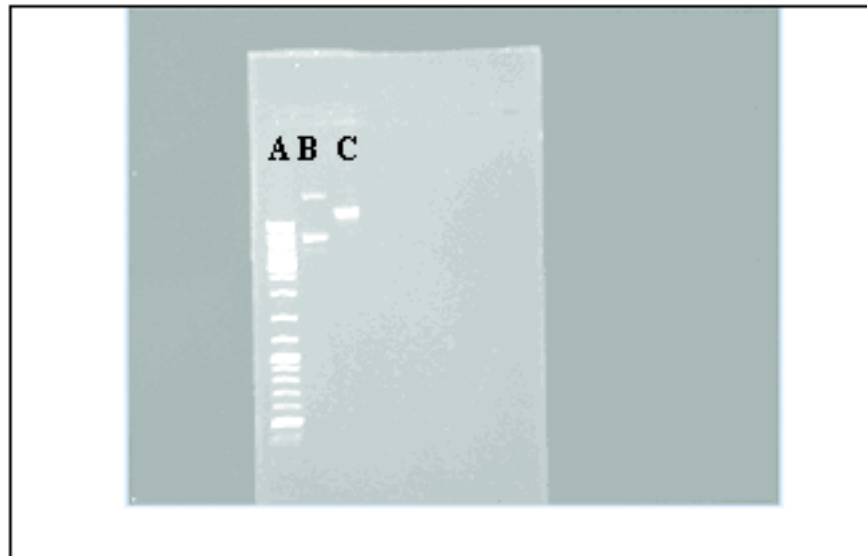


Figure16 : électrophorèse sur gel d'agarose du plasmide *Sc thermophilus* T2 en présence d'enzyme de restriction ( B ) et en absence d'enzyme de restriction( C),(A ) étant L'ADN témoin

## 7/ Essai de modélisation de la croissance de *Sc. thermophilus*

Pour optimiser les conditions de culture et la production de bactériocine on a été ramené à effectuer un plan d'expérience pour évaluer l'effet de 3 paramètres ( $T^\circ$ , sel et pH) L'effet du pH, de la température et du NaCl sur la croissance et le pouvoir acidifiant de *Sc. Thermophilus* a été étudié à trois niveaux différents : (5, 6 et 7) pour le facteur pH, (32, 37 et 42°C) pour le facteur température  $T^\circ$  et (0, 30 et 60 g/l) pour concentration en sel (figure 18) .

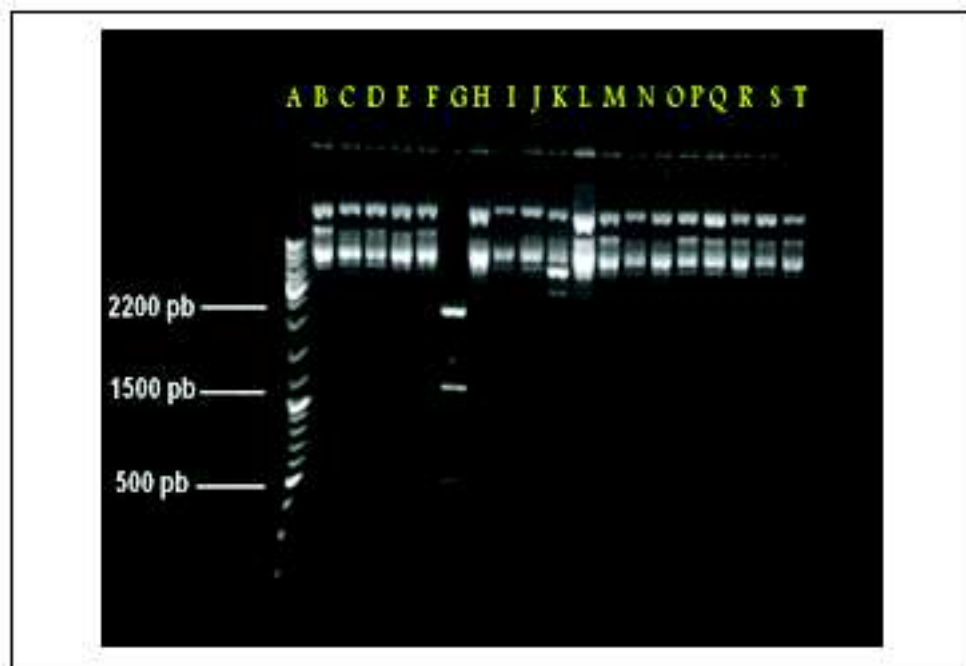


Figure 17: Electrophorèse sur gel D'agarose du plasmide *S. c. thermophilus* en présence d'enzymes de restriction (endonuclease)s: (A) O' Gene Ruler control (B) ; *AvallI* (C) ; *BamHI* ; (D) *BglII* ; (E) *BstEII* ; (F) *EcoRI* ; (G) *DraI* ; (H) *EcoRV* ; (I) *HindIII* ; (J) *NdeI* ; (K) *MfeI* ; (L) *PstI* ; (M) *PvuII* ; (N) *SacI* ; (O) *SalI* ; (P) *SphI* ; (Q) *XhoI* ; (R) *AatII* ; ( S) *AhaIII* ; (T) *NcoI*

L'utilisation d'un plan d'expérience nous est parue très importante pour l'étude de l'influence de certains paramètres technologiques principalement (pH ,T°, et salinité) ces paramètres seront pris indépendamment l'unde l'autre ou en association .Il s'agit d'une étude à plusieurs niveaux,ceci nous permet de caractériser l'effet isolé ou combiné des facteurs étudiés avec un nombre d'expériences limité.

30 manipulations étaient donc nécessaires pour accomplir ce plan d'expérience. La croissance de *Sc. thermophilus* T2 dans différents environnements a été choisi comme modèle. Cette étude consiste à mesurer respectivement la biomasse l le pouvoir acidifiant et la production de bactériocine dans des conditions de température de pH et de salinité préalablement fixées. (figure 16).

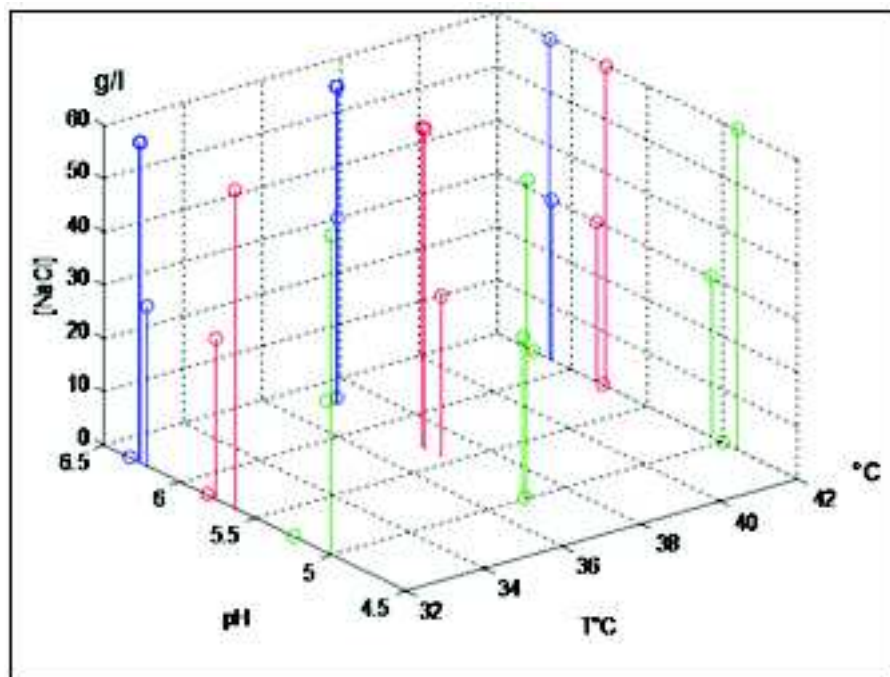


Figure 18: Représentation graphique des niveaux des facteurs étudiés dans le plan d'expérience

L'analyse des résultats nous a permis d'établir un modèle mathématique du type suivant :

$$Y = a F_1 + b F_2 + c F_3 + \dots + d$$

a, b, c, d représentent les coefficients obtenus par la fonction « droite de régression » appliquée à la matrice de résultats ,  $F_x$  représente dans

1 les différents facteurs étudiés. Dans cette étude le test de Student a été réalisé avec un risque de première espèce de 5% ( $\alpha=0,05$ ), et un le degré de liberté de 50 (N=50). Ceci donne une valeur théorique de T de 2,01.

constante	pH	T°C	NaCl	pH <sup>2</sup>	[NaCl] <sup>2</sup>	pH T°C	pH sel	
-7,4191	2,6518	-0,1070	0,0464	-0,2495	-0,0002	0,0247	-0,0069	Coefficient
4,3633	1,3574	0,0538	0,0091	0,1095	0,0000	0,0094	0,0015	Ecart type
1,7003	1,9536	1,9871	5,0832	2,2779	5,2847	2,6124	4,5417	T
#	5,6848	5,2883	0,0007	2,7424	0,0003	1,2104	0,004	0 (%)

Le tableau 15 montre que la concentration en Na Cl semble avoir un effet très important sur le taux de croissance de la bactérie (T= 5,08). De plus, les résultats montrent que le pH et le sel, semblent avoir un effet combiné sur le taux de croissance de *Sc. thermophilus T2*.

*Tableau 15 :Résultats du test de Student obtenus à partir des résultats expérimentaux du plan d'expérience.*

Il est important de noter que c T2. e modèle donne une valeur de T supérieure à la valeur théorique (2,01) pour tous les paramètres excepté la température et le pH, ceux ci ne devraient donc pas être théoriquement pris en compte. Ceci pourrait laisser penser que la température et le pH pris isolement n'ont pas d'effet sur le taux de croissance de *Sc.thermophilusT2*.

Cependant, lorsqu'on recherche le risque de première espèce nécessaire à l'acceptation de ces paramètres on trouve un risque  $\alpha$  de 5,7% pour le pH et 5,3% pour la température, étant donné que le risque sélectionné est de 5%, on considère que ces deux paramètres peuvent être tout de même intégrés au modèle utilisé.

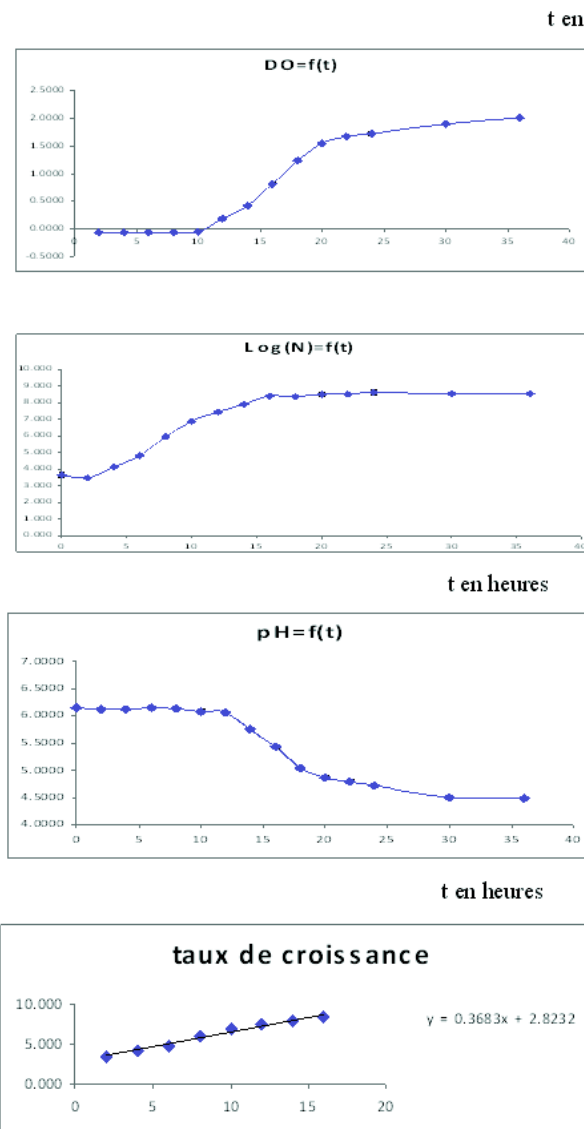


Figure 19: les résultats d'une; manipulation à pH 7, 42°C et à 6% de sel

L'équation du modèle théorique est la suivante :

$$Y = -0,0069(\text{pH} \cdot \text{Sel}) + 0,0247(\text{pH} \cdot T) - 0,0002([\text{NaCl}])^2 - 0,2495(\text{pH}^2) + 0,0464([\text{NaCl}]) - 0,1070(T) + 2,6518(\text{pH}) - 7,4191$$

Par ailleurs, le paramètre pH semble avoir un effet quadratique, par contre la température et le pH semblent être corrélés positivement avec la concentration en sel. La comparaison des taux de croissance expérimentaux et ceux calculés par le modèle (Figure 18) présente une très bonne concordance ( $R^2$ ).

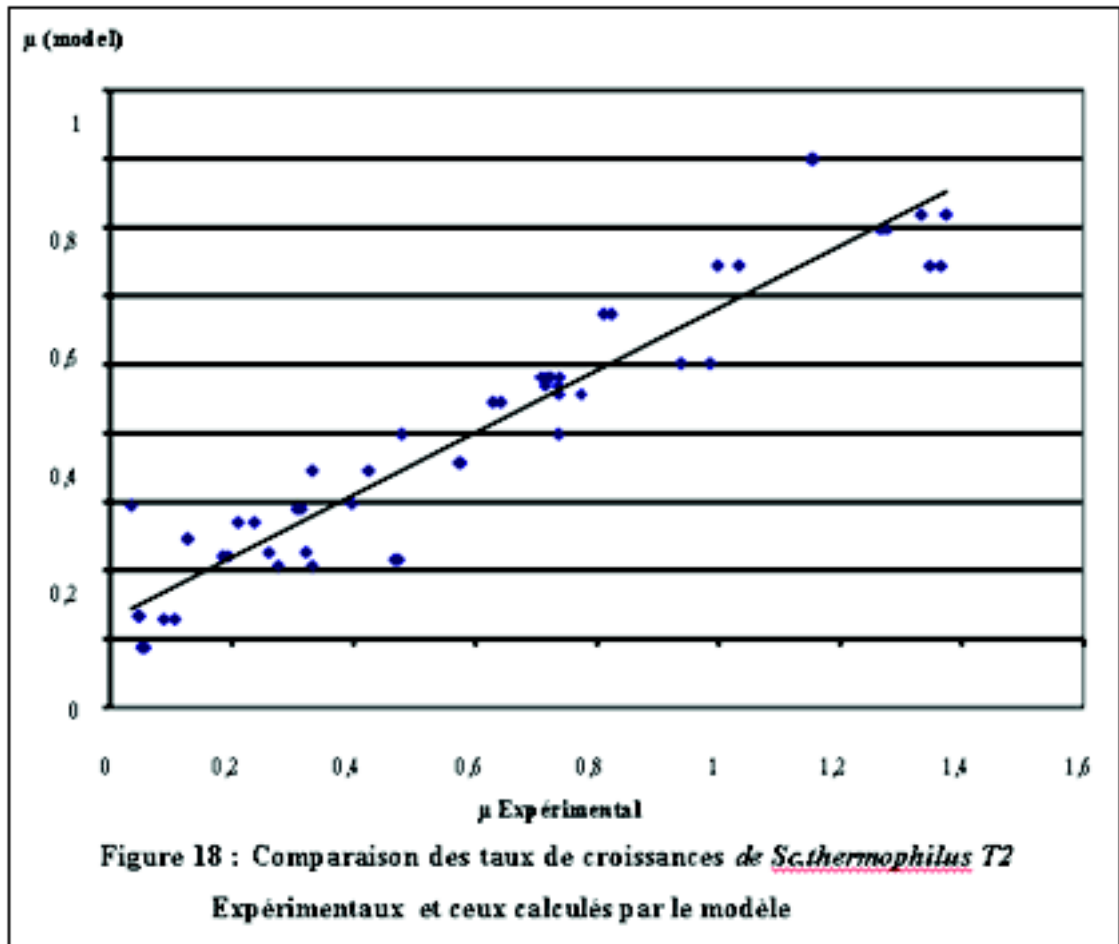


Figure 20: Comparaison des taux de croissances de *Sc.thermophilus T2* expérimentaux et ceux calculés par le modèle

### 7.1/ Cinétique de croissance de *Sc thermophilus T2* à 32°C

La figure 21 représente les variations du taux de croissance de *Sc.thermophilus T2* dans des conditions du pH et de salinité contrôlés et à une température de 32°C. Ce graphique représente donc une modélisation du comportement de la souche sous l'influence de deux paramètres variables, pH et salinité et à température constante. On constate que le taux de croissance diminue, avec l'abaissement du pH et l'augmentation de la concentration en sel. Le taux de croissance de la souche passe ainsi de  $1 \text{ h}^{-1}$  à pH 7 et en absence de NaCl à  $0,63 \text{ h}^{-1}$  à pH 6 et en présence de 30% de Na Cl.



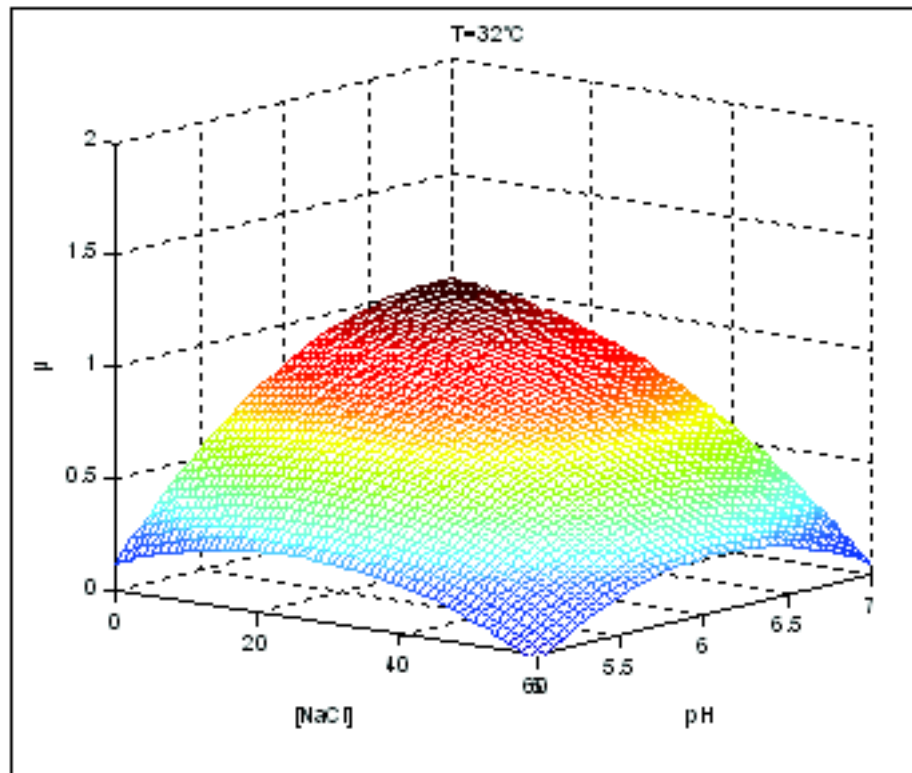


Figure 21 : Représentation graphique de l'évolution de taux de croissance *Sc. Thermophilus T2*. En fonction de la concentration en Na Cl et du pH à 32°C.  
**La croissance de la bactérie a été réalisée dans le milieu de culture MRS**

De plus, la croissance de la bactérie semble être plus affectée à pH 5 et en présence de 60% de Na Cl, sous ces conditions la phase exponentielle dure Plus de 66 h et la biomasse finale atteinte est de l'ordre de  $10^5$  CFU  $ml^{-1}$ . Les résultats (figure21) montrent aussi qu'à 32°C et à 60% de NaCl la bactérie présente le taux de croissance optimale lorsque la valeur du pH s'approche de 6 ( $0,4 h^{-1}$ ) alors qu'à pH 7 sous ces mêmes conditions le taux de croissance  $\mu$  n'est que de  $0,2 h^{-1}$ . A pH 7 et en absence de Na Cl *Sc thermophilus T2* présente le  $\mu$  le plus élevé ( $1,3 h^{-1}$ ). La phase exponentielle dure 16 h et la concentration cellulaire finale est de l'ordre de  $10^9$  CFU  $ml^{-1}$ . Ces résultats montrent donc que les conditions optimales de croissance de la souche *Streptococcus* . Semblent s'établir aux alentours d'un pH de 7 sans aucune addition de sel.

## 7.2/ Cinétique de croissance de *Sc thermophilus T2* à 37°C

La figure 22 représente l'évolution du taux de croissance de *Sc. thermophilus T2* fonction du pH et la concentration en sel à 37°C. Le graphe montre que le taux de croissance diminue toujours au fur avec l'abaissement du pH et l'augmentation de la concentration en sel. Le taux de croissance de *Sc thermophilus T2*. Passe ainsi de  $1,37 h^{-1}$  à pH7 et en absence de Na Cl à  $1,01 h^{-1}$  à pH 6 et en présence de 30% de Na Cl. La bactérie est également très affectée par les pH faibles et les fortes concentrations en sel, toutefois on remarque que la souche devient beaucoup plus tolérante à l'action du sel dans les fortes à 37 que pour 32°C.

De plus, la croissance de la bactérie semble être plus affectée au voisinage d'un pH de 5 et en présence de 60% de Na Cl, sous ces conditions la phase exponentielle dure plus de 60 h et la biomasse finale atteinte est de 6,6 Log CFU ml<sup>-1</sup>. Les résultats montrent aussi qu'à 37°C et à 60% de NaCl, la bactérie présente un taux de croissance optimale à pH 6,5 (0,63 h<sup>-1</sup>) alors qu'à pH 5 sous ces mêmes conditions, le taux de croissance  $\mu$  n'est que de 0,21 h<sup>-1</sup>.

Lorsque le pH est proche de la neutralité et sans addition de sel *Sc thermophilus* T2 présente le taux de croissance le plus élevé (1,36 h<sup>-1</sup>). La phase exponentielle dure 16 h et la biomasse finale atteinte est de 9,0 Log CFU ml<sup>-1</sup>. Ces résultats montrent donc, à nouveau, que les conditions optimales de croissance de la souche, semblent être un pH de 7 en absence de sel.

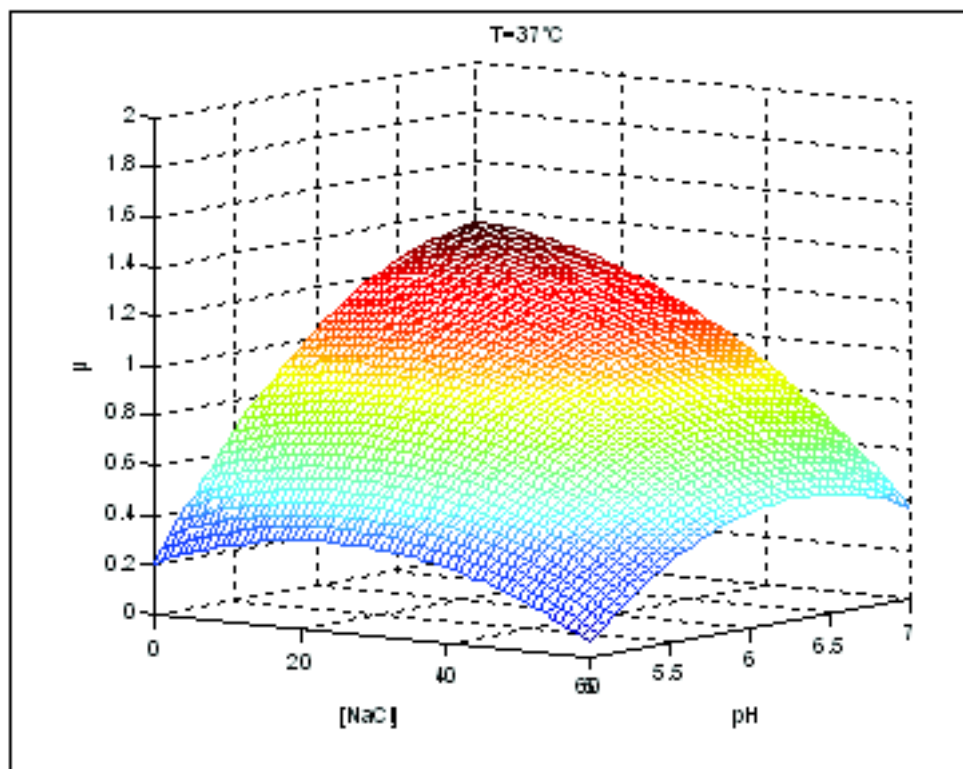


Figure 22 : Représentation graphique de l'évolution de taux de croissance *Sc. Thermophilus* T2. En fonction de la concentration en Na Cl et du pH à 37°C. La croissance de la bactérie a été réalisée dans le milieu de culture MRS.

### 7.3/ Cinétique de croissance de *Sc. thermophilus* T2 à 42°C

La figure 23 représente l'évolution du taux de croissance de *Streptococcus thermophilus* T2. en fonction du pH et la concentration en sel à 42°C. Le graphe montre que le taux de croissance diminue toujours au fur et à mesure de la diminution de pH et l'augmentation de la concentration en sel.

Le taux de croissance de la bactérie. Passe ainsi de 1,69 h<sup>-1</sup> à pH7 et en absence de Na Cl à 1,21 h<sup>-1</sup> à pH 6 et en présence de 30% de Na Cl. La bactérie est également très affectée par les pH faibles et les fortes concentrations en sel. La croissance maximale est obtenue avec pH de 7 et une concentration de Na Cl de 0 %, le taux de croissance dans

ce cas est de  $1,69 \text{ h}^{-1}$ , dans ces conditions, la phase exponentielle dure 10 h et la population atteint une concentration de  $9 \text{ Log CFU ml}^{-1}$ .

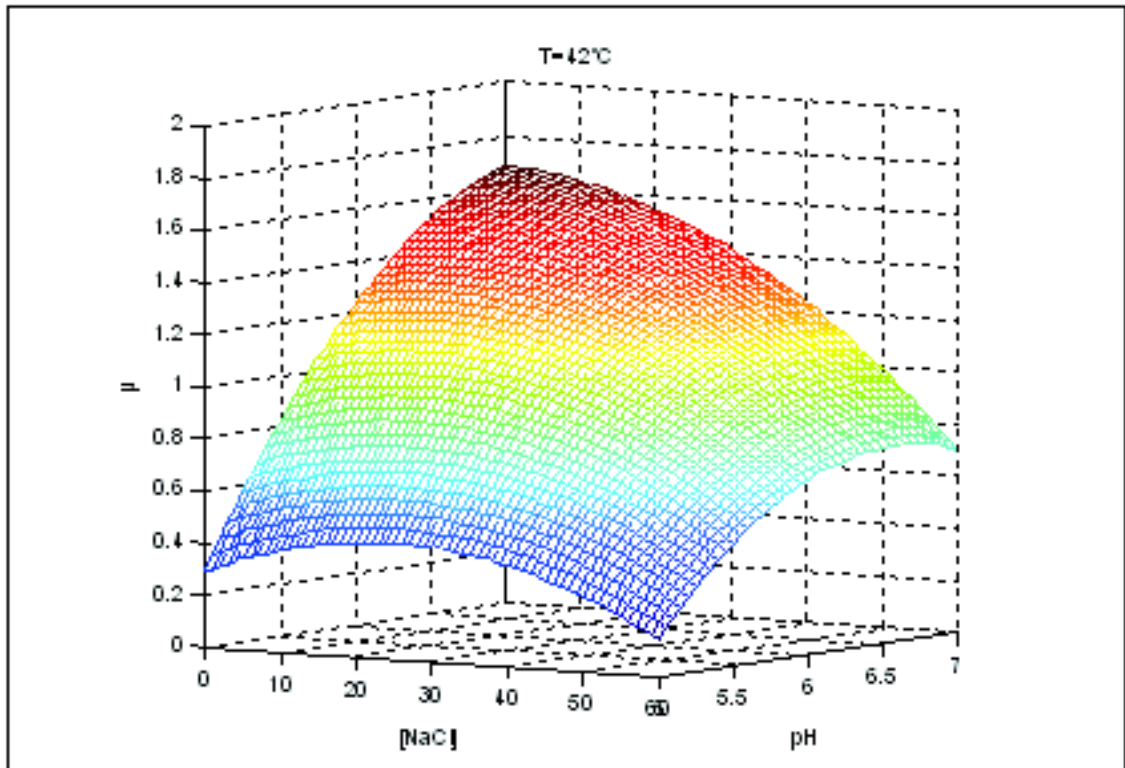


Figure 23: Représentation graphique de l'évolution de taux de croissance *Sc. Thermophilus T2*. En fonction de la concentration en NaCl et du pH à 42°C. La croissance de la bactérie a été réalisée dans le milieu de culture MRS.

Cette analyse prouve que la souche étudiée, en l'occurrence *Sc. thermophilus T2* malgré qu'elle soit affectée par les conditions défavorables de pH et de salinité elle continue tout de même à croître. Cette croissance est optimale lorsque la température est favorable c'est à dire, celle qui correspond à la température optimale de croissance qui avoisine dans ce cas, les 42°C, la souche étant de nature thermophile

## Conclusion

Les bactéries lactiques sont généralement sélectionnées pour leur propriété technologique: bonne croissance et participation au développement de flaveur au cours de la fermentation du lait ou encore résistance aux bactériophages. Mais depuis quelques années, avec le développement des connaissances relatives à l'effet bénéfique des bactéries lactiques sur la santé, d'autres propriétés sont prises en compte. Un déterminant essentiel dans la sélection d'un micro-organisme potentiel probiotique est sa capacité d'atteindre, de survivre voire de persister dans l'environnement dans lequel il doit agir. C'est pourquoi de nombreuses études visent à sélectionner des souches capables de tolérer l'acide gastrique et les sels biliaires, d'adhérer *in vitro* aux cellules épithéliales et de produire des substances antimicrobiennes. L'utilisation des bactéries lactiques dans la prévention de certaines maladies et le bien être des consommateurs semblent tenir une place de plus en plus importante tant au niveau économique que médicale.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence par des tests *in vivo* et *in vitro* les propriétés probiotiques des souches de bactéries lactiques locales. Ces souches notamment *Streptococcus thermophilus* T2, sont capables de produire des composés protéiques actifs contre certains germes pathogènes dont *Listeria monocytogenes*. L'activité anti-*Listeria* de cette souche probiotique est inhérente aux bactériocines dotées d'une forte activité inhibitrice vis à vis *L. monocytogenes* et d'autres bactéries pathogènes ou d'altération.

L'activité antibactérienne qui caractérise certaines souches de bactéries lactiques dites actives nous permet d'envisager leur utilisation dans la prévention des infections intestinales qui sont causées, généralement, par des germes pathogènes tel que par *L. monocytogenes* et autres champignons ou levures.

L'extraction des substances inhibitrices à l'aide de chloroforme a permis de purifier partiellement ces composés. à partir des surnageants de culture des souches étudiées. La nature polypeptidique de la substance active prouve que nos souches produisent des composés apparentés à des bactériocines active

s contre *L. monocytogenes*.

L'utilisation d'un plan d'expérience est un outil très important au cours de l'étude de l'influence d'un ou de plusieurs paramètres à plusieurs niveaux. Cela permet de réduire le nombre d'expériences et caractériser l'effet de paramètres isolés ou combinés. Dans ce contexte, les effets de la concentration en NaCl, du pH et de la température sur la cinétique de *Sc. thermophilus* T2 ont été étudiés. Les résultats de cette étude peuvent être pris en considération lors la fabrication de différents produits alimentaires. En effet, les conditions de formulations de produits alimentaires pourraient ne pas correspondre aux conditions idéales de développement de *Sc. tehrmophilus*. Ainsi pour améliorer la qualité d'un produit ou prolonger sa durée de vie le niveau des paramètres étudiés s'avère déterminant. Si on connaît par exemple le pH et la concentration en NaCl, les modèles obtenus détermineront la température de stockage appropriée exigée pour assurer une durée de vie microbiologique adéquate.

Afin d'analyser la capacité des souches productrices de bactériocines à combattre une infection causée par *L. monocytogenes*, des essais *in vitro* et *in vivo* ont été effectués, les résultats de ces tests ont montré que les souches étudiées présentent un taux de survie intéressant dans les conditions extrêmes du tube digestif. L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse démontre clairement l'activité anti *Listeria* des souches productrices de composés inhibiteurs.

Nous avons démontré que ces souches isolées à partir de lait de vache produisent une substance protéique apparentée à une bactériocine et que cette substance possède une activité comparable à celle de la nisine, une bactériocine utilisée par l'industrie alimentaire comme agent anti-microbien. En somme les capacités antimicrobiennes et spécialement anti *listeria* des souches actives les propulsent au rang de sérieux candidates pour une utilisation éventuelle en tant que probiotiques capable de protéger l'homme contre un certain nombre d'infections intestinales et par la même de renforcer les défenses de l'organisme .

Les substances antibactériennes découvertes chez ces souches présentent par ailleurs des propriétés intéressantes du point de vue technologique , En effet cette substance demeure active même à des températures qui dépassent de loin celle de la pasteurisation (traitement thermique largement utilisé pour les produits laitiers) , Ce qui permet son utilisation dans de larges gammes de produits alimentaires sans risques de dégradations par d'éventuels traitements thermiques au même titre que la nisine seule actuellement autorisée .

La purification complète reste cependant nécessaire pour l'exploitation de ces bactériocines comme agents de conservation dans les aliments, d'une part, il serait aussi intéressant de caractériser et de comprendre, au niveau cellulaire et moléculaire, les mécanismes par lesquels les souches de bactéries lactiques inhibent les autres bactéries. Questions auxquelles il faudra répondre avant de réellement considérer la commercialisation de ces souches. Cependant, il serait essentiel de purifier les composés antimicrobiens produits par ces bactéries. Les méthodes traditionnelles de purification des bactériocines se sont avérées inefficaces sur les composés produits par les souches locales c'est pourquoi une nouvelle stratégie de purification devrait être développée.

L'extraction de ces substances à l'aide de solvants a permis de mettre en évidence leur activité contre *Listeria*. Par contre, une purification complète de ces substances protéiques serait nécessaire afin de compléter la caractérisation de leur mode d'action et de déterminer leurs séquences en acides aminés. Avec une bactériocine purifiée, il serait aussi possible de développer des méthodes pour sa détection et ainsi vérifier si elle est produite dans les conditions retrouvées dans le tube digestif. Il serait aussi possible de déterminer son rôle probable dans l'inhibition de l'invasion des cellules intestinales. D'ailleurs, une technique efficace de purification pourrait éventuellement permettre l'exploitation de ces nouvelles bactériocines comme agents de conservation dans les aliments.

D'autre part, il serait aussi intéressant de caractériser et de comprendre, au niveau cellulaire et moléculaire, les mécanismes par lesquels les souches de bactéries lactiques bloquent l'invasion des cellules intestinales par *Listeria*. Pour cela, il faudrait mener des études sur les molécules impliquées dans l'adhésion des bactéries lactiques sur les cellules intestinales. Aussi, il faudrait vérifier si cette adhésion provoquerait des transformations physiologiques chez les entérocytes et constater l'impact que ces changements pourraient avoir sur le cycle d'infection de *Listeria*. Finalement, il serait important de confirmer la capacité de ces souches productrices à prévenir efficacement des infections chez l'homme. Pour ce faire, des études cliniques randomisées, à double insu, avec contrôle placebo devraient

être effectuées chez un nombre adéquat de sujets afin de mettre en évidence la propriété Protectrice de ces souches. Ces études permettraient d'appuyer toutes les études in vitro et in vivo chez les animaux afin d'identifier clairement la propriété anti-infectieuse de ces souches.

De nombreuses études expérimentales ont montré l'efficacité des bactéries lactiques dans la prévention et/ou le traitement des infections intestinales et la régulation du transit. Le choix et la sélection de souches probiotiques garantissant au consommateur des produits alliant « qualités nutritionnelles et bénéfices santé », « sécurité » et « goût » semblent aujourd'hui une aire de recherche majeure. De nombreuses questions posées du point de vue scientifique sur le problème des flores de remplacement n'ont pas encore reçu de réponse. Des progrès dans nos connaissances à ce sujet peuvent être attendus aussi bien pour l'étude des flores normales que pour les modalités d'administration.

Des méthodes beaucoup plus pointues sont donc indispensables pour apporter les précisions nécessaires sur le sort des micro-organismes absorbés. A l'heure actuelle, les résultats cliniques ont confirmé dans l'ensemble les hypothèses généralement admises sur l'implantation et l'efficacité de la flore lactique. Il est aussi nécessaire de faire des choix appropriés quant aux techniques mises en œuvre pour la conservation et le conditionnement de ces agents actifs.

Ces agents antimicrobiens peuvent être considérés comme un succédané des antibiotiques qui ont montrés à plus d'un titre leur limite L'étude des bactériocines dirigées contre des souches pathogènes et particulièrement contre *Listeria*, pourrait aboutir à leur utilisation comme agents naturels pour une meilleure conservation des produits alimentaires fermentés et dans la prévention, voire traitement de certaines maladies infectieuses ou auto immunes. Cette application, en cours avec la nisine, doit être développée par l'apport de nouvelles bactériocines. Une meilleure compréhension de leurs propriétés physiques et chimiques, de leur production et de leur mode d'action est nécessaire afin d'optimiser cette utilisation.

# Références bibliographiques

- Abee T, ( 1995 )** Pore-forming bacteriocins of gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms . *FEMS Microbiology Letters* . 129 : 1 - 10
- Adamowicz M., Kelley P.M et Nickerson K W (1991)** Detergent (sodium dodecyl sulfate) shock proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173: 229-233
- Barefoot S.F et Klaenhammer T.R. (1984).** Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 26: 328–334.
- Barefoot S.F et Klaenhammer T.R (1983):** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *L. acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1808-1815.
- Benech R.O., Kheard E.E., Laridi R., Lacroix C et Fliss I. (2002).** Inhibition of *Listeria innocua* in Cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by *in situ* production in mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology.* 68: 3683-3690.
- Berche, P. (1991).** Pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes* : stratégie de survie in vivo d'une bactérie à croissance intracellulaire. *Compte-rendus de la conférence internationale : Listeria et sécurité alimentaire*, Laval, France, 13-14 juin 1991, Asept Editeur, Laval, 77-81.
- Bourel GM., Henini S., Krantark., Oraby MC et Garmyn D. Garmyn .(2001"** Métabolisme sucre-citrate c). (2001), pp75-82. Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*" *Leuconostoc mesenteroides*". INRA EDP Sciences, INRA EDP Sciences pp75-82.
- [2]- de Roissard HB & Luquet FM " Bactéries lactiques , Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon, O, Malarme K., Weissenbach J, Ehrlich S.D et Sorokin A .(2001"** Métabolisme sucre-citrate c). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* IL1403. *Genome Res* 11: 731-753.
- Broadbent JR., Chou C., Gillies K and Kondo JK.(1989).** Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. *J. Dairy Sci.* 72: 3342–3345
- Burianek L.L et Yousef A.E. (2000).** "Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures." *Letters in Applied Microbiology.* 31: 193-197.
- Collins E.B et Aramaki K. (1980).** Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 63: 353-357.
- Cutter C.N., et Siragusa G.R. (1996).** Reduction of *Listeria innocua* *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* *Brochothrix thermosphacta* on beef following nisin spray treatments and vacuum packaging. *Food Microbiol.* 13: 23-33.
- Cleveland J., Montville T.J., Nésl.F., et Chikindas M.L.(2001).** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology.* 71: 1-20.

- Delves B,J (1990)** Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44:100-117.
- Daeschel M.A. (1989)**. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43: 64-167
- Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C et Ross P (2006)**. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* **16**: 1058-1071
- Desmazeaud M. (1996)**. Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine utilisation et innocuité Cahiers Agricultures. 5:331-334.
- De Smet C., Courtois S.J., Faraoni I., Lurquin C., Szikora J.P., De Backer O et Boon T. (1995)** *Immunogenetics* . **42** : 282–290.
- Dilmi bouras A et Sadoun D. (2002a)**. effet du yaourt à *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* sur le cholestérol sanguin chez le lapin. *Medecine et nutrition*, 38 (1): 34-24.
- Dilmi –bouras A et Sadoun D. (2002b)**. Survie des ferments du yaourt dans le tube digestif du lapin. *Le lait* (4): 1-8
- Elliker P.R, Anderson A.W et Hanneson G. (1956)** An agar medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *J. Dairy Sci.* 39:1611-1612.
- Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K et Ishizaki A . (2000)** Class IIA bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 85-106.
- Enright M.C. et Spratt, B.G. (1999)** Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* 7: 482-487.
- Fuller R. (1989)** Probiotics in man and animals *J. Appl. Bacteriol.* 66 365-378.
- alvez A., Abriouel H., Lopez R.L. et Ben Omar N. (2007)** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **120** (1-2): 51-70.
- Galvin M., Hill C et Ross R.P. (1999)** Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 355–358.
- Gandhi M. et Chikindas M.L. (2007)**. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology.* 113: 1-15.
- Gibson G. R. and Fuller R. (2000)** Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *Journal of Nutrition.* 3: 130-139.
- Gill H.S. (2003)**. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastro enterol* . 17:755-73.
- Gilliland S.E. (1990)** Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 87 175-188.
- Gilliland S.E., Stale, T.E et Bush L.J. (1984)**. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy. Sci.* 67: 30-45.
- uiraud J.P (1998)** Microbiologie alimentaire”. Technique et ingénierie, série Agro-alimentaire, Paris, pp 652.
- Hartke A., Bouche ., Gansel X., Boutibonne P et Auffray Y. (1994)**. UV-inducible proteins and UV-induced cross protection against acid, ethanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or heat treatments of *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*. *Arch Microbiol* . 163: 329-336.



- Hastings JW., Sailers M., Johnson K., Roy KL., Vederas JC et Sliles ME. (1991)** Characterization of leucocinA-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J Bacterio* .173: 7491-7500.
- Havenaar R, Ten Brink, B et Huis int' Veld. (1992)** . Sélection of strains for probiotic use. Page 209 in *Probiotics: The Scientific Basis*. R. Fuller, éd. Chapman et Hall,
- Hécharde Y, Dérijard B, Letellier F et Cenatiempo Y (1992)** . Characterization and purification of mesentericin Y105, an *anti-Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Gen Microbio/138*: 2725-2731
- Hughenoltz J et Kleerebezem M. (1999)**. Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol* . **10** (5): 492-497
- Jensen PR et Hammer K. (1993)** Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus tectis*. *Appl Environ Microbio/*. 59: 4363-4366
- Jiang J.B Jorckelm, Fonon R et Emanuel S. (1996)** Occurrence of conjugated dietary regimen, *J dairy sci*. 79: 438-445
- Joeger MC, K laenhammer TR (1986)** Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481 . *J Bacteriol*. 167: 439-446
- Juffs H.S et Babel F.J. (1975)**. Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactic cultures in milk stored at low temperature. *Dairy Sci.*, 58: 1612-1619.
- Klaenhammer T.R., Barrangou R., Buck B.L., Azcarate-Peril M.A et Altermann E. (2005)**. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev* 29: 393–409.[
- Klaenhammer, T. R. (1988)** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70:337-349.
- Konings WN (1994)**. The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J Biol Chem* 269:11391-11399.
- Lebas F., Couderty Rechmbeau H., Thebault R.G. (1996)**. *Le Lapin, Élevage et Pathologie* (nouvelle édition révisée). FAO éditeur, Rome, 227 p.
- Lievin V., Peiffer I., Hudault S., Rochat F., Brassart D et Neeser JR (2000)**. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exerts antimicrobial activity. *Gut*. 47: 646-52.
- Lin H.C., Su B. H., Chen A.C., Lin T.W., Tsai C.H., Yeh T.F et Oh W. (2005)**. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics*. 115: 1-4.
- Luchansky J.B et Call J.E. (2004)** Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *L. monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. *J. Food Prot* . **67** : 1017-1021.
- Man de J.C., Rogosa M et Sharpe M.E. (1960)**. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol*. 23: 130-138.
- Marelli G, Papaleo E et Ferrari A. (2004)**. Lactobacilli for prevention of urogenital infections: a review. *European Review of Medicine and Pharmacology Sciences*, 8: 87-95.

- Marshall V.M et Law B.A. (1984).** Physiology and growth of dairy lactic bacteria in advances and the microbiology and the bioindustry of cheese and fermented milk ,*EDFL*: 67-98.
- Marteau P., Pochart P., Bouhnik Y., Zidi S., Goderel I et Rambaud JC .(1992).** Survie, dans l'intestin grêle, de *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium* sp, ingérés dans un lait fermenté. *Gastroenterol. Clin. Biol* . 16: 25-28.
- Marteau P., Pochart P., Bouhnik Y., Rambaud J.C.,** The fate and effects of transiting, nonpathogenic microorganisms in the human intestine. *World Rev. Nutr. Diet.* 74 (1993): 1-2.
- Marteau PR, De Vrese M, Cellier CJ et Schrezenmeir J. (2001)** Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 : 4305-4365
- Marteau P et Rambaud J.C.(1998)** Probiotiques en gastroentérologie:bases rationnelles, effets démontrés et perspectives.*Hepato-Gastroenterology* 4: 267-273.
- Martínez-Bueno, M, Galvez, A, Valdivia E et Maqueda M.(1990)** A transferable plasmid associated with AS-48 production in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 172: 2817–2818.
- . Mattila-Sandholm T, Matto,J et Saarela M. (1999)** Lactic acid bacteria with health claimsinteraction and interférence with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, 9: 25-35.
- McAuliffe O.R.P, Ross C et Hill (2001).** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode ofaction. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 285-308.
- Mercenier A, Pavan,S et Pot B. (2002)** "Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects" *Curr. Pharmaceut. Design* 8: 99-110.
- Ming X., Weber G.H, Ayres J. W et andine,W.E. (1997).** "Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats." *Journal of FoodScience*, 62(2): 413-415.
- Moll G.N, Konings W.N et Driessen A.J.M, (1999).** Bacteriocins:mechanism of membrane insertion andpore formation, *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 185-198.
- Morishita T, Fukada T, Shirota M et Yura T. (1974).** Geneticbasis of nutritional requirements in *Lactobacilluscasei*. *J Bacteriol.*120: 1078-1084.
- Morishita T, Degushi Y, Yajima M,Sakurai T et Yura T. (1981).** Multiple nutritional requirementsof *Lactobaeilli*:Genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *J Bacteriol.* 14: 64-71.
- Mayr-Hartinag, Hedjeza J et Berkeley R.C.W (1972).** Methods for studying bacteriocins. *Methods in Microbiology.* 7A: 315-422.
- Naidu AS, Bildlack WR, Clemens RA (1999).** Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical rev. in food Sci. nutr.* 39 (1): 1–26.
- Orberg P.K. et Sandine W (1984)** Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* spp., *Appl. Environ. Microbio.*48:1129–1133.
- Orrhage K., Brismar B et Nord C.E. (1994).**Effects of supplements of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on intestinalmicrobiota during administration of clindamycin. *Microb Ecol HealthDis.* 7:17–25.

- Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et l'Organisation Mondiale de la Santé, (2002)** Guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada.
- Parker R B. (1974).** Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*. 29: 4-8.
- Penauds S. (2000)** Analyse de la séquence génomique étude de l'adaptation à l'acidité de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC11842 Thèse de doctorat
- Price R.J et Lee J.S. (1970)** Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing Lactobacilli. *J. Milk and Food Technol.* 33: 13-18.
- Plummer S., Weaver M. A., Harris J. C., Dee P. et Hunter J. (2004)** Clostridium difficile pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of C. difficile diarrhoea. *Int Microbiol* .7: 59–62.
- Russell J., BO'Connor J.D., Fox D. G., Van Soest P. J, et Sniffen C. J. (1992)** A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: Ruminant fermentation. *J. Anim. Sci.* 70:3551.
- Ralul F . (1999)** Travaux Universitaires - Thèse nouveau doctorat [Note(s) : [162 p.]] (bibl.: 197 ref.) (Année de soutenance : N<sup>O</sup> : 99 PA06 6628
- Ryan MP., Rea MC., Hill C et Ross R.P. (1996)** An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lactacin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 612–619
- Ryan, M.P., W.J. Meaney, R.P. Ross, C. Hill. (1998)** Evaluation of lactacin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2287-2290.
- Yang R., Johnson MC., et RAY B (1992)** Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 3355–3359.
- Salminen S., Ouwehand A., Benno Y et Lee Y.K. (1999)** Probiotics: How should they be defined? *Trends in Food Science and Technology*. 10: 107-110.
- Salminen S., Isolauri E et Onnela T.(1995)** Gut flora in normal and disordered states. *Chemother.* 41(1): 5-15.
- Scannel A.G., Hill C., Ross R.P., Marx S., Hartmayer M.E., et Arend K.T.(2000)** Development of bioactive food packaging material using immobilized bacteriocin lactacin 3147 and nisaplin. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 241-249.
- Stiles M.E et Holzapfel W. (1997)** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36 (1): 1-29.
- Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak G., Kilpper-Balz R., Collin M. D et Fischer W. (1985)** Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus*: a review. *Syst. Appl. Microbiol.* 10: 1-19.
- Sreekumar O et Hosono A. (1998)** The antimutagenic properties of a polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* and its cultured milk against some heterocyclic amines. *Canadian Journal of Microbiolog.* 44: 1029-1036.
- Silva AM, Bambirra EA, Oliveira AL, Souza PP, Gomes DA et Vieira EC (1999)** Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with Salmonella

- enteritidis subsp. typhimurium in conventional and gnotobiotic mice. *J Appl Microbiol* . 86:331-6.
- Siragusa G.R. Cutter., C. N, et Will et J. L. (1999)** Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiol.* 16 :229-235.
- Surawicz C.M., Elmer G.W., Speelman P., McFarland L.V., Chinn J et van Belle G. (1989)** Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology.* 96:981-8.
- Tahiri I., Desbiens M., Benech R., Keadr., Lacroix C., Thibault S.,OuelliD et Fliss I.(2005).** "Purification and characterization of divergicin M35 : a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35." *Intern. J. Food Microbiol* . 66: 414-21.
- Taylor J.I, Hirsch A. et Mattick A.T.R.(1949)** The treatment of bovine streptococcal and staphylococcal mastitis with nisin. *Veterinary Record.* 61: 197-198.
- Takahashi K et Kitajima N. (2004)** Abe and S. Mishiro, Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer, *Virology* . **330** : **501–505**.
- Turchet P., Laurenzano M., Auboiron S et Antoine, J. M. ( 2003 )** Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on infections in free-living elderly subjects: A randomised, controlled pilot study. *Journal of Nutrition, Health and Aging* . 7: 75–77.
- Turgeon et Moineau S. (2001)** Isolation and characterization of a *Streptococcus thermophilus* plasmid closely related to the pMV158 family, *Plasmid.* **45** : 171–183
- Tursi A., Brandimarte G., Giorgetti GM., Forti G., Modeo ME et Gigliobianco A. (2004)** Low-dose balsalazide plus a high potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Medical Science Monitor.* 10: I126–I131.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K et Swings J. (1996)** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol.Rev.* 60: 407-438.
- Varcoe J. J., Krejcarek G., Busta F et Brady L. (2003).** Prophylactic feeding of *Lactobacillus acidophilus* NCFM to mice attenuates overt colonic hyperplasia. *Journal of Food Protection.* 66: 457-465.
- Vaughan EE., de Vries M.C ., E.G. Zoetendal E.G., K. Ben-Amor K, A.D. Akkermans A.D et W.M. de Vos W.M, (2002).** The intestinal LABs. *Antonie. Van. Leeuwenhoek.* 82:341-352.
- Wang Y., Leung P.C., Qian P et Gu J.D. (2004).** Effects of UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Fe<sup>3+</sup> on the growth of four environmental isolates of *Aeromonas* and *Vibrio* species from a mangrove environment. *Microbes and Environments.* 19:163-171.
- Woese, C.R. et Fox, G.E. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic kingdom: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 74: 5088-5090

**Yildirim Z, et Johnson M.G. (1998)** Characterization and antimicrobial spectrum of Bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Food Protection*. 61: 47-51.

## Annexes

Planning des suivis de fermentation

Fermentation n°	pH	Température en °C	[NaCl] en g.l <sup>-1</sup>
1	5/6/7	32	0
2	5/6/7	37	30
3	5/6/7	42	60
4	5/6/7	32	0
5	5/6/7	37	30
6	5/6/7	42	60
7	5/6/7	32	0
8	5/6/7	37	30
9	5/6/7	42	60

Matrice des résultats des différentes fermentations

pH	T°	[NaCl]	μ mesuré	pH	T°	[NaCl]	μ mesuré
5,02	37	0	0,474	...	...	...	...
6,33	37	0	1,272	5	42	0	0,127
6,33	37	0	1,265	5,8	42	0	1,365
5,24	32	0	0,237	6,26	42	0	1,152
5,82	32	0	0,713	5,08	42	30	0,576
6,34	32	0	0,824	5,84	42	30	1,033
5	42	0	0,127	6,14	42	30	1,333
5,8	42	0	1,347	5,57	37	30	0,738
6,26	42	0	1,156	5,57	37	30	0,723
5,08	42	30	0,573	5,03	37	30	0,307
5,84	42	30	0,998	5,76	32	30	0,629
6,14	42	30	1,374	6,22	32	30	0,938
5,57	37	30	0,706	4,96	32	30	0,194
5,57	37	30	0,716	5,78	42	60	0,737
5,03	37	30	0,314	6,15	42	60	0,777
5,76	32	30	0,642	4,91	42	60	0,046
6,22	32	30	0,986	5,63	32	60	0,332
4,96	32	30	0,185	5,63	32	60	0,276
5,78	42	60	0,479	6,26	32	60	0,322
6,15	42	60	0,737	6,27	32	60	0,261
4,91	42	60	0,048	5	32	60	0,052
5,02	37	0	0,468	5	32	60	0,057
6,33	37	0	1,28	5,68	37	60	0,0348
6,33	37	0	1,264	5,7	37	60	0,397
5,24	32	0	0,21	6,26	37	60	0,425
5,82	32	0	0,736	6,27	37	60	0,332
6,34	32	0	0,811	5	37	60	0,088
...	...	...	...	5	37	60	0,106



Figure 1 an: Recherche de gène NRPS par PCR

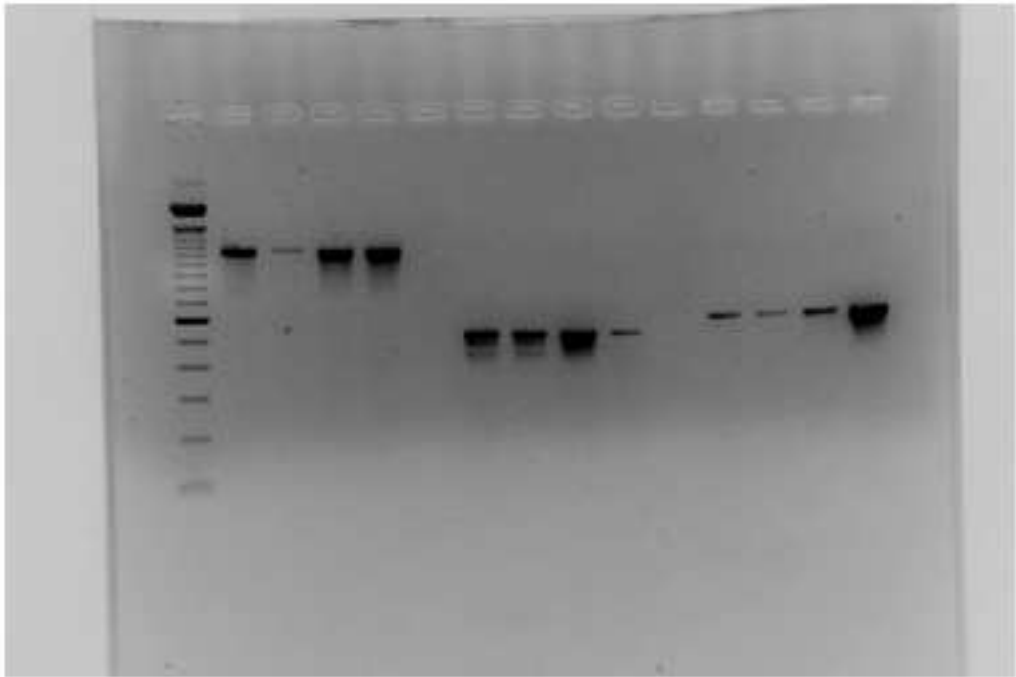
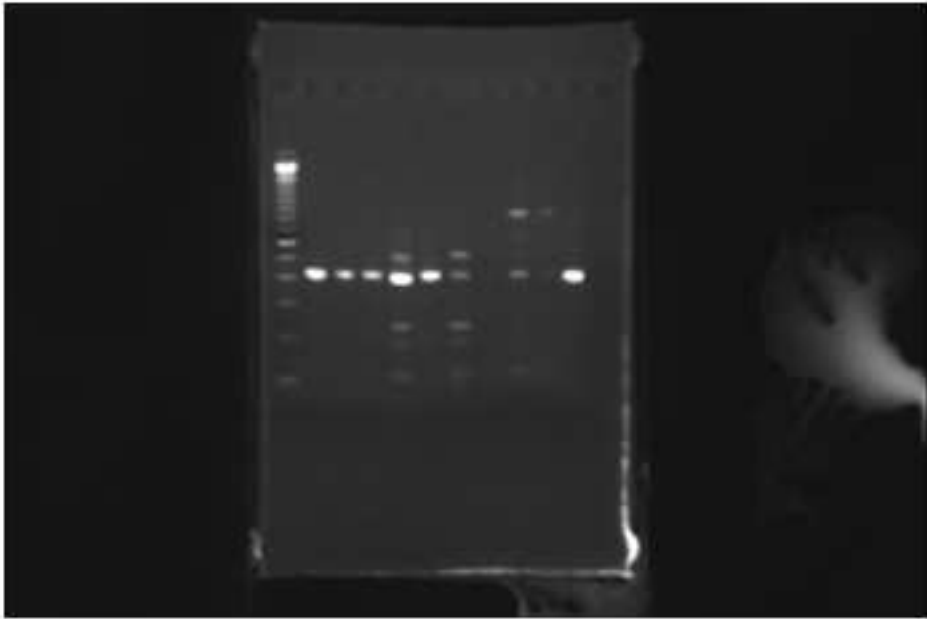


Figure 2 an : Extraction de l'ADN de quelques souches de bactéries étudiées.