

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Laboratoire des Sciences et Techniques de la Production Animale

THÈSE

présentée par

Mr. BENREGUIEG Mokhtar

Pour l'Obtention du Diplôme de Doctorat en **Biologie**

Option: **Microbiologie**

**Propriétés Antibactériennes et Probiotiques de Bactéries
Lactiques Isolées à Partir du Lait de Vache, de Chèvre et de
Brebis dans la région de l'Ouest Algérien**

Soutenue publiquement le 26/02/2015 devant le jury composé de :

Pr. LOTHMANI Ibrahim	Université Mostaganem	Président
Dr. DALACHE Fatiha	Université Mostaganem	Directrice de thèse
Pr. KARAM Noureddine	Université d'Oran	Examineur
Pr. BELAHCEN Miloud	C.U. Ain Témouchent	Examineur
Dr. ROUDJ Salima	Université d'Oran	Examinatrice
Dr. CHIBANI Abdelwaheb	Université Mostaganem	Examineur

Année universitaire 2014/2015

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier «Allah» qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

*Cette thèse de Doctorat m'a permis de relever un défi de taille qui était la découverte des microorganismes bénéfiques pour l'organisme. Cet objectif n'aurait été atteint sans l'aide, au combien appréciée, du Docteur **Fatima DALACHE**. Je profite alors de l'occasion pour la remercier chaleureusement pour son encadrement, sa disponibilité, sa gentillesse, ses encouragements et sa confiance.*

*Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur **Ibrahim LOTHMANI**, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ce travail et auquel d'ailleurs j'exprime ma profonde reconnaissance.*

*Mes remerciements s'adressent également à Monsieur le Professeur **Noureddine KARAM**, à Monsieur le professeur **Miloud BELAHCEN**, à Madame Professeur **Salima ROUDJ** et à Monsieur Docteur **Abdelwaheb CHIBANI** qui m'ont fait l'honneur de juger ce modeste travail.*

*Je remercie très chaleureusement Monsieur **Abdelkader Homrani**, Directeur du laboratoire des sciences et techniques de la production animale pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire, pour son soutien et ses orientations constructives.*

Je remercie également l'ensemble du personnel du laboratoire (étudiants, enseignants, chercheurs, techniciens, secrétaires) que j'ai pu côtoyer durant ces années passées pour leur bonne humeur et leurs compétences.

*Je souhaite remercier **ma famille**, tout particulièrement **ma mère, ma femme, ma petite fille Maroua** et le petit prince mon fils **Islam** pour leur bonne humeur, leur soutien et leur patience.*

*Enfin, je souhaite dédier le fruit de ce travail et de tout ce qui est bon dans ma vie à **l'esprit de mon père** qui m'a donné les clés des portes de la réussite, que la Miséricorde de DIEU l'accueille dans son vaste paradis.*

الملخص

يمكن للقدرات التثبيطية الطبيعية للبكتيريا اللبنية أن تستغل في مجالات عدة أهمها الحفظ الطبيعي أو البيولوجي للأغذية, الحد من عدد الميكروبات الملوثة وكذلك الاسهام في تحسين الحالة الصحية للمستهلك. من هذا المنطلق فان الهدف الرئيسي لهذه الدراسة هو عزل سلالات لبنية من أنواع مختلفة من الحليب (بقر, ماعز, غنم) منتج من طرف مربين تقليديين في مناطق معزولة من الغرب الجزائري ثم السعي للتعرف علي السلالات ذات النشاط التثبيطي منها المرفوق بالخصائص الصحية المعروفة باسم 'بروبيوتيك'

تم عزل 233 سلالة ذات تفاعل ايجابي مع صبغة غرام, غير مالكة لأنزيم الكتالاز ولا للقدرة علي التبرعم من خلال عينة تمثل مستثمرة فلاحية. قمنا بعد ذلك بتجريب قدرتها التثبيطية مع أنواع بكتيرية معرفة جينيا وهي

Salmonella Typhimurium ATCC 13311, Staphylococcus aureus ATCC 25923, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, E. coli ATCC 25921, Bacillus subtilis ATCC 21332, Enterococcus faecalis ATCC 51299

السلالات التي أظهرت قدرة علي التثبيط تعرضت الي دراسة مجموعة من الخصائص الكيميائية بغرض التعرف عليها وذلك باستعمال الطواقم التفاعلية. بعد ذلك قمنا بدراسة بعض الخصائص المتعلقة بالعامل المثبط المنتج وذلك من أجل الاحتفاظ بالسلالات المفرزة للعامل البروتيني المعروف باسم بكتيريوسين. السلالات المحققة لكل هذه الشروط تم بعد ذلك متابعة قدرتها علي التعامل مخبريا مع شروط العيش في الوسط المعدي المعوي.

مجموع 68 سلالة أظهرت قدرة علي تثبيط واحدة علي الأقل من البكتيريات المرجعية المستعملة في هذه الدراسة. بعد ازالة التثبيط الراجع للحامض, للماء المؤكسج و للفيروس المصيب للبكتيريا, 23 سلالة فقط احتفظت بقدرتها علي التثبيط. الدراسة البيوكيميائية خلصت بنا الي التعرف علي سلالاتنا الـ 23 علي أنها:

Lactococcus lactis subsp lactis (4 سلالات), *Lactococcus lactis subsp.Lactis.biovar.diacétylactis* (4 سلالات), *Lactococcus lactis subsp.Cremoris* (3 سلالات), *Streptococcus thermophilus* (3 سلالات), *Lactobacillus casei* (2 سلالات), *Lactobacillus plantarium* (2 سلالات), *Leuconostoc lactis* (2 سلالات), *Leuconostoc mesenteroides* (2 سلالات), *Lactobacillus rhamnosus* (سلالة واحدة)

التقنية الجزيئية المسماة (Rep-PCR) أدت بنا الي اثبات انتماء سلالاتنا الي مجموعات متباينة من البكتيريا اللبنية.

العامل البروتيني المثبط من نوع بكتيريوسين أظهر قدرته علي تحمل درجة الحرارة المقدره ب 80 و 100 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة الا أنه لم يستطع ولا عامل الصمود أمام 120 درجة مئوية. أدي تتبع المسار الانتاجي للعامل المثبط الي معرفة وقت بداية الانتاج والذي كان خلال مرحلة التضاعف الأسي للخلايا (8 الي 10 سا) مع أعلى معدل للانتاج بعد مرور 14 الي 16 ساعة من النمو.

السلالات الـ 23 تعتبر في هذه الدراسة لقدرتها علي انتاج عامل مثبط من نوع بكتيريوسين أبدت كلها, ما عدا *Leuconostoc*, قدرة علي تحمل الوسط الحامضي و كذلك الأملاح الصفراوية مع تعايش جيد لدي *Lactobacillus*. قدرة هائلة علي الالتصاق عوينت 19 سلالة فيما كانت بمستوي أقل عند الأربع سلالات المتبقية و المنتمية الي *Lactobacillus*. سجلنا كذلك عدم حساسية السلالات لمعظم المضادات الحيوية المجربة مع البقاء علي الحياة *Leuconostoc* صنف في وسط لا هوائي بكم معتبر.

السلالات المنتمية لفرع اللكتوباسيليس و السترابتوكوكيس أظهرت قدرة عالية علي الالتصاق بالنسيج المغطي للجدار المعوي.

أبدت كل من السلالات () والتي هي لكتوباسيليس أحسن تحمل لمختلف الشروط مما يرشحها لدور البروبيوتيك

V17, B69, C117, C177

المادة المثبطة للنمو من نوع بكتيريوسين المنتجة من قبل كل من () أبقت علي فاعليتها بعد تعرضها لحرارة مائة وعشرين درجة مئوية لمدة عشرين دقيقة مما يؤهلها لكي تكون مواد *Probiotic*.

الكلمات المفتاحية: لبن, بكتيريا لبنية, تثبيط, بكتيريوسين, بروبيوتيك.

Résumé

Les potentialités inhibitrices naturelles des bactéries lactiques peuvent être exploitées dans la bioconservation et l'amélioration de l'état de santé des consommateurs. De ce fait, l'objectif principal de cette étude était d'isoler des bactéries lactiques à partir du lait de différentes espèces animales et d'identifier les souches présentant un effet antagoniste associé à quelques propriétés probiotiques.

Deux cent trente-trois (233) isolats à Gram positif, catalase négative et non sporulés ont été retenus à partir de 58 échantillons représentant 22 exploitations agricoles. L'activité antagoniste a été testée contre 6 souches indicatrices : *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25921, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, et *Enterococcus faecalis* ATCC 51299. Les isolats montrant un pouvoir inhibiteur ont subi une identification biochimique en utilisant les galeries API 50 CH et API 20 Strep. Les isolats sélectionnés pour leur pouvoir bactériocinogène ont subi une identification moléculaire en utilisant la Rep-PCR. Une caractérisation de l'agent inhibiteur a été réalisée pour ne retenir que les souches productrices de bactériocine. Les isolats bactériocinogènes sont testés pour leur comportement *in vitro* vis-à-vis des conditions du tractus gastro-intestinal.

Un total de 68 isolats a montré un pouvoir antagoniste contre au moins une souche test. Après élimination de l'effet de l'acide et du peroxyde d'hydrogène, 23 isolats seulement ont gardé leur effet inhibiteur. L'identification biochimique a permis d'identifier nos 23 isolats comme étant des *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (4 isolats), *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *diacétylactis* (4 isolats), *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* (3 isolats), *Streptococcus thermophilus* (3 isolats), *Lactobacillus casei* (2 isolat), *Lactobacillus plantarium* (2 isolats), *Leuconostoc lactis* (2 isolat), *Leuconostoc mesenteroides* (2 isolat), *Lactobacillus rhamnosus* (1 isolat). La technique moléculaire Rep-PCR a confirmé l'appartenance des isolats aux différents groupes lactiques.

Les bactériocines produites par ces derniers isolats sont toutes thermostables à un traitement de 80°C et 100°C pendant 20 min alors que deux souches seulement ont gardé leur effet sous un traitement de 120°C pendant 20 min. L'étude de la cinétique de production de l'agent inhibiteur a révélé un début de production pendant de la phase exponentielle de croissance des bactéries (après 8h à 10h d'incubation) avec un maximum situé entre 14h et 16 h.

Les 23 isolats retenus pour leur effet bactériocinogène ont tous, à l'exception des *Leuconostocs*, montré une tolérance au pH 2 et aux sels biliaires avec un bon comportement des lactobacilles. Un pouvoir adhésif important a été également marqué pour 19 isolats avec un taux moins important chez les 4 *Leuconostocs*. La résistance à la plupart des antibiotiques a été remarquée chez les souches retenues avec un taux de survie important en anaérobiose.

Les lactobacilles et les streptocoques ont montré un bon pouvoir d'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin et du côlon par rapport aux autres souches.

Les souches V17, B69, C117 et C177 qui représentent les différentes espèces du genre *Lactobacillus* ont montré le meilleur comportement vis-à-vis des tests réalisés et elles peuvent être, donc, des bonnes candidates en tant que probiotiques.

Les bactériocines produites par la souche V17 (*Lactobacillus casei*) et par la souche V213 (*Lactococcus lactis*) ont montré une bonne thermo résistance à 120°C pendant 20 minutes. Cette propriété leur donne l'opportunité d'être des bioconservateurs.

Mots clés : Lait, bactéries lactiques, inhibition, bactériocine, Probiotique.

Abstract

Natural inhibitory potential of lactic acid bacteria can be exploited in the bioconservation food and reducing the number of germ contamination and in improving the health of consumers. Therefore, the main objective of this study was to isolate lactic acid bacteria from milk of different animal species produced by traditional farming in mountainous areas in the western region of Algeria and to identify strains with antagonistic effect associated some probiotic properties.

233 Gram-positive isolates, negative catalase and non-spore forming were selected from 58 samples from 22 farms. The antagonistic activity was tested against six indicator strains: *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25921, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299. Isolates showing an inhibitory power underwent biochemical identification using API 50 CH galleries and API 20 Strep. Characterization of the inhibitor agent was held to hold the bacteriocin producing strains. Isolates that have raised the filled conditions are tested for their *in vitro* behavior against gastrointestinal tract conditions.

A total of 68 isolates showed an antagonistic activity against at least one test strain. After removing acidity, hydrogen peroxide and phage, only 23 strains kept their inhibitory effect. Biochemical identification was used to identify our 23 isolates as of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (4 isolates), *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. biovar *.diacetylactis* (4 isolates) , *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* (3 isolates) , *Streptococcus thermophilus* (3 isolates) , *Lactobacillus casei* (2 isolates) , *Lactobacillus planetarium* (2 isolates) , *Leuconostoc lactis* (two isolates) , *Leuconostoc mesenteroides* (2 isolate) , *Lactobacillus rhamnosus* (1 isolates) . The molecular technique Rep- PCR confirmed the isolates belonging to different lactic groups.

The bacteriocins produced by these isolates were stable at a treatment of 80 °C and 100 °C for 20 min. The study of the kinetics of production inhibiting agent revealed an early production during the exponential growth phase of bacteria (8h to 10h after incubation) with a maximum time between 14h and 16h.

All isolates selected for their effect bacteriocinogenes all, with the exception of *Leuconostoc*, showed a tolerance of pH 2 and bile salts with good behavior lactobacilli. Provide an important adhesive was also marked for 19 isolates with a smaller rate for 4 *Leuconostoc*. Resistance to antibiotics was most noticeable at the selected strains with a high rate of survival under anaerobic conditions.

Strains V26, B69, C117 and C177 identified as *Lactobacillus* can be goods candidate for probiotics applications.

The bacteriocins produced by V17 strain (*Lactobacillus casei*) and the strain V213 (*Lactococcus lactis*) showed good heat resistance at 120 ° C for 20 minutes. This property gives them the opportunity to be biopreservatives.

Key words: milk, lactic acid bacteria, inhibition, bacteriocin, probiotic

Liste des tableaux

Tableau 1 : production de peroxyde d'hydrogène et inhibition bactérienne.....	19
Tableau 2 : Exemples de microorganismes probiotiques étudiés.....	43
Tableau 03 : Critères de sélections utilisés en laboratoires pour le screening des probiotiques.....	44
Tableau 4 : le code et la dose de chaque antibiotique utilisé.....	76
Tableau 5 : Caractéristiques physicochimiques des échantillons.....	78
Tableau 6 : profil physiologique et biochimique des isolats actifs.....	93
Tableau 7 : profil fermentaire des isolats retenus.....	101
Tableau 8 : identification des isolats lactiques.....	103
Tableau 9 : activité inhibitrice de 68 isolats lactiques bioactifs.....	109
Tableau 10 : pouvoir inhibiteur des isolats lactiques sous l'effet des enzymes protéolytiques.....	120
Tableau 11 : survies des isolats en présence des sels biliaires.....	129
Tableau 12 : capacité d'adhésion aux tissus épithéliaux de souches retenus.....	130
Tableau 13 : résultats du test d'antibiogramme des isolats	133

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i>	9
Figure 2 : différentes classes des bactériocines et leurs modes d'actions.....	25
Figure 3 : la microflore du tube digestif.....	31
Figure 4 : la flore fécale non cultivable.....	32
Figure 5 : la relation entre la microflore, le mucus et les cellules intestinales.....	35
Figure 6 : coloration de mucus des cryptes intestinales par Pas-bleau alian.....	37
Figure 7 : coloration des cellules caliciformes par bleu alcian.....	37
Figure 8 : la structure des glycoprotéines de mucus intestinal.....	38
Figure 9 : Approche pharmacologique des effets des probiotiques ou de leurs principes actifs dans le tractus digestif.....	47
Figure 10 : Flore totale des échantillons de lait de vache chèvre et brebis dénombrée sur les milieux MRS et M17.....	80
Figure 11 : taux de coques et de bacilles dans les 233 bactéries lactiques isolées.....	82
Figure 12 : répartition des isolats lactiques en coques et de bacilles en fonction de la température d'incubation.....	84
Figure 13 : Taux de coques et de bacilles de laits de différentes espèces animales.....	85
Figure 14 : taux de différents genres lactiques isolés à partir de trois types de lait.....	86
Figure 15 : taux des différents genres en fonction du mode d'incubation des échantillons.....	88
Figure 16 : aspect macroscopique des isolats sur milieu MRS après 48h d'incubation à 30°C.....	90
Figure 17 : Aspect des cultures pures des bactéries lactiques sur milieu MRS liquide...	90
Figure 18 : résultats de purification d'un isolat par la méthode des quadrants.....	91
Figure 19 : aspect microscopique de quelques isolats A : isolat V17 (bacille), B isolat V3 (coque).....	92
Figure 20 : résultats de l'identification par API 20 de deux isolats C44 (A) et B69 (B)..	95
Figure 21 : Répartition des 68 isolats lactiques actifs en genres.....	98
Figure 22 : Répartition des 68 isolats lactiques actifs en espèces.....	98
Figure 23 : profil fermentaire de deux souches de bactéries lactiques identifiées par	

des API 50 CHL ; A: <i>Lactobacillus plantrium</i> ; B: <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100
Figure 24 : répartition des isolats bactériocinogènes en genres et espèces.....	103
Figure 25 : Gel d'électrophorèse des produits de la (GTG)5-PCR des isolats identifiés par API 50CHL.....	106
Figure 26 : Dendrogramme et profils (GTG)5-PCR de bactéries lactiques, isolées de différents types de lait, retenues pour leur pouvoir bactériocinogène, groupés et identifiées au niveau de l'espèce par (GTG)5-PCR.....	107
Figure 27 : Aspects des effets inhibiteurs des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes.....	108
Figure 28 : nombre d'isolats inhibiteurs pour chaque bactérie indicatrice.....	112
Figure 29 : résultats de la recherche des inhibitions dues à l'acide produit par les isolats lactiques	113
Figure 30 : résultats de la recherche des inhibitions dues à l'acide produit par les isolats lactiques	114
Figure 31 : résultats de la recherche des inhibitions dues à l'acide produit par les isolats lactiques	114
Figure 32 : résultats de la recherche des inhibitions dues à l'acide produit par les isolats lactiques	115
Figure 33 : recherche des inhibitions dues au peroxyde d'hydrogène. (A) témoins (B) après traitement par la catalase présence d'inhibition (C) absence d'inhibition.....	117
Figure 34 : résultats de la recherche des inhibitions dues au peroxyde d'hydrogène produit par les isolats lactiques.....	118
Figure 35 : résultats de la recherche des inhibitions dues au peroxyde d'hydrogène produit par les isolats lactiques.....	118
Figure 36 : résultats de l'effet inhibiteur de quelques souches après traitement thermique.....	122
Figure 37 : représentation des résultats de l'effet inhibiteur des isolats bactériocinogènes après traitement thermique.....	123
Figure 38 : représentation des résultats de l'effet inhibiteur des isolats bactériocinogènes après traitement thermique.....	123
Figure 39 : représentation des résultats de l'effet inhibiteur des isolats bactériocinogènes après traitement thermique.....	124
Figure 40 : Cinétique de production de l'agent inhibiteur des isolats bactériocinogènes	125

Figure 41 : Cinétique de production de l'agent inhibiteur des isolats bactériocinogènes	125
Figure 42 : Cinétique de production de l'agent inhibiteur des isolats bactériocinogènes	126
Figure 43 : tolérance de pH des isolats lactiques bactériocinogènes.....	127
Figure 44 : tolérance de pH des isolats lactiques bactériocinogènes.....	127
Figure 45 : résultats du test d'adhésion d'une souche lactique (V11) au tissu épithélial du côlon.....	131
Figure 46 : Résultats de l'antibiogramme de quelques isolats lactiques.....	134

Liste des abréviations

✓ Noms de genres bactériens

B. : *Bacillus*

Bf. : *Bifidobacterium*

E. : *Escherichia*

En. : *Enterococcus*

L. : *Listeria*

Lb. : *Lactobacillus*

Lc. : *Lactococcus*

Ln. : *Leuconostoc*

P. : *Pediococcus*

S. : *Staphylococcus*

St. : *Streptococcus*

✓ Unités de mesures

°C : Degré Celsius

°D : Degré dornic

cm, mm, nm : Centimètre, millimètre,
nanomètre

g, mg : Gramme, milligramme

h, min, s : heure, minute, seconde

l, ml, µl : Litre, millilitre, microlitre

M, mM : Molaire, millimolaire

N : Normalité

Pb : paire de bases

rpm : Rotation par minute

U : Unité

UI : Unité Internationale

V/V : Volume par volume

✓ **Autres abréviations**

ADH : Arginine Dihydrolase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomique

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine triphosphate

BSA : Albumine Sérique Bovine

DO : Densité Optique

EPS : Exopolysaccharides

FAO : Food and Agriculture Organization

G+C : Guanine + Cytosine

GRAS: Generally Regarded As Safe

MEVAG : Milieu d'Etude de la Voie

d'Attaque des Glucides

MRS : de Man-Rogosa et Sharp

OGA : Gélose glucose à l'oxytétracyclique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pH : Potentiel d'Hydrogène

qsp : Quantité suffisante pour

SFB : Selenite F Broth

sp. : Espèce non précisée

ssp. : Sous espèce

TCA : Acide Trichloroacétique

UFC : Unité Formant Colonie

UV : Ultra Violet

Table des matières

Remerciements

Résumé

ملخص

Abstract

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Synthèse bibliographique

Chapitre I. Bactéries lactiques..... 6

I.1. Définition 6

I.2. Caractéristiques des bactéries lactiques 6

I.2.1. Caractéristiques physiologiques et morphologiques 6

I.2.2. Caractéristiques biochimiques..... 7

I.3. Classification et habitat des bactéries lactiques 7

I.4. Principaux genres de bactéries lactiques 9

I.4.1. Les lactocoques 9

I.4.2. Les entérocoques..... 10

I.4.3. Les Leuconostocs 11

I.4.4. Les lactobacilles 12

I.5. Identification et typage des bactéries lactiques 14

I.5.1- Méthodes phénotypiques 14

I.5.2- Méthodes génotypiques 15

I.5.2.1- Le ribotypage 15

I.5.2.2- Le profil plasmidique 16

I.5.2.3- Méthodes des empreintes moléculaires (fingerprinting)..... 16

I-6-Les composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques 17

I-6-1 Acides Organiques 18

I-6-2-Peroxyde d'hydrogène 19

I-6-3-Acide gras..... 20

I-6-4- Anhydride carbonique (CO₂) 20

I-6-5- Composants aromatiques 20

I.6.6. Les bactériocines..... 21

I.7. La production de bactériocines..... 25

I.8. Le conditionnement des bactériocines..... 26

I.9. L'application des bactériocines 26

I.10. Application de la bactérie productrice de bactériocines..... 27

Chapitre II : Microflore intestinale.....	29
II-1 Définition	29
II-2- L'établissement de la microflore :.....	29
II-3- Composition classique d'une flore intestinale humaine.....	30
II-4. Rôles de la flore intestinale	32
II-4.1. Rôle métabolique et nutritionnel.....	32
II-4.1.1. Métabolisme des glucides	33
II-4.1.2. Métabolisme des lipides	33
II-4.1.3. Métabolisme azoté	33
II-4.1.4. Synthèse des vitamines	34
II-4.1.5. Métabolisme des xénobiotiques	34
II-4.2. Rôle de défense.....	34
II-4.2.1. Effet « barrière »	35
II-4.2.2. Immuno-modulation	36
II-5- Le mucus	37
II-5- 1. Structure et propriétés physiques du gel	38
II-5-2. Synthèse et régulation	39
Chapitre III : Probiotiques.....	41
III.1. Définitions	41
III.1.1. Probiotiques.....	41
III.1.2. Prébiotiques	42
III.1.3. Symbiotiques	42
III.2. Les principaux probiotiques	42
III.3. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques.....	43
III.3.1. La résistance à l'acidité gastrique.....	44
III.3.2. La résistance aux sels biliaires.....	44
III.3.3. L'adhésion aux cellules épithéliales.....	45
III.3.4. La production de substances antimicrobiennes.....	45
III.3.5. Résistance aux antibiotiques.....	45
III.3.6. Critères technologiques.....	46
III.4. Mécanisme d'action	46
III.5. Effets physiologiques des probiotiques	48
III.5.1. Sur les fonctions intestinales	48
III.5.1.1. Digestion et absorption intestinale	48
III.5.1.2. Synthèse des vitamines	50
III.5.1.3. Motricité intestinale et transit intra-luminal.....	50
III.5.1.4. Effet des probiotiques sur la Barrière épithéliale intestinale	51

III.5.2. Prévenir la diarrhée causée par un traitement aux antibiotiques	52
III.5.3. Prévenir la récurrence des infections à <i>Clostridium difficile</i>	52
III.5.4. Rechutes de colite ulcéreuse	53
III.5.5. Stimulation du système immunitaire	53
III.5.6. Symptômes associés au syndrome de l'intestin irritable	54
III.5.7. Prévenir le cancer colique.....	54
III.5.8. Prévenir la récurrence en cas de pouchite	55
III.5.9. Traiter les infections à <i>Helicobacter pylori</i>	55
III.5.10. Effet sur la tolérance orale de la β -lactoglobuline	55
III.5.11. Allergie.....	56
III.5.12. Réduction du taux de cholestérol	56

Partie Expérimentale

Matériel et méthodes.....	59
1. Provenance des échantillons	60
2. Caractéristiques physicochimiques des échantillons.....	60
3. Dénombrement et isolement des bactéries lactiques	60
4. Identification des bactéries lactiques isolées.....	61
4.1. Examen macroscopique.....	61
4.2. Examen microscopique.....	61
4.3. Tests physiologiques et biochimiques.....	61
4.3.1. Recherche de la catalase	61
4.3.2. Croissance à différentes températures	61
4.3.3. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH).....	62
4.3.4. Production d'acétoïne.....	62
4.3.5. Culture sur lait de Sherman.....	62
4.3.6. Culture sur milieu hypersalé.....	63
4.3.7. Recherche de la réductase	63
4.3.8. Recherche de type fermentaire.....	63
4.3.9. Recherche de la citratase.....	63
4.3.10. Test d'hémolyse.....	64
4.3.11. Résistance au tellurite.....	64
4.3.12. Profil fermentaire des sucres	64
5. conservations des souches	65
5.1. Conservation à court terme	65
5.2. Conservation à long terme.....	65
6. Recherche du pouvoir inhibiteur	65
6.1. Méthode directe.....	66
6.2. Méthode indirecte.....	66
7. Caractérisation de l'agent inhibiteur	66
7.1. Inhibition due à l'acidité	66
7.2. Inhibition due au peroxyde d'hydrogène	67
7.3. Inhibition due aux bactériocines	68

8. Effet bactéricide ou bactériostatique.....	68
9. Effet de temps d'incubation	69
10. Thermostabilité de l'agent inhibiteur.....	69
11. Rep PCR des isolats	70
11.1. Extraction de l'ADN.....	70
11.2. Electrophorèse des produits de la réaction PCR	73
12. Etude des aptitudes probiotiques des souches lactiques.....	73
12.1. Tolérance de l'acidité.....	74
12.2. Résistance aux sels biliaires.....	74
12.3. Adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial.....	74
12.4. Teste d'antibiotique	75
13. Analyses statistiques.....	76
Résultats et discussion.....	78
1. Caractéristiques physicochimiques des échantillons	78
2. Isolement des bactéries lactiques	80
2.1. Dénombrement	81
2.2. Isolement des bactéries lactiques	82
3. Identification des isolats lactiques	90
3.1. Caractérisation macroscopique	91
3.2. Purification.....	91
3.3. Observation microscopique	91
3.4. Résultats des tests physiologiques et biochimiques.....	92
3.5. Identification des isolats par API 50 CHL.....	100
3.6. Confirmation de l'identité des isolats par la Rep-PCR	104
4. Recherche des souches lactiques productrices des agents antimicrobiens	108
4.1. Nature de l'agent inhibiteur	112
4.1.1. Inhibition due à l'acidité.....	113
4.1.2. Inhibition due au peroxyde d'hydrogène.....	116
4.1.3. L'effet des enzymes protéolytique sur l'agent inhibiteur.....	119
5. Caractérisation de l'agent inhibiteur.....	121
5.1 Thermostabilité de l'agent inhibiteur.....	121
5.2. Cinétique de production de l'agent inhibiteur	124
6. Comportement des souches vis-à-vis des conditions du tractus gastro intestinale.....	127
6.1. Résistance au pH des isolats retenus.....	127
6.2. Survie en présence des sels biliaires.....	128
6.3. Adhésion <i>in vitro</i> aux cellules épithéliales de l'intestin grêle et du côlon.....	129
6.4. Résistance aux antibiotiques.....	132
Conclusion.....	137
Références bibliographiques.....	140
Annexe	
Publication	

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques ont été utilisées par l'humanité depuis des siècles en raison de leurs propriétés technologiques et de leur capacité à améliorer les propriétés organoleptiques des aliments. En outre, la demande des consommateurs pour des produits sains et dépourvus de conservateurs chimiques est de plus en plus grande. Dans ce contexte, l'utilisation de bactéries lactiques utilisées depuis des siècles pour la fermentation des produits laitiers semble pertinente pour améliorer la digestibilité et/ou prolonger la durée de vie des produits laitiers fermentés. L'une des principales propriétés de ces bactéries est la production de substances antimicrobiennes telles que des bactériocines, des peptides ou des composés non protéiques de faible poids moléculaire (acides organiques, H₂O₂, et ainsi de suite) qui inhibent la croissance des pathogènes alimentaires et des micro-organismes d'altération. Comme starters, elles occupent aussi une place de choix dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique et de biopolymères. Depuis quelques années, elles ont acquis un rôle croissant en santé animale et humaine, proposées sous le terme de probiotiques.

Dérivant du mot grec désignant la vie, « bios », le terme de probiotique est né au milieu du siècle dernier de l'observation de l'influence positive de certains microorganismes sur la flore intestinale. Derrière ce terme scientifique se cache une réalité quotidienne : celle d'une consommation journalière de bactéries vivantes, en larges quantités, via les produits fermentés.

Certains consommateurs veulent croire que les seuls bons probiotiques sont d'origine humaine.

Pourtant, deux éléments contredisent cette idée. D'une part, les bactéries étaient présentes sur Terre des millions d'années avant l'Homme. D'autre part, le tractus digestif est stérile à la naissance de l'enfant. Mais il s'avère rapidement une excellente niche écologique, pauvre en oxygène et riche en nutriments : une première flore digestive s'installe très vite après la naissance, venant de l'extérieur proche, puis se modifie pour devenir très complexe chez l'adulte avec plus de 10¹¹ bactéries par gramme de selles, appartenant à plus de 400 espèces différentes.

Les probiotiques les plus traditionnellement utilisés sont les bactéries lactiques des genres *Lactobacillus* et *Streptococcus*, ainsi que les *Bifidobacterium*, qui ne sont pas à proprement parler des bactéries lactiques (Khan & Ansari, 2007).

Pendant des années les aliments ont été traités par des bactéries lactiques qui étaient connues comme importantes dans les fermentations et la conservation des aliments afin d'obtenir des produits avec de bonnes qualités organoleptiques et une grande stabilité (telle la résistance à la croissance des bactéries pathogènes) (Twomey *et al.*, 2002).

Des efforts considérables ont été consacrés au cours de ces cinquante dernières années pour affiner la connaissance de la physiologie, de la biochimie et de la génétique des bactéries lactiques. Toutes ces recherches ont permis aux microbiologistes et aux industriels de choisir les meilleures souches et d'améliorer la productivité, la qualité, et la sûreté des produits finis mais aussi le bien être du consommateur (Dortu et Thonart, 2008).

Par ailleurs, toute souche bactérienne isolée, potentiellement probiotique, devrait résister à des conditions très variées telles que l'exposition aux enzymes digestives des cavités buccale et gastrique, au pH acide de l'estomac, à la teneur réduite de l'O₂ dans l'intestin, à une température pas toujours optimale... En effet, les laits fermentés contiennent des bifides et des lactobacilles (*Lactobacillus casei* ou *Lactobacillus acidophilus*) qui transitent avec l'aliment, mais plus de 95% meurent en chemin. Les plus fortes mortalités sont observées dans l'estomac qui est un milieu très acide, au début de l'intestin grêle dont les cellules produisent des défensines, et dans le gros intestin sous l'action de la microflore autochtone (Armuzzi *et al.*, 2001).

L'objectif de notre étude était d'isoler, à partir de différents types de laits, de nouvelles souches de bactéries lactiques possédant les propriétés probiotiques. La résistance des souches isolées à différentes conditions de salinité, d'acidité ainsi que leurs effets en présence de souches pathogènes sont également étudiés afin de démontrer une potentielle activité probiotique, ce qui amènerait à leur utilisation à l'échelle industrielle.

Ce manuscrit débute par une synthèse bibliographique qui résume, dans un premier chapitre des généralités sur les bactéries lactiques, puis, dans un deuxième chapitre, des généralités sur la microflore intestinale et probiotiques. Il se poursuit par la description des méthodes et matériels utilisés, comprenant l'isolement des souches, la caractérisation de l'agent inhibiteur, et le comportement des isolats vis-à-vis des conditions similaires du tractus gastro-intestinal. Dans un troisième chapitre nous présentons nos résultats et leur discussion. Notre manuscrit se termine par la conclusion.

*Synthèse
bibliographique*

*Bactéries
lactiques*

I. Bactéries lactiques

I.1- Définition

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen (1919), comme étant un ensemble de micro-organismes vivants, procaryotes, assez hétérogènes sur le plan morphologique, se distinguant par leur production importante d'acide lactique et regroupés dans une seule famille qui est celle des « *Lactobacteriaceae* ».

Elles sont très répandues dans la nature, on les trouve notamment dans le sol et le lait (dans les litières, les fourrages, sur les mamelles et elles se retrouvent dans le lait pendant la traite où elles se multiplient rapidement). On peut ainsi en dénombrer jusqu'à 1 million dans 1 ml de lait ; mais elles se trouvent aussi chez l'homme où elles sont surtout présentes dans le tube digestif. Plus généralement, les bactéries lactiques se retrouvent partout où il y a de fortes concentrations de produits de dégradation des protéines, de vitamines, peu d'oxygène et surtout là où il y a des glucides. Elles ont un rôle important dans l'élaboration des produits alimentaires tel le cas de nombreux produits laitiers comme elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons. Elles ont aussi le pouvoir bénéfique de contribuer à la texture, la saveur des aliments ainsi qu'à la production de composés aromatiques. Elles permettent aussi la protection du lait en empêchant la prolifération des germes nuisibles par la production de bactériocines par exemple, ou en abaissant le pH par la production d'acide lactique (Leveau et Bouix, 1993).

I.2- Caractéristiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques répondent aux caractéristiques suivantes :

I.2.1- Caractéristiques physiologiques et morphologiques

Elles sont de morphologie et de physiologie très hétérogènes, leurs cellules sont soit des coques : c'est le cas des *Streptococcus*, mais aussi des *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, soit des bacilles : *Lactobacillus* (Leveau et Bouix, 1993) ;

- Ce sont des Gram positives et catalase négatives

- Elles sont généralement immobiles ;

I.2.2- Caractéristiques biochimiques

Leur type respiratoire est micro-aérophile ou anaérobie facultatif, elles sont capables de fermentation en anaérobiose comme en aérobie en produisant de l'acide lactique car elles sont dépourvues de cytochrome. Leur capacité de biosynthèse est faible, ce qui implique leur polyauxotrophie pour divers acides aminés, des bases nucléiques, des vitamines et des acides gras. Elles présentent des caractéristiques technologiques dont les gènes sont situés sur les plasmides et deviennent de ce fait instables par la perte de ces derniers. Elles sont aussi tolérantes à l'acidité; nitrate réductase négatives; catalase négatives et oxydase négatives (Eck et Gillis, 1997).

Elles se distinguent en plus par leur type fermentaire, elles métabolisent les saccharides par :

☞ **Le processus homofermentaire :** (c'est la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas), il s'agit de la fermentation des hexoses et du lactose aboutissant en anaérobiose à la production presque exclusive d'acide lactique (90% au moins); cette voie est utilisée par la plupart des bactéries lactiques (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Lactobacillus* du groupe I) (Dacosta, 2000).

☞ **Le processus hétérofermentaire :** voie des pentoses phosphates, c'est la fermentation des hexoses et du lactose aboutissant à la production d'acide lactique (environ 50%) et de substances diverses tels que le gaz carbonique (environ 25%), l'éthanol, le glycérol, des acides (en particulier de l'acide acétique). Cette voie est suivie strictement ou facultativement par les *Leuconostoc*, les *Lactobacillus* du groupe II et III, et les *Carnobacterium* (Dacosta, 2000).

Les industriels préfèrent employer des espèces homofermentaires, parce qu'elles acidifient mieux, ne dégagent pas de gaz carbonique et ne nuisent pas à la saveur (Dacosta, 2000).

I.3. Classification et habitat des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un groupe uni par une constellation de caractéristiques morphologiques ; métaboliques et physiologiques. Elles appartiennent à la lignée des Firmicutes, à la classe des Bacilli et l'ordre des Lactobacillales (Garrity et Holt, 2001).

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (De Roissart et Luquet, 1994). Cependant, les études basées sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S ont montré que certains taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne concordent pas avec les relations phylogénétiques suggérées. Ainsi, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par des caractéristiques phénotypiques (Gevers et al., 2001). Par conséquent, Les méthodes de typage moléculaire telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la réaction de polymérisation

en chaîne utilisant des éléments répétés (rep-PCR), ainsi que le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) sont extrêmement précieux pour la caractérisation et la détection des bactéries lactiques. Sur la base des données du séquençage de l'ADNr 16S et 23S, les bactéries Gram positives forment deux embranchements (figure 1). Un embranchement composé de bactéries Gram positives avec un pourcentage G + C inférieur à 50% (*Clostridium*) et un autre formé de bactéries ayant une teneur en G + C supérieure à 50% (Actinomycètes) (Gevers et al., 2001). Les bactéries lactiques typiques ont une teneur en G + C inférieure à 50% alors que le genre *Bifidobacterium* qui, d'un point de vue physiologique, fait partie des bactéries lactiques, appartient à la branche des Actinomycètes qui comprend aussi *Propionibacterium* et *Brevibacterium* (Vandamme et al., 1996). Il y a peu de corrélation entre la classification traditionnelle et la parenté phylogénétique des bactéries lactiques. Des genres morphologiquement distincts, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont phylogénétiquement entremêlés (Gevers et al., 2001).

Les bactéries lactiques sont définies comme des bactéries qui fermentent le glucose pour produire surtout l'acide lactique. Cependant cette définition couvre plus de taxa que ceux désignés par les bactéries lactiques. C'est surtout leur importance dans la fermentation des aliments et produits alimentaires (viandes, végétaux, fruits, poissons, produits laitiers et ensilage) qui les délimite (Vandamme et al., 1996). Ainsi le groupe des bactéries lactiques renferme les genres suivants: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (Dortu et Thonart, 2008).

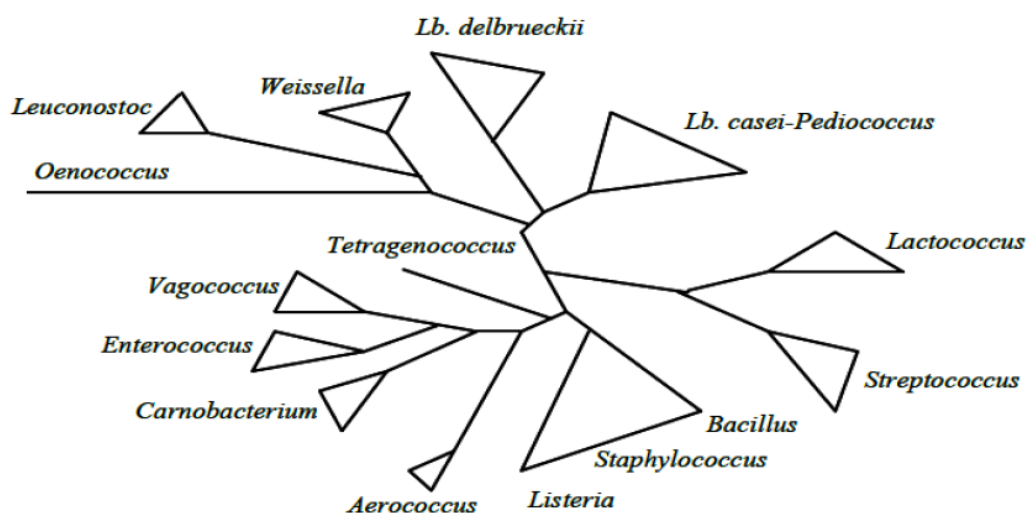


Figure 1 : Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* d'après Axelsson (2004).

I.4. Principaux genres de bactéries lactiques

I.4.1. Les lactocoques

Ce sont des microorganismes mésophiles, à Gram positif, sans activité catalase, non mobiles et se présentant sous forme de coques disposés en paires ou en chainettes. Leur métabolisme est homofermentaire, de l'acide lactique (L+) étant produit par la voie des hexoses. Le genre *Lactococcus* comprend 6 espèces : *L. garviae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* et *L.lactis*, *L.chungangens*. Cette dernière espèce est divisée en trois sous-espèces : *L.lactis* subsp. *lactis*, *L .lactis* subsp. *cremoriset* *L .lactis* subsp. *hordniae*. Les lactocoques sont des espèces dont les contenus en G+C varient de 34 % à 43%. Les caractéristiques générales distinctes des différentes espèces et sous-espèces sont détaillées dans le tableau 1.

Le génome complet de *L. lactis* subsp. *lactis*IL 1403 a été séquencé par Bolotinet *al.* (2001). L'information génétique de cette souche est stockée sur un chromosome circulaire de 2 365 589 paires de base (pb) codant pour 2 310 protéines. Les gènes codant pour ces protéines représentent 86% du génome.

De même, le génome complet de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 a été séquencé par Wegmann *et al.* (2007). Ce génome de 2 529 478 pb contient 81 pseudogènes et code pour 2 436 protéines.

Le lait est un habitat privilégié des lactocoques (Dellaglio *et al.*, 1994). En effet, les lactocoques se retrouvent fréquemment dans les laits crus à des niveaux pouvant varier de 10 à 10 000 ufc.ml⁻¹, selon les études et les espèces laitières. Les niveaux sont supérieurs dans les laits de chèvre et de brebis, comparés au lait de vache. Il est toutefois difficile de comparer les niveaux des lactocoques mentionnés dans les études car les méthodes de dénombrement diffèrent souvent. Parmi les lactocoques, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus étudiée et la plus fréquemment détectée dans les laits crus (Desmaures *et al.*, 1997).

I.4.2. Les entérocoques

Ce sont des coques Gram positives, sans activité catalase, non mobiles et présentant une grande diversité phénotypique (Devriese *et al.*, 1993 ; Park *et al.*, 1999). Trente-cinq espèces ont été proposées comme faisant partie du genre *Enterococcus*. La plupart des espèces d'entérocoques sont capables de se développer à pH 9,6 en présence de 6,5% de NaCl, de 40% de sels biliaires, et peuvent survivre 30 minutes à 60°C. Le genre est formé d'espèces dont les contenus en G+C sont voisins (37,5 à 44%). Par contre, si l'on se réfère aux taux d'hybridation ADN-ADN, elles apparaissent génétiquement différentes les unes des autres et éloignées des autres coques à Gram positif. Ces espèces sont sans activité catalasique et anaérobies facultatives.

Les entérocoques sont présents dans les laits et dans de nombreux fromages traditionnels du bassin méditerranéen (Cogan *et al.*, 1997). Ce sont des hôtes normaux des intestins des animaux à sang chaud, mais également des plantes et des insectes. Dans le système digestif de l'homme et d'autres monogastriques, ils exercent une activité probiotique. Certaines souches peuvent cependant présenter des facteurs de virulence leur conférant un pouvoir pathogène (Dellaglio *et al.*, 1994) *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* et dans une moindre mesure *Enterococcus durans* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées dans les laits et les fromages (Ogier *et al.*, 2008).

Dans les fromages, les niveaux peuvent s'élever jusqu'à 10⁶ ufc.g⁻¹ dans le caillé et jusqu'à 10⁷ ufc.g⁻¹ dans les fromages affinés (Bouton *et al.*, 2005). Ces niveaux élevés peuvent s'expliquer par la capacité des entérocoques à se développer en milieu acide et à des taux de sels élevés. Les entérocoques joueraient un rôle dans le développement des caractéristiques sensorielles des fromages. Certaines souches sont d'ailleurs utilisées comme levains lactiques (Giraffa, 2003).

Le statut des entérocoques est, cependant, controversé. Ils sont plutôt considérés comme des microflores d'intérêt technologique dans les pays d'Europe du Sud. A l'inverse, les études menées en Europe du Nord portent essentiellement sur les aspects négatifs (pathogène opportuniste, résistance aux antibiotiques). L'expression des facteurs de virulence varie selon les niches écologiques. Ces facteurs s'expriment particulièrement pour les populations à risque (patients immunodéprimés, personnes âgées). Si aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'ingestion d'aliments contenant des entérocoques et l'infection, il semblerait que les entérocoques contenus dans les fromages puissent présenter des résistances à des antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à entérocoques comme la gentamycine et la vancomycine (Ogier et al., 2008). Les efforts doivent donc porter sur la réduction du risque d'apparition de cette résistance en réduisant notamment l'utilisation d'antibiotiques en élevage.

I.4.3. Les *Leuconostocs*

Les *Leuconostocs* sont des coques à Gram positif, mésophiles hétérofermentaires, aérobies anaérobies facultatifs. Les principaux produits de leur métabolisme des hexoses sont le D-lactate, l'acétate ou l'éthanol et le CO₂. A partir du citrate du lait, du diacétyle et de l'acétoïne sont formés (Devoyod et Poullain, 1988). Les caractéristiques phénotypiques de ces bactéries sont reportées dans le tableau 3. Leur contenu G+C est de l'ordre de 37% à 45%. Ces quinze dernières années, des changements taxonomiques ont été réalisés et de nouvelles espèces ont été décrites, ainsi que trois nouveaux genres : *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* (Collins et al., 1983 ; Dicks et al., 1993). Le genre *Leuconostoc* comprend 12 espèces microbiennes : *L.mesenteroïdes* (avec trois sous-espèces, *mesenteroïdes*, *dextranicum* et *cremoris*), *L.citreum*, *L.carnosum*, *L.fallax*, *L.ficulneum*, *L.gasicomitatum*, *L.gelidum*, *L.inhae*, *L.kimchii*, *L.lactis* et *L.pseudomesenteroïdes*, *L.palmae*, *L.holzapfelii*.

Ces bactéries sont présentes dans de nombreux habitats naturels. Elles représentent notamment la microflore lactique dominante des végétaux frais. Les *Leuconostocs* sont fréquemment impliqués dans la fabrication d'aliments composés de végétaux fermentés ; l'espèce *Leuconostoc mesenteroïdes* étant majoritaire en début de fermentation avant que des bactéries plus acidifiantes dominent par la suite (Dellaglio et al., 1994).

Les *Leuconostocs* sont fréquemment retrouvés dans le lait, les levains, les laits fermentés et les fromages à des niveaux atteignant 10⁸- 10⁹ ufc.g⁻¹ comme par exemple dans le Crottin de Chavignol.

Les niveaux détectés dans les laits sont très variables, de moins de 100 ufc.ml⁻¹ jusqu'à plus de 10³ ufc.ml⁻¹ (Devoyod et Poullain, 1988).

Cependant, les *Leuconostocs* peuvent également être à l'origine de trous précoces dans le caillé (Devoyod et Poulain, 1988), en raison de leur activité hétérofermentaire et gazogène.

Bien qu'ils soient considérés comme non pathogènes pour l'homme et l'animal, des souches appartenant aux espèces *L. citreum* et *L. pseudomesenteroides* ont été isolées de prélèvements cliniques (Dellaglio *et al.*, 1994).

I.4.4. Les lactobacilles

Le genre *Lactobacillus* est très hétérogène (le pourcentage en G+C varie de 33 % à 55%). Il contient 140 espèces et 27 sous-espèces, mais sa classification évolue régulièrement. Les lactobacilles sont des bacilles Gram positifs, non mobiles, non sporulants, se développant dans des conditions microaérophiles à strictement anaérobies. Bien que certains travaux aient révélé la présence d'une catalase chez certaines souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, les lactobacilles ne présentent généralement pas d'activité catalasique.

Les lactobacilles se répartissent en trois groupes selon leur profil fermentaire, d'après la classification de Kandler et Weiss (1986) : Les lactobacilles du groupe I (LBI) sont des bactéries homofermentaires strictes, ne fermentant que des hexoses. Les espèces de ce groupe fréquemment rencontrées dans les produits laitiers sont : *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* et *L. helveticus*. Dans ce groupe, les écarts de contenu G+C sont élevés (33 à 53%).

Les lactobacilles du groupe II (LBII), lactobacilles hétérofermentaires facultatifs sont des bactéries qui fermentent les hexoses et produisent presque exclusivement de l'acide lactique. Ils peuvent également fermenter les pentoses après induction d'une phosphocétolase et produire de l'acide lactique et de l'acide acétique. Ce groupe rassemble entre autres *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. rhamnosus*, *L. casei* et *L. paracasei*. Les contenus en G+C sont compris entre 35 et 47%.

Les lactobacilles du groupe III (LBIII) sont hétérofermentaires stricts. L'utilisation des sucres suit la voie des pentoses phosphate et conduit à la formation de lactate, d'acétate ou d'éthanol et de CO₂. Les contenus en G+C sont très variables : de 33% à 53%.

Les séquences complètes du génome ont été établies pour 6 souches de *Lactobacillus* appartenant aux espèces *L.acidophilus*, *L.bulgaricus*, *L.johnsonii*, *L.sakei*, *L.salivarius* et

L.plantarum. Ce séquençage clarifiera probablement la classification de ce groupe (Dellaglio *et al.*, 2004).

Les lactobacilles sont les bactéries lactiques les plus ubiquitaires (Desmazeaud, 1992). Ils sont capables de coloniser des habitats très variés, pourvu que ces derniers répondent à leurs exigences de croissance, plus importantes que celles des lactocoques. Ainsi, les éléments indispensables à leur croissance sont certains acides aminés, des macroéléments (magnésium et potassium), ainsi que certains micro-éléments comme la niacine et le panthothénate de calcium. Si l'on retrouve les lactobacilles dans le lait, l'habitat de la majorité des lactobacilles (en particulier ceux du groupe I) est le tractus digestif et les organes génitaux des animaux (Bernardeau *et al.*, 2006). Les lactobacilles du groupe II se retrouvent préférentiellement sur les végétaux (Dellaglio *et al.*, 1994).

Certains d'entre eux constituent la flore majoritaire des ensilages (*L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paracasei*). Les niveaux de lactobacilles retrouvés dans les laits crus sont assez faibles pour les laits de vache et de chèvre. Ils se situent entre 10 et 100 ufc.ml⁻¹ (Desmasure *et al.*, 1997 ; Michel *et al.*, 2005).

Dans la majorité des cas, les lactobacilles du groupe II font partie de la microflore adventice désignée sous le terme de NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria). Apportés par le lait cru, ils peuvent s'implanter et se développer dans les fromages avec une forte capacité invasive. Les lactobacilles du groupe I, notamment *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* et *L. helveticus*, entrent dans la composition de levains pour la fabrication de fromages de type pâtes pressées cuites. *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* ou *L. curvatus* peuvent également être utilisés comme compléments de ferments (Bernardeau *et al.*, 2006).

Les lactobacilles sont de bons producteurs d'acide lactique et parfois de substances antibactériennes. Ils contribuent grandement à l'équilibre des microflores. En effet, ils ont un rôle inhibiteur vis-à-vis du développement de microorganismes pathogènes (Klaenhammer, 1993).

Certains lactobacilles du groupe III peuvent être à l'origine d'altérations, telles que le gonflement des fromages dû à la production de gaz, *L. bifementans* étant parfois mis en cause. D'autres défauts peuvent être attribués à la présence de *Lactobacillus*. La racémisation du L-lactate en D-lactate par certains lactobacilles peut entraîner l'apparition de cristaux blancs de lactate de calcium amers. L'apparition d'éraillures, voire de laminures peut également être liée à la production de gaz par les lactobacilles hétérofermentaires (groupes II et III).

D'autres lactobacilles sont considérés comme des pathogènes opportunistes (*L. catenaformis*, *L. crispatus*, *L. gasseri*) notamment impliqués dans les infections urinaires, alors qu'ils sont des commensaux reconnus au niveau vaginal par exemple. *L. buchneri* a été incriminé dans des intoxications alimentaires, du fait de la production, dans des fromages, d'histamine pouvant être hautement allergène chez certains individus, (Dellaglio *et al.*, 1994).

I.5. Identification et typage des bactéries lactiques

L'approche classique de la taxonomie des bactéries lactiques a été toujours basée sur les caractéristiques morphologiques et physiologiques. Cette identification a été élargie pour inclure des marqueurs chimiotaxonomiques (acides gras cellulaires), analyse des protéines totales de la cellule et autres caractéristiques de la cellule (Temmerman *et al.*, 2003). Une identification fiable est dépendante de l'information génotypique. Les méthodes génotypiques tels que le séquençage de l'ADNr, ribotypage, Random Amplified polymorphic DNA (RAPD), rep-PCR fingerprinting, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), électrophorèse en champ pulsé (PFGE) de l'ensemble de l'ADN chromosomique digéré constituent aujourd'hui une partie importante de la taxonomie moderne des bactéries lactiques (Temmerman, 2003). Ci-dessous, un aperçu concis des techniques les plus importantes utilisées pour la classification et l'identification des bactéries lactiques.

I.5.1- Méthodes phénotypiques

Les méthodes phénotypiques sont toujours utilisées dans les laboratoires de microbiologie alimentaire appliquée. Différents tests clefs ont été largement adoptés et de nos jours, les caractérisations morphologiques ainsi que les méthodes physiologiques, métaboliques, biochimiques et chimiotaxonomiques sont pratiquées. Des tests physiologiques simples, tels que la croissance à différentes températures, la tolérance aux acides et au sel ainsi que la production de gaz sont utiles pour la différenciation des genres (Gevers *et al.*, 2001 ; Temmerman *et al.*, 2003).

Parmi les méthodes biochimiques utilisées, les microméthodes ont connu un développement important, avec la commercialisation de systèmes d'identification associant,

pour un groupe bactérien donné, une galerie miniaturisée de tests biochimiques, et des documents ou des programmes informatiques permettant d'interpréter les résultats obtenus (De Roissart et Luquet, 1994). La première galerie biochimique miniaturisée destinée à l'identification des bactéries lactiques a été la galerie API (Analytic Programme Index) 50 CHL, commercialisée en 1970 pour l'étude des souches du genre *Lactobacillus*, puis rapidement étendue à d'autres genres (*Leuconostoc* et *Lactococcus*). Cette technique nécessite une durée d'incubation plus ou moins longue (12 heures à 48 heures) mais exige l'emploi d'un inoculum de faible charge bactérienne.

La comparaison des profils des protéines totales de la cellule obtenus par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), s'est révélée être extrêmement fiable pour l'identification au niveau de l'espèce voir même de la sous-espèce, à condition d'avoir une base de données des profils protéiques numérisés et normalisés de toutes les espèces connues de bactéries lactiques (Vandamme *et al.*, 1996).

I.5.2- Méthodes génotypiques

Les techniques basées sur l'analyse de l'ADN permettent une meilleure différenciation des micro-organismes à différents niveaux, allant du genre jusqu'à la souche en fonction des méthodes utilisées. En général, elles ont l'avantage sur les méthodes d'identification phénotypique de ne pas être influencé par les conditions de culture (Gevers *et al.*, 2001). Le séquençage direct du gène d'ARNr 16S est l'une des méthodes les plus puissantes pour l'identification en une seule étape d'une souche inconnue. Toutefois, il existe quelques limites. A titre d'exemple certaines espèces qui sont différentes peuvent avoir les mêmes séquences de l'ADNr 16S et la fiabilité de certaines séquences hébergées dans la base de données peut être discutable. Les méthodes de typage des souches deviennent de plus en plus importantes dans l'étude des bactéries lactiques. Les méthodes génotypiques utilisées pour le typage comprennent la PFGE de l'ADN chromosomique digéré, ribotypage, profil plasmidique et les méthodes de typage (signatures moléculaires) basées sur la PCR telles que les RAPD, AFLP et rep-PCR (Vandamme *et al.*, 1996).

I.5.2.1- Le ribotypage : Il associe l'analyse de l'ADN chromosomique par des enzymes de restriction avec l'utilisation de sondes ADN recombiné ; ce qui permet de différencier entre les différentes espèces. Le pouvoir discriminatoire de la méthode dépend du nombre et du type de sondes

d'oligonucléotides et enzymes de restriction utilisées. Le ribotypage a été particulièrement utilisé pour révéler les hétérogénéités entre des souches à faible homologie (Rousselet *et al.*, 1993).

I.5.2.2- Le profil plasmidique : La variation du nombre et de la taille des plasmides hébergés par des souches de la même espèce, est utile pour typer les bactéries lactiques car la plupart des souches de ce groupe semblent contenir plusieurs plasmides (Holzapfel *et al.*, 1995). Cependant, cette méthode de typage est affectée par la capacité des souches à perdre ou à gagner des plasmides.

I.5.2.3- Méthodes des empreintes moléculaires (fingerprinting)

- **L'électrophorèse en champs pulsé de l'ADN chromosomique digéré (Pulsed Field Gel Electrophoresis) :** Cette technique est souvent considérée comme la meilleure des méthodes de typage moléculaire, car elle a un pouvoir discriminatoire puissant et une plus grande reproductibilité. Cependant, cette méthode assez laborieuse nécessite une approche spécifique à chaque espèce (différentes enzymes de restriction et conditions d'électrophorèse). Elle est donc principalement utilisée pour étudier la diversité intra-spécifique et vérifier l'origine des souches (clonalité) (Johansson *et al.*, 1995).

- **Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD):** Considérée comme une méthode rapide, sensible et moins coûteuse pour le typage des différentes souches de bactéries lactiques. Elle a été utilisée avec succès pour différencier les bactéries lactiques au niveau intra-spécifique (Johansson *et al.*, 1995), au niveau inter-spécifique pour les entérocoques, pediocoques et les lactobacilles et au niveau inter-genre. Cependant, des amorces avec un fort pouvoir discriminatoire et une large applicabilité dans un grand groupe d'espèces de bactéries lactiques n'ont pas été décrites. La RAPD n'est pas approprié pour la construction d'une base de données pour l'identification (Descheemaeker *et al.*, 1997).

- **Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) :** Cette technique a été signalée comme l'un des outils les plus reproductibles permettant de discriminer les souches au niveau de l'espèce et intra-spécifique (Janssen *et al.*, 1996) ;

- **Repetitive extragenic palindromic- Polymerase Chain Reaction (rep-PCR):** Les séquences répétitives existent en multiples copies dans le génome de la plupart des bactéries Gram négatives et Gram positives. Trois types de séquences répétitives ont été identifiés chez les bactéries : des séquences répétitives inversées REP, des consensus entérobactériens à séquences répétitives

intergéniques ERIC et les éléments BOX. Ces séquences sont localisées en orientation inverse dans des zones distinctes sur le chromosome bactérien. Ces séquences paraissent hautement conservées chez les souches apparentées et très distinctes entre les différentes espèces ou genres bactériens. L'amplification sélective des régions existant entre ces séquences conservées génèrent des amplicons de tailles variables qui seront séparés par électrophorèse sur gel d'agarose ensuite comparés aux profils des souches de référence. Pour les bactéries lactiques l'amorce (GTG)₅ est considérée comme une très bonne approche pour le typage et l'identification des Lactobacilles et des Entérocoques (Gevers *et al.* 2001 ; Svec *et al.* 2005).

I-6-Les composés antimicrobiens produits par les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont connues pour produire, lors de leur croissance, des substances inhibant la croissance d'autres microorganismes. Cette caractéristique est utilisée pour la destruction des bactéries indésirables ou pathogènes dans la fabrication des aliments (Leveau *et al.*, 1993).

Les bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*) sont connues pour posséder de telles activités, que ce soit par la production d'acide lactique et d'autres acides organiques, de Peroxyde d'hydrogène ou de substance de type bactériocine.

Les bactéries probiotiques sont importantes pour empêcher l'adhésion de germes pathogènes aux cellules de la paroi intestinale (Château *et al.*, 1994).

I-6-1 Acides Organiques

La production d'acides organiques à partir des glucides de la ration alimentaire tels que l'acide lactique ou l'acide acétique limite, en abaissant le pH, le développement des *Escherichia coli* et des *Salmonella*. (Château *et al.*, 1994).

- L'accumulation d'acides organiques est directement inhibitrice pour les microorganismes nuisibles qui présentent un seuil bas de résistance aux changements de pH intracellulaire (De Roissart *et al.*, 1994).

Les bactéries lactiques hétérofermentaires peuvent produire des quantités notables d'acides organiques autres que l'acide lactique. Les leuconostocs et les lactobacilles hétérofermentaires produisent autant d'acétate que de lactate.

- ❖ L'acide lactique exerce une forte action inhibitrice à l'encontre de nombreux micro-organismes.
- ❖ La nature de l'acide présent dans le milieu influe sur la résistance des micro-organismes face à l'acidification.
- ❖ L'acide lactique existe sous deux formes énantiomères, donc les bactéries lactiques produisent l'un ou l'autre de ces isomères, parfois les deux à la fois. Tout dépend de leur contenu en lactate deshydrogénases puisque chacune de ces enzymes n'engendre qu'une seule forme. *Lactobacillus bulgaricus* ne fait que la variété D, tout comme la plupart des leuconostocs (par exemple *L. Cremoris*). De nombreuses espèces tendent à faire les deux à la fois.
- ❖ Trois critères sont à prendre en compte : la quantité d'acide lactique produite est liée au métabolisme fermentaire : homofermentaire ou hétérofermentaire. Cela conditionne également la nature des acides produits. Dans le cas de l'homofermentation seul l'acide lactique est produit alors que dans le cas de hétérofermentation, l'acide acétique peut être présent en plus de l'acide lactique. La vitesse d'acidification est aussi un critère important en technologie laitière (Bourgeois et Leveau, 1991).

I-6-2-Peroxyde d'hydrogène :

Dans le lait, outre l'action directe du peroxyde d'hydrogène sur certain contaminant, le système lactoperoxydase catalyse l'oxydation du thiocyanate par le peroxyde d'hydrogène en formant un composé inhibiteur. La lactoperoxydase et le thiocyanate sont présents initialement dans le lait, le peroxyde d'hydrogène est produit par les bactéries lactiques, le facteur limitant de ce système est le peroxyde d'hydrogène.

L'accumulation de peroxyde d'hydrogène dans le milieu de culture résulte donc d'un déséquilibre entre les moyens de synthèse et de dégradation de ce composé toxique (Bourgeois et *al*, 1996).

En présence d'oxygène, la croissance des bactéries lactiques est généralement ralentie par la production d'eau oxygénée dont l'accumulation peut provoquer l'inhibition progressive (mauvais développement à la surface des cultures). L'enzyme responsable de cette réaction est induite par l'oxygène et est réprimée par le glucose, ce qui explique que l'inhibition de ces bactéries est beaucoup moins forte en présence de glucose qu'en présence de galactose et de lactose.

Certaines souches probiotiques, en particulier les lactobacilles ne possèdent pas de complexes cytochromes pour réaliser la phosphorylation oxydatives mais utilisent les flavoprotéines pour l'oxydation terminale et forment du peroxyde d'hydrogène qui est un composé inhibiteur pour ces bactéries.

Il existe probablement des concentrations suffisantes en oxygène dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal des animaux pour que des quantités significatives de peroxyde d'hydrogène soient produites (Château et *al*, 1994).

Tableau 1 : production de peroxyde d'hydrogène et inhibition bactérienne (Barefoot et Nettles, 1983)

Espèces productrices	Espèces inhibées
<i>Lactocoques, Leuconostoc, lactobacilles</i>	Auto-inhibition
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp Lactis</i>	
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pseudomonas, proteus, Bacillus, st. aureus</i> <i>Bacillus megaterium.</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>St.aureus, Escherichia coli.</i> <i>Salmonella typhimurium, clostridium perfringens.</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i>	Bactéries psychrotrophes
<i>Lactococcus Lactis ssp lactis</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
<i>Biovar diactylactis</i>	

I-6-3-Acide gras:

Dans certaines conditions, quelques Lactobacilles et Lactocoques, possédant des activités lipolytiques, peuvent produire des quantités significatives d'acide gras. Par exemple de la fermentation du lait et des saucisses sèches.

L'activité antimicrobienne des acides gras a été identifiée pendant beaucoup d'années. Les acides gras insaturés présentent une activité contre les bactéries à Gram positif, et l'activité anti-fongique des acides gras dépend de la composition, de la concentration, et du PH du milieu.

I-6-4- Anhydride carbonique (CO₂)

Le dioxyde de carbone est formé à partir de la fermentation hétérolactique et peut créer un environnement anaérobique et être toxique pour quelques microorganismes aérobiques par son action sur les membranes cellulaires et sa capacité à réduire le pH interne et externe (Bourgeois et al, 1996).

La production de CO₂ résulte de la dégradation du citrate, le CO₂ est formé à partir du lactose, cette activité gazogène conduit à la formation de bulles ou d'ouvertures dans les produits fermentés (De Roissart et Luquet, 1994).

Le CO₂ peut aussi empêcher la croissance de beaucoup de micro-organismes d'altération alimentaire, particulièrement les bactéries psychrotrophes à Gram⁻, le degré d'inhibition par le CO₂ varie considérablement selon les espèces. Un taux de CO₂ de 10% pourrait diminuer la population bactérienne de 50% et entre 20 et 50%, il a une forte activité antifongique.

Les leuconostocs de la flore microbienne naturelle du lait produisent du gaz à partir du lactose ; ils interviennent dans l'ouverture du caillé du fromage à pâte persillée. Des souches sélectionnées de leuconostocs sont utilisées comme levains (Corcy et Lepage, 1991).

I-6-5- Composants aromatiques :

La fermentation lactique ne conduit pas seulement à la production d'acide lactique ; il y a aussi la formation de quantités plus ou moins importantes de produits secondaires. Par exemples: L'acide formique, l'éthanol, l'acide acétique, le diacétyle, l'acétoïne, L'acétaldéhyde, le gaz carbonique. Certains de ces composés participent au développement de la saveur et de l'arôme des produits laitiers (De Roissart et Luquet, 1994).

Les composés aromatiques rencontrés dans les produits fermentés peuvent être répartis en quatre classes :

- ❖ Les acides non volatils : Acide lactique, succinique, pyruvique, oxalique.
- ❖ Les acides volatils : acides acétiques éventuellement.
- ❖ Les composés carbonylés : Acétaldéhyde, diacétyl, acétoïne
- ❖ Les composés divers : Alcools, esters.

La production de diacétyl et d'acétaldéhyde est fortement dépendante du PH de la culture (De Roissart et luquet, 1994).

La production d'arômes est intimement liée à l'utilisation des citrates ; Certains Lactocoques (*diacetylactis*) et lencomostocs (*cremoris*) produisent du diacétyl, composant de l'arôme du beurre et des fromages frais. La concentration du citrate du lait varie au cours de la période de lactation. Le manque d'arôme peut être dû à une concentration trop faible du citrate du lait.

La production de diacétyl est optimale au voisinage du pH 5,5. Le manque d'arôme peut aussi être dû à l'utilisation d'un levain qui n'acidifie pas suffisamment. Les B.L. hétérofermentaires produisent, en plus de l'acide lactique, des substances (acétaldéhyde alcool etc ...) qui jouent le rôle de précurseur d'arôme(Corcy et Lepage, 1991).

I.6.6. Les bactériocines

Le terme bactériocine a d'abord été utilisé pour les substances produites par des bactéries Gram négatives, telles que les colicines produites par *Escherichia coli*. Les bactériocines des bactéries lactiques sont plus simplement définies comme des protéines ou complexes protéiques biologiquement actifs, inhibiteurs de bactéries Gram-positives exclusivement et plus particulièrement de bactéries taxonomiquement proches de la souche productrice, celle-ci étant immunisée contre sa propre bactériocine (Bourgeois et Larpent, 1996).

Ces bactériocines sont définies comme étant des molécules synthétisées par voie ribosomale par des bactéries et présentant une action antibactérienne contre des souches distinctes de la souche productrices. Cette dernière est protégée contre la ou les bactériocines qu'elle produit par la synthèse d'une protéine dite d'immunité.

Les bactériocines des bactéries lactiques sont généralement des peptides cationiques et amphiphiles, responsables de la perméabilisation de la membrane des cellules cibles (De Roissart et luquet, 1994).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes comme proposé par (Klaenhammer, 1993):

I.6.6.1. Classe I : Les lantibiotiques

Ce sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, comme la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Les lantibiotiques peuvent être divisés en deux types : la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (McAuliffe et Hill, 2001). Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticin 3147.

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par la liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II (undecaprenylpyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un précurseur du peptidoglycane. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la mort de la cellule (Patton *et* Van Der Donk, 2005).

Les lantibiotiques, composés de deux peptides comme la lacticine 3147, agissent également par formation de pores dans la membrane des cellules cibles (McAuliffe et Hill., 2001). La lacticine 3147 a un spectre d'action large. Le peptide A1 a une activité qui est plus élevée en présence du peptide A2. Il a été récemment proposé que la lacticine 3147 A1 agit en se liant au lipide II, inhibant la synthèse du peptidoglycane et permettant à la lacticine 3147 A2 de former un pore dans la membrane de la cellule cible (Morgan *et al.*, 2001).

I.6.6.2. Classe II.

Ce sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10. Elle est subdivisée en trois sous-classes.

- *La sous-classe IIa.* Ces bactériocines contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action. Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminal qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (Ennahar *et al.*, 2000).

- *La sous-classe IIb.* Elle comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires.

- *La sous-classe IIc.* Toutes les autres bactériocines de la classe II ne pouvant pas être classées dans les sous-classes a et b.

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de la classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « mannose perméase », pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane et par conséquent, la mort de la cellule (Vadyvaloo *et al.*, 2004). Le mécanisme de formation des pores n'est pas bien connu, même si l'hypothèse la plus courante est l'association de différentes molécules de la bactériocine (Ennahar *et al.*, 2000). Les bactériocines de classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram+. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules à savoir les cations et les anions. Le ratio optimal d'activité entre les deux sous-unités est en général de 1:1 mais il est de 4:1 pour la lactocine 705. Néanmoins, les mécanismes d'interaction des deux bactériocines entre elles et avec la membrane cellulaire ne sont que très peu connus.

I.6.6.3. Classe III

Ce sont des protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Papagianni, 2003).

Le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'enterolysin A, la zoocin A et la millericin B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques du peptidoglycane des cellules sensibles. La zoocin A a un spectre d'action étroit alors que l'enterolysin A et la millericin B ont un spectre d'action large. L'helveticin J a un mode d'action bactéricide (Nilsen *et al.*, 2003).

I.6.6.4. Classe IV

Ce sont des peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité.

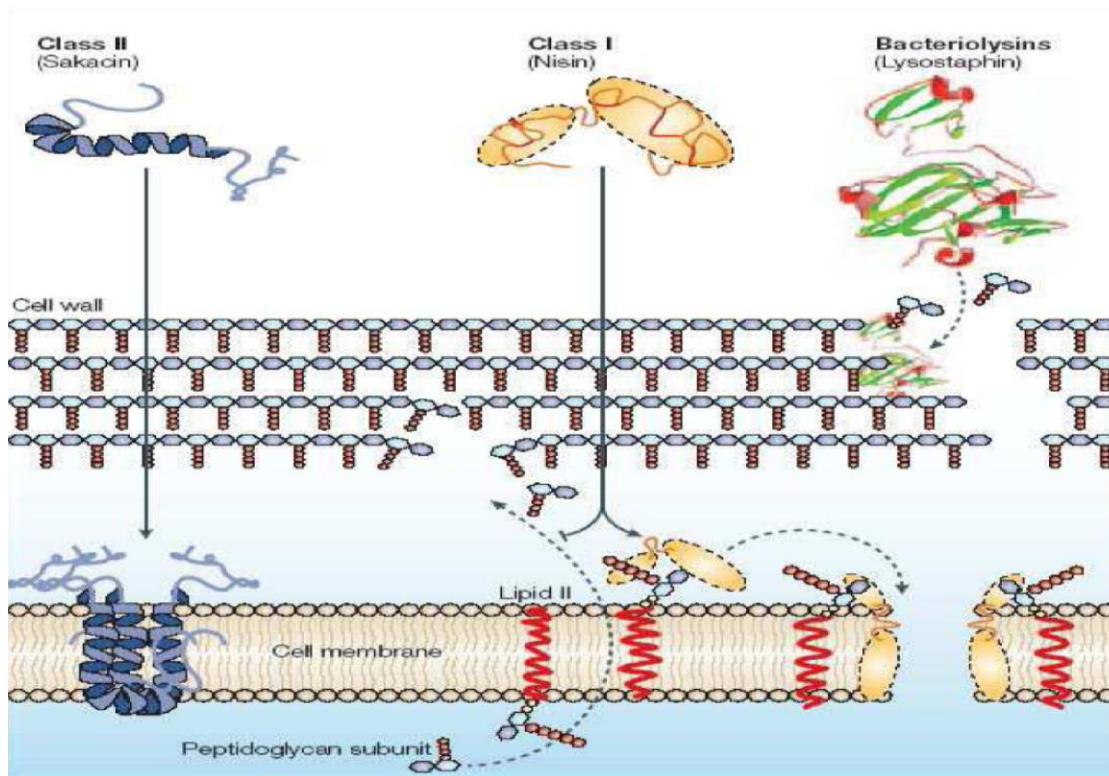


Figure 2: différentes classes des bactériocines et leurs modes d’actions d’après Cotter *et al.* (2005).

I.7. La production de bactériocines

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie productrice (Savijoki *et al.*, 2006) ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à une baisse de concentration dans le milieu de culture. Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée.

Comme l’ont montré Moretto *et al.*, 2000 pour la production de sakacin P par *L. sakei*, une même bactériocine peut être produite par des souches ou espèces différentes dont la capacité de production peut être variable. Les conditions de culture influencent fortement la production des bactériocines. En effet, l’optimisation de la croissance ne résulte pas nécessairement de l’optimisation de la production de bactériocines (Parente *et Ricciardi*, 1999). Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production (Verluyten *et al.*, 2004). Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux optimaux de la croissance. C’est par exemple le cas pour la production de sakacin P par *L. sakei* CCUG42687

(Moretro *et al.*, 2000), d'amylovorin L471 par *L. amylovorus* DCE471 (De Vuyst *et al.*, 1996) et de pediocin PA-1 par *Pediococcus damnosus* (Nel *et al.*, 2001).

La composition du milieu, tout particulièrement les sources et concentrations de carbone et d'azote, affectent fortement la production des bactériocines. Les bactéries lactiques bactériocinogènes requièrent de nombreux nutriments pour leur croissance et des milieux riches contenant de l'extrait de viande, de levure et des hydrolysats de protéines sont nécessaires. Il a déjà été montré que l'augmentation des concentrations en extrait de levure, extrait de viande ou peptone peut permettre une augmentation de la production de bactériocines. D'autre part, quelques études ont montré que la source de carbone utilisée et sa concentration est un facteur important dans l'optimisation de la production de bactériocines (Chen *et al.*, 2007).

I.8. Le conditionnement des bactériocines

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. La purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en œuvre de nombreuses techniques, à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle. La stratégie souvent mise en œuvre est la semi - purification. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation (Parente *et Ricciardi*, 1999).

I.9. L'application des bactériocines

Les bactériocines purifiées ou semi-purifiées sont appliquées après leur production en fermenteur. D'un point de vue législatif, une telle préparation est considérée comme un additif alimentaire. Jusqu'à présent, la nisine, un lantibiotique, est la plus acceptée comme additif

alimentaire (E234) (Guinane *et al.*, 2005). Les bactériocines peuvent également être appliquées sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice. Cette préparation sera considérée comme un ingrédient fermenté. Elle contiendra la bactériocine mais également d'autres métabolites microbiens tels que l'acide lactique. La pédiocine, une bactériocine de classe IIa, est

commercialisée sous cette forme sous le nom ALTA 2341. Des essais ont été récemment fait avec la lacticine 3147, un lantibiotique (Deegan *et al.*, 2006 ; Galvez *et al.*, 2007).

Un autre mode d'application des bactériocines consiste en l'immobilisation sur des cellules productrices dans des gels ou des films tels 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 sa 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 (Deegan *et al.* 2006 ; Galvez *et al.*,2007).

I.10. Application de la bactérie productrice de bactériocines

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.) et les conditions de stockage (température, atmosphère, activité de l'eau, etc.) doivent donc permettre la croissance et la production de bactériocine. Si les bactéries sont ajoutées en tant que starter dans des produits fermentés, elles doivent pouvoir conférer au produit les propriétés organoleptiques désirables tout en produisant des bactériocines. Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être également ajoutées en combinaison avec un autre starter qui confèrera 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). La concentration cellulaire maximale atteinte dans le produit doit par ailleurs être inférieure à la limite de 10^6 cfu/g généralement admise pour les produits non fermentés.

Microflore

Intestinale

II- Microflore intestinale

II-1 Définition

Une flore normale par l'ensemble des espèces présentes dans l'écosystème de façon constante et capable de s'y multiplier dans les conditions environnementales du tube digestif

II-2- L'établissement de la microflore

Initialement stérile, le tube digestif du nouveau-né est rapidement colonisé par une communauté microbienne d'origine maternelle et environnementale. Les sources de colonisation digestive du nouveau-né sont diverses.

La première source est la colonisation par la flore vaginale lors de l'accouchement: à la naissance, 1/3 des bébés ont en effet une flore digestive identique à celle de la mère. La deuxième source de colonisation est l'alimentation. Douze heures après l'introduction d'une alimentation maternelle, on constate l'apparition des anaérobies facultatifs au niveau digestif, les bifidobactéries et les clostridies étant présents chez moins de 50% des enfants, les *Bacteroides* chez moins de 30%. Après quelques jours, la quantité de bifidobactéries augmente très rapidement (10^{10} - 10^{11} germes par gramme de selles) chez 100% des nouveau-nés, parallèlement à une chute du nombre des anaérobies. Les *Bacteroides* représentent toujours moins de 30% de la flore présente. Il existe un " pic " de *clostridies* entre le 2 et le 4^{ème} jour. Après une semaine de vie déjà, les Bifidobactéries représentent plus de 99% de la flore digestive, puisque leur croissance est favorisée par le pH bas permettant leur réplication (Rambaud et al, 2004).

Chez les enfants nourris par lait artificiel, la colonisation s'est modifiée au cours de ces dernières années. En effet, auparavant, la flore résultant d'une alimentation par lait artificiel ressemblait à celle d'un côlon adulte. Actuellement, elle ressemble davantage à celle de l'alimentation par lait maternel, puisque la plupart des laits élaborés actuellement présentent une composition proche de celle du lait maternel. Cependant, si la colonisation primaire (pendant les premières 48 heures) est identique, les Bifidobactéries se répliquant toujours rapidement, les autres anaérobies, au contraire, ne diminuent pas (surtout les Gram négatifs).

Les *Clostridies* sont retrouvées chez 50-80% des nourrissons dès le 6^{ème} jour, mais ne sont en aucun cas dominantes. Les *Bacteroides* sont présent dans 60-80% des cas avec des taux de 10^8 - 10^{10} germes par gramme de selles. La flore est donc plus diverse et moins stable chez les enfants nourris par lait artificiel (Thomson et al, 2000 ; Rambaud et al, 2004).

L'environnement joue également un rôle important dans la colonisation digestive du nourrisson. La flore digestive d'un nouveau-né hospitalisé est différente de celle d'un enfant retourné rapidement à domicile. Dès 15 jours d'hospitalisation, on remarque l'apparition de souches résistantes, y compris en absence de traitement antibiotique. De plus, la transmission de germes manuportés (*Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacteriaceae*, *Candida albicans*, ...) a été prouvée. La saison (l'été) peut aussi favoriser une colonisation plus rapide.

Le terme de naissance peut également influencer le mode de colonisation, ainsi un isolement relatif (isolette) explique la colonisation bactérienne intestinale retardée des prématurés. Le prématuré connaît une colonisation digestive au début par des Klebsielles et des anaérobies avec un retard de l'installation de la flore bifide au-delà de 8 jours. Celle-ci prédomine finalement entre le 12^{ème} et le 35^{ème} jour de vie, mais dans une proportion plus faible que chez les nouveau-nés à terme. On compte 10 bifides pour une entérobactérie à 7 semaines de vie chez le prématuré contre 1000 bifides pour une entérobactérie chez le nouveau-né normal. Il est intéressant de noter que la rapidité de colonisation par les bifides chez les enfants de petits poids de naissance n'est pas liée au mode d'accouchement mais plutôt à l'immaturation du système immunitaire intestinal par le retard d'apparition des récepteurs spécifiques pour les Bifidobactéries (Thomson et al, 2000).

II-3- Composition classique d'une flore intestinale humaine

Les bactéries habituellement présentes dans l'intestin grêle appartiennent aux genres : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, et à quelques espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* à des concentrations faibles jusqu'à l'iléon où elles apparaissent dominées par des espèces anaérobies à Gram négatif appartenant au genre *Bacteroides* (figure 3).

Microflore normale de la bouche
Streptocoques viridans
Staphylocoques coagulase négatifs.

Veillonella sp.

Fusobactérium sp

Treponema sp

Neisseria sp

Streptococcus pneumoniae

Candida

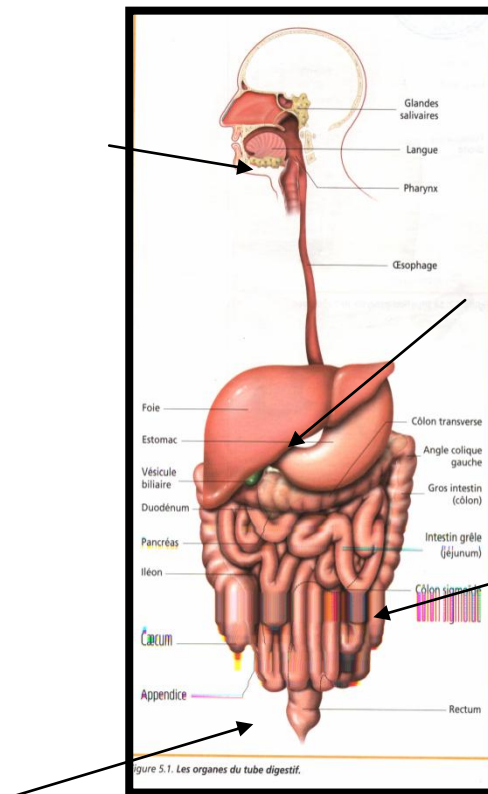
Microflore de l'intestin grêle

Lactobacillus sp

Bacteroides sp

Clostridium sp

Mycobacterium sp



Microflore normale de l'estomac
Strepyococcus

Staphylococcus

Lactobacillus

peptostreptococcus

Microflore du côlon et rectum

Bacteroides sp

Fusobactérium sp

Clostridium sp

Peptostreptococcus sp

Escherichia coli

Klebsiella sp

Proteus sp

Lactobacillus sp

Mycobacterium sp

Figure 3 : la microflore du tube digestif (Prescott et al, 1995 ; Raisonier, 2004).

Dans le côlon, il faut distinguer 4 types de flore :

- **flore dominante** ($N > 10^9$ UFC/g) exclusivement anaérobie : *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Propionibacterium*,

- **flore sous dominante** ($10^6 < N < 10^8$ UFC/g) : différentes espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (surtout *E.coli*) et les genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Desulfovibrio*, *Methanobrevibacter*.

- **flore résiduelle** : dont le taux est supérieur à 10^6 UFC/g) : bactéries en transit ou réprimées par la flore résidente.

- **flore fécale** : facilement accessible pour l'analyse, elle renferme de nombreuses espèces mortes et n'est pas représentative des différentes niches écologiques de l'écosystème microbien digestif.

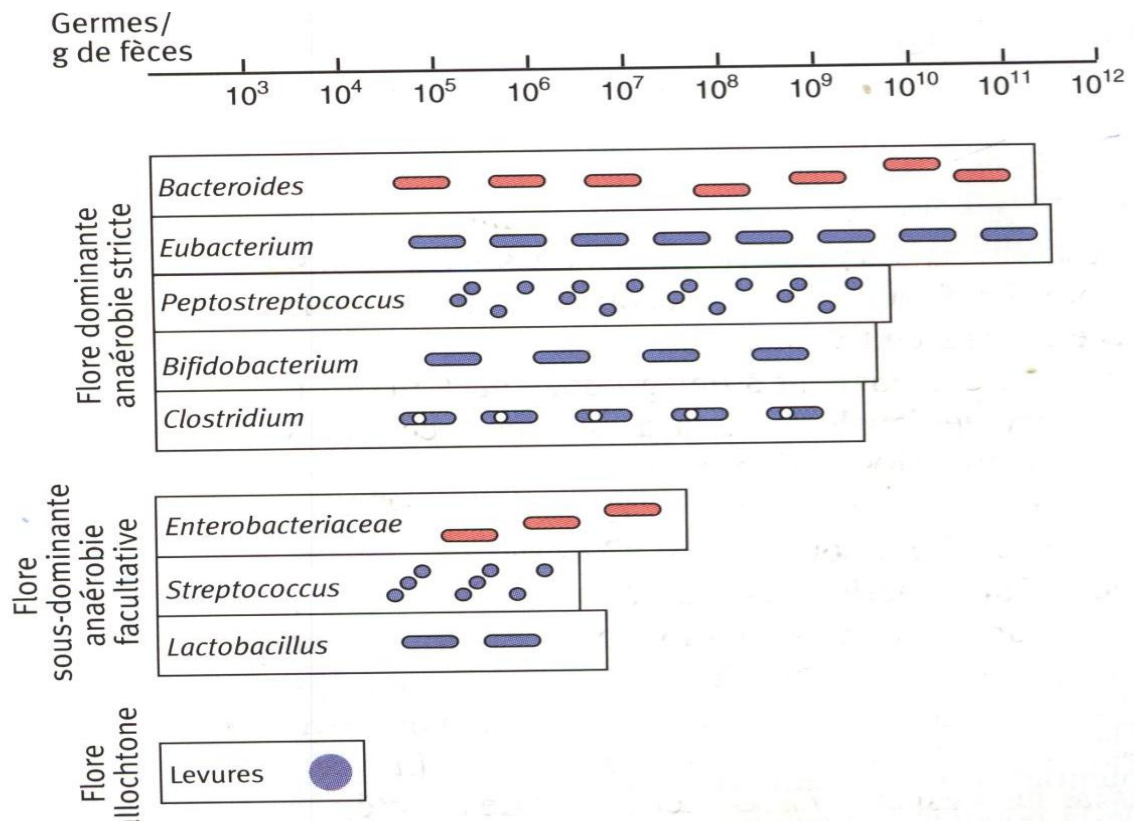


Figure 4 : la flore fécale non cultivable (Rambaud et al, 2004)

II-4. Rôles de la flore intestinale

La flore intestinale joue deux rôles essentiels : un rôle métabolique et un rôle de défense

II-4.1. Rôle métabolique et nutritionnel

Grâce à leur équipement enzymatique, les bactéries de la flore intestinale ont un impact considérable sur les composants intraluminaux. Elles interviennent dans le :

II-4.1.1. Métabolisme des glucides

De nombreux résidus glucidiques parviennent au colon : des résidus endogènes (glycoprotéines, mucines, résidus de cellules desquamées) , des résidus exogènes alimentaires: sucres simples (ex :lactose) pour lesquels le grêle n'a pas l'équipement enzymatique nécessaire, soit des résidus d'amidon, des fibres (pectine, cellulose, d'hémicellulose), non dégradés par les enzymes digestives. Ces glucides « résiduels » sont hydrolysés en sucres simples (glucose) pour partie utilisés par les bactéries comme substrat énergétique et pour partie transformés par fermentation : processus anaérobie de transformation des sucres simples par les enzymes bactérienne, aboutissant à la production de CO₂ d'hydrogène, de méthane, et d'acides gras volatils (ac pyruvique puis ac. acétique, lactique, propionique et butyrique) (Pradines, 2001).

II-4.1.2.Métabolisme des lipides

L'essentiel des triglycérides est normalement absorbés au niveau du grêle, mais une faible partie de graisses neutres peut atteindre le colon.

L'effet de la flore semble s'exercer surtout sur les acides gras saturés qui une fois hydroxylés ont un effet laxatif.

Les effets de la flore sur les stéroïdes sont plus complexes : les acides biliaires sécrétés par la vésicule et non réabsorbés au niveau du grêle vont être modifiés (déconjugés) par la flore, cette activité aboutit à la perte de taurine et de glycine. La flore est aussi capable de transformer les acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires, une partie de ces acides biliaires est réabsorbée (cycle entéro-hépathique), le rôle des acides biliaires résiduels est encore mal connu : ils ont un effet sur la motricité intestinale et ils joueraient un rôle dans la régulation de la flore comme facteurs d'inhibition. Les bactéries agissent également sur d'autres stéroïdes (transformation du cholestérol en coprostanol, déconjugaison de certains glucuroconjugés, clivage du noyau stéroïdes...) (Cherbut et al, 1997).

II-4.1.3. Métabolisme azoté

les résidus protidiques d'origine exogène (urée, protéines alimentaires non digérés) et endogènes (enzymes digestives, cellules desquamées, bactéries mortes), sont dégradé par les bactéries de la flore : processus de putréfaction qui aboutit à la production de : CO₂, NH₃, HS₂, d'amines biologiquement actifs (histamine, tyramine, tryptamine qui ont des effets vaso-actifs), de polyamines notamment l'ornithine qui semble jouer un rôle trophique majeur sur la muqueuse intestinale (stimulation de la synthèse d'ADN, développement des enzymes des micro-villosités, augmentation du

nombre de récepteur des immunoglobulines polymériques observés chez l'animal nouveau-né) (Rambaud *et al.*, 2001).

II-4.1.4.Synthèse des vitamines

Certaines bactéries de la flore intestinale sont impliquées dans la synthèse de vitamines (vit. K1 et vit du groupe B (B1, B2, B6, B12) (Rambaud *et al.*, 2003).

II-4.1.5.Métabolisme des xénobiotiques

Les bactéries de la flore participent à l'activation de certaines substances, médicamenteuses comme les composés imidazolés, elles peuvent transformer la digoxine en produit inactif, elles semblent jouer un rôle déterminant dans les ulcérations digestives dues à l'indométacine, elles sont nécessaires à l'action de certains comme les glycosides.

II-4.2. Rôle de défense

II-4.2.1.Effet « barrière »

« L'effet barrière » correspond à l'ensemble des mécanismes mis en oeuvre par la flore digestive et l'épithélium intestinal dans le but d'éliminer les bactéries indésirables potentiellement dangereuses. Ces mécanismes participent à la protection de la muqueuse intestinale contre des agents entéropathogènes, et à la régulation de la flore elle-même.

Trois mécanismes sont utilisés :

- compétition sur les sites situés sur les parois des cellules épithéliales
- production de toxines (bactériocines) (peroxyde d'hydrogène, acide lactique)
- neutralisation des toxines produites par les germes pathogènes.

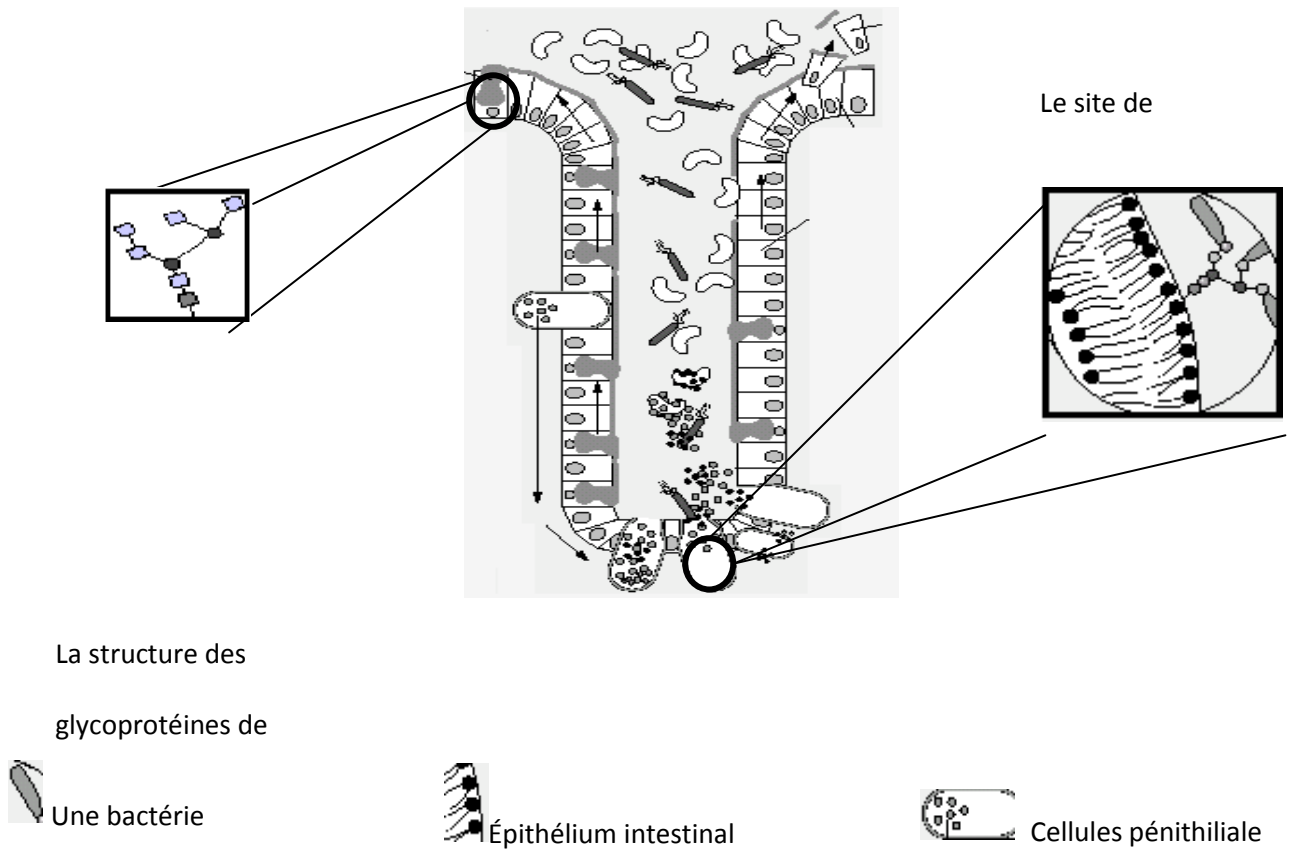


Figure 5 : larelation entre la microflore, le mucus et les cellules intestinales (Microbial Ecol Health Dis 2002in Lenoir-Wiinkoop et Hopkins. 2003).

Ces mécanismes sont propres à certaines espèces microbiennes (*Bifidobactéries*, *Lactobacilles*, *Bactéroides*, *peptostreptococcus*, *Enterocoques*...) de la flore dominante et sous dominante ; ils s'exercent à tous les niveaux du tube digestif, mais surtout au niveau du grêle et du colon (Lenoir-Wijnkoop et Hopkins, 2003).

II-4.2.2. Immuno-modulation :

Le tissu lymphoïde intestinal ou GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) , représente la masse lymphoïde la plus importante de l'organisme. Il est constitué de cellules immunitaires très hétérogènes : lymphocytes T, lymphocytes B, plasmocytes, polynucléaires neutrophiles, macrophages, cellules M, qui sont « enchâssées » dans la muqueuse et associées aux plaques de Peyer : (réservoirs de cellules immunitaires siégeant surtout dans le chorion de la muqueuse du cæcum.) .Les études réalisées avec des animaux sans germes (axéniques) ont montré le rôle décisif de la colonisation bactérienne du tube digestif sur le système immunitaire intestinale (SII). C'est en effet par son implantation à la naissance que la flore digestive (notamment certaines bactéries comme les bifidobactéries) induit puis entretient le bon fonctionnement du SII.

L'activation du SII par les bactéries de la flore permet : le développement de réponses immunes de type « suppressif », empêchant l'induction au niveau intestinale et systémique de réponses immunes contre les protéines étrangères des aliments et des bactéries de la flore résidente. Cette importante fonction permet d'empêcher le développement des hypersensibilités alimentaires dont l'allergie, ainsi que les réactions inflammatoires du tube digestif envers les bactéries intestinales (ex : maladie de Crohn) d'autre part la défense de l'organisme contre les germes entéropathogènes. L'activation des fonctions des macrophages (phagocytose, synthèse de cytokines) et des plasmocytes (synthèse et sécrétion d'immunoglobulines (IgAs), permet de protéger l'hôte contre les microorganismes entéropathogènes en bloquant leur adhésion, en empêchant la translocation vers le compartiment systémique, en bloquant la multiplication virale, le passage de macromolécules par formation d'immun complexes en neutralisant les entérotoxines ou en bloquant (Lenoir-Wijnkoop et Hopkins, 2003)

II-5- Le mucus

La surface de l'épithélium du tractus gastro-intestinal des mammifères est revêtue d'une couche protectrice de mucus. Cette barrière de mucus produite par des cellules épithéliales spécialisées est continue. Elle constitue une barrière physique entre le tissu sous-jacent et les micro-organismes, les toxines qu'ils produisent et les autres substances potentiellement nocives présentes dans la lumière intestinale. Dans l'intestin normal, l'érosion de la couche de mucus du côté de la lumière est due à l'action d'enzymes et au frottement des matières en cours de digestion; cette érosion doit être compensée par des sécrétions en provenance de la muqueuse pour garantir l'intégrité de la barrière.

Il existe deux formes de mucus: un gel insoluble dans l'eau (30-450 μm d'épaisseur) adhérant à la muqueuse et une couche visqueuse hydrosoluble qui recouvre le gel (Lenoir-Wijnkoop et Hopkins, 2003)



Figure 6 : coloration de mucus des cryptes intestinales par Pas-bleu alian (Rousselet et al, 2001)

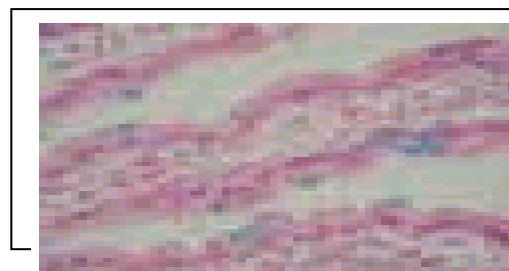


Figure 7 : coloration des cellules caliciformes par bleu alcian (Rousselet et al, 2001)

II.5.1. Structure et propriétés physiques du gel

Les sécrétions de mucus adhérent en provenance de tout le tractus intestinal sont des gels de faible viscosité, qui se déplacent lentement et se refusionnent s'ils sont sectionnés. Le gel est insoluble dans l'eau et stable à des pH alcalins. Les composants qui confèrent à toutes les sécrétions muqueuses leur viscosité et leurs propriétés gélifiantes sont des glycoprotéines de poids moléculaire élevé, appelées "mucines" (poids moléculaire d'environ 10×10^6 Da).

La glycoprotéine du mucus colique, comme toutes les autres mucines du tractus gastro-intestinal, est un polymère de plusieurs sous-unités glycoprotéiniques reliées par des ponts disulfures. La mucine présente dans le côlon humain comporte beaucoup de chaînes d'oligosaccharides chargées négativement, composées de 2 à 12 unités monosaccharides liées

La biosynthèse des mucines dans le côlon humain est encore très mal connue. Cette synthèse est étudiée par des biopsies coliques humaines en utilisant des précurseurs marqués sous la forme d'acides aminés et de sulfates S35. Ils ont en outre constitué une banque d'ADNc colique à partir de frottis muqueux et ont criblé cette banque avec des sondes pour l'ADN correspondant aux gènes Muc 1, Muc 2 et Muc 3. (Piel, 1996).

Probiotiques

III. Probiotiques

III.1. Définitions

III.1.1. Probiotiques

Le terme “probiotique” a été proposé pour la première fois par Parker en 1974, pour désigner les microorganismes et substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la microflore intestinale. Plus tard, Fuller (1991) a redéfini les probiotiques de la façon suivante: “préparations microbiennes vivantes, utilisées comme additif alimentaire, ayant une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale” (Prioult, 2003). Actuellement ils sont définis comme des microorganismes vivants qui, ingérés en quantité convenable, ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal (Marteau, 2003).

Les probiotiques doivent répondre à certaines exigences, avant d'être à même de produire un effet bénéfique (afssa, 2003) (L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments), qui sont :

1. Non pathogènes.
2. Résistance à l'acidité gastrique, à la bile et aux enzymes pancréatiques.
3. Capacité de coloniser transitoirement la muqueuse intestinale.

Ainsi une conférence FAO/WHO, (Food and Agriculture Organization / World Health Organisation), recommande que seuls les microorganismes qui survivent à leur passage dans le tube digestif et qui ont la capacité de proliférer soient considérés comme probiotiques.

III .1.2. Prébiotiques

Un prébiotique est défini comme une substance non-digestible qui induit un effet physiologique bénéfique à l'hôte en stimulant de façon spécifique la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de populations bactériennes déjà établies dans le côlon (Gibson & Roberfroid, 1995 in afssa, 2003). Parmi les nombreux agents prébiotiques, les plus connus et étudiés sont les fructanes (FOS : fructo-oligosaccharides, oligofructose, et inuline) et d'autres oligosides de galactose et transgalactose (GOS et TOS). Le lactose qui échappe à la digestion dans l'intestin grêle de l'enfant est également un prébiotique (Rao, 2001).

III.1.3. Symbiotiques

Un symbiotique est défini comme un produit qui contient à la fois un (des) probiotique(s) et un (des) prébiotique(s) (afssa, 2003). Cette définition indique que les cellules bactériennes bénéfiques qui survivent au passage dans l'estomac, peuvent croître rapidement et affronter la concurrence grâce à la présence du substrat sélectif, puis établir leur prépondérance (Rao, 2001).

Depuis des centaines d'années, les produits fermentés sont toujours considérés comme étant source de santé et de longévité. Vers la fin du XIX^e siècle, le concept des probiotiques provient d'un chercheur et Prix Nobel Russe, Elie Metchnikoff, qui avait pour théorie que la longévité des paysans bulgares était directement liée à leur consommation de laits fermentés (Prioult, 2003).

Au début des années 1920 en Indochine, un microbiologiste français du nom de Henri Boulard a isolé une nouvelle souche de levure à laquelle il a donné son nom, *Saccharomyces boulardii*. Son usage est beaucoup plus répandu comme probiotique en Europe qu'en Amérique du Nord.

De nos jours, les probiotiques font l'objet de recherches intensives et on trouve de plus en plus, dans le commerce, des préparations renfermant divers micro-organismes bénéfiques. On ajoute parfois aux probiotiques des fibres destinées à favoriser leur prolifération (des fructo-oligosaccharides, par exemple, comme l'inuline, extraite de la racine de chicorée).

III.2. Les principaux probiotiques

Les probiotiques sont principalement des bactéries et des levures, présentes ou non dans la microflore intestinale résidente. Les principaux germes utilisés et étudiés sont : *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Bifidobacterium* qui appartiennent au groupe des bactéries lactiques, mais aussi *Enterococcus*, *Escherichia*, *Propionibacterium*, *Bacillus* et des levures (tableau 2) (Gomez et Malcata, 1999).

Tableau 2: Exemples de microorganismes probiotiques étudiés (Gomez et Malcata, 1999).

Genre	Espèces
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i> <i>rhamnosus/GG</i> <i>reuteri</i> <i>bulgaricus</i> <i>lactis</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>bifidum</i> <i>breve</i> <i>infantis</i> <i>longum</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>boulardii</i>

III.3. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce de la souche utilisée car les effets probiotiques sont spécifiques à la souche microbienne. La non pathogénicité (innocuité) des souches est un critère très important, les souches ayant le statut GRAS (*Generally Regarded As Safe*) sont d'ailleurs à favoriser. Toutefois, le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques qui doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin, et donc résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte.

Les bactéries étant administrées par voie orale, il faut qu'elles franchissent les obstacles majeurs du transit digestif : le pH acide, les sels biliaries, les enzymes pancréatiques...etc (Percival, 1997 ; Lamoureux, 2000 ; Millette et *al.*, 2008).

Le tableau 3 rapporte les critères les plus utilisés dans différents laboratoires pour le screening des probiotiques.

Tableau 3 : Critères de sélections utilisés en laboratoires pour le screening des probiotiques (Nousiainen et *al.*, 2004).

Critères	But cherché
- Résistance à l'acidité gastrique	- Survie pendant le passage par l'estomac et duodénum
- Résistance aux sels biliaires	- Survie pendant le passage par l'intestin grêle
- Production d'acide (à partir de glucose et de lactose)	- Production « de barrière acide » efficace dans l'intestin
- Adhésion au mucus et/ou aux cellules épithéliales humaines	- Colonisation efficace, réduction des sites d'adhésion des pathogènes à la surface
- Production de substances antimicrobiennes	- Inhibition du développement des germes pathogènes
- Résistance à la chaleur	- Survie pendant le processus de transformation
- Bonnes propriétés technologiques	- La stabilité, croissance sur une large échelle, survie dans le produit, résistance aux bactériophages

III.3.1. La résistance à l'acidité gastrique

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les bas pH. Le temps de passage peut être d'une heure à quatre heures selon l'individu et son régime. Par conséquent, quelques auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2.5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (Ammor et Mayo, 2007).

III.3.2. La résistance aux sels biliaires

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

III.3.3. L'adhésion aux cellules épithéliales

La capacité d'adhésion à la couche intestinale est un critère de sélection recommandé pour le choix des probiotiques, parce que c'est une condition pour la colonisation des entrailles. L'adhérence constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes. Elle est basée sur la réalisation d'un ensemble de tests *in vitro* puis *in vivo* en utilisant des cellules d'origine animale et/ou humaine (Palomares et al., 2007 ; Reyes-Gavilan et al., 2011). En plus du pouvoir d'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin, les probiotiques peuvent se fixer au mucus qui recouvre les entérocytes ou aux divers microorganismes que l'on retrouve dans le tractus gastro-intestinal (Lamoureux, 2000).

III.3.4. La production de substances antimicrobiennes

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (Labioui et al., 2005).

III.3.5. Résistance aux antibiotiques

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques grâce à leur structure et physiologie. Les travaux de Temmerman et al. (2003) ont montré que 68.4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. Des souches de *Lactobacillus* ont été trouvées résistantes à la kanamycine (81%), à la tétracycline (29.5%), à l'érythromycine (12%) et au chloramphénicol (8.5%). 38% des isolats de *Enterococcus faecium* ont été trouvés résistants à la vanomycine. Dans la plus part des cas la résistance n'est pas transmissible, cependant, il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autre espèces et genre. C'est une raison significative pour choisir des souches manquantes du potentiel de transfert de résistance (Denohue, 2004).

Les autorités européennes ont récemment conclu que quelques bactéries utilisées pour la production d'aliment pourraient poser un risque à la santé humaine et animale en raison d'héberger des souches avec les gènes de résistance transmissibles. Par conséquent, avant de lancer une culture probiotique, il est important de vérifier que les souches bactériennes

impliquées ne comportent pas de gènes transmissibles de résistance aux antibiotiques (Ammor et Mayo, 2007).

III.3.6. Critères technologiques

En plus de l'innocuité et des propriétés fonctionnelles, des critères technologiques sont également pris en considération dans la sélection des souches probiotiques. Selon Saarela *et al.* (2000), ces critères sont :

- Bonnes propriétés sensorielles ;
- Résistance aux phages ;
- Viabilité durant le traitement technologique ;
- Stabilité dans le produit et durant le stockage.

III.4. Mécanisme d'action

Les nouvelles méthodes moléculaires permettant d'étudier les écosystèmes microbiens sont les éléments clés d'une renaissance de l'étude de la microflore intestinale. La probiogénomique est aussi une nouvelle science qui permettra de connaître les rôles biologiques et fonctionnels des probiotiques (Roy, 2000).

De multiples mécanismes sont impliqués et cela explique la diversité des situations cliniques dans lesquelles une efficacité a été montrée (Marteau *et al.*, 2003). Les probiotiques peuvent exercer des effets directs sur le chyme, la flore ou la muqueuse intestinale mais ils peuvent aussi avoir des effets indirects liés aux modifications de l'écosystème ou du système immunitaire local. Leur pharmacocinétique (notamment leur capacité de survie dans l'intestin) varie fortement d'un microorganisme à l'autre. Pour certaines bactéries, la survie jusque dans les selles atteint 30 %, alors que d'autres sont détruites dès leur séjour gastrique. Les signaux microbiens identifiés jusqu'ici incluent des peptides formylés, des lipopolysaccharides, des peptidoglycanes composants de la paroi cellulaire et des nucléotides (notamment des oligodésoxyribonucléotides CpG) (Marteau *et al.* 2004).

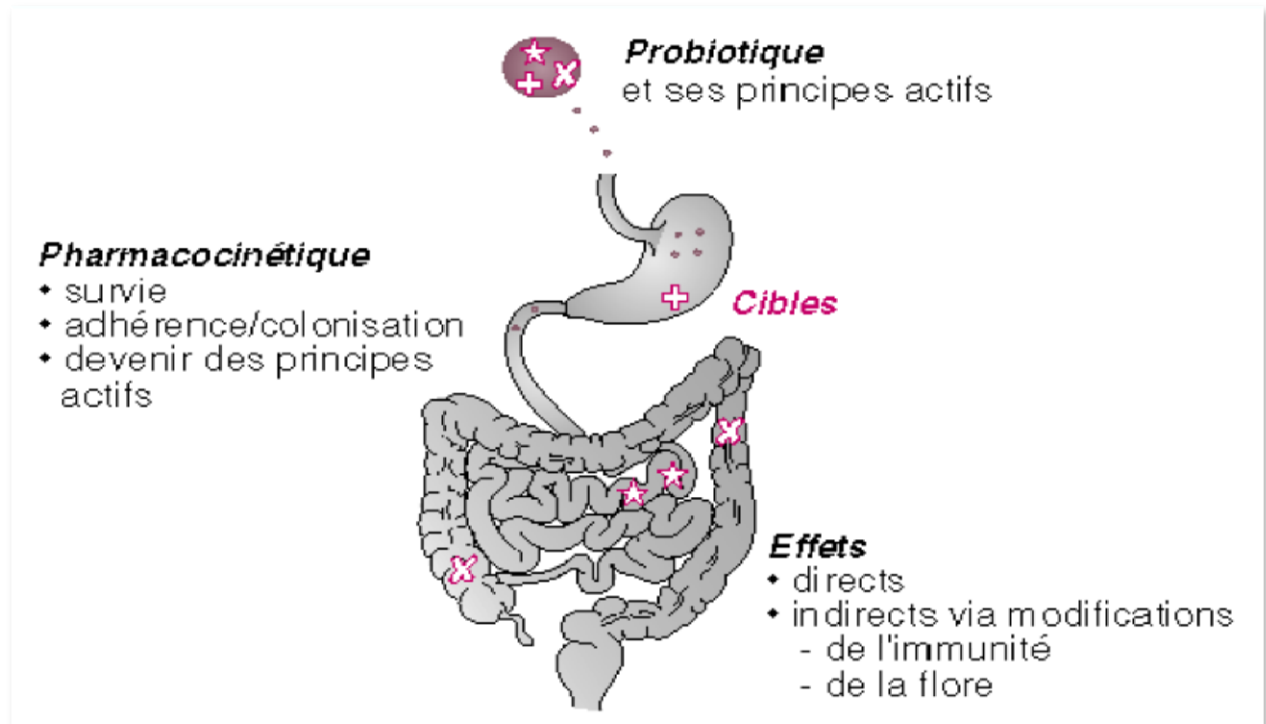


Figure 9 : Approche pharmacologique des effets des probiotiques ou de leurs principes actifs dans le tractus digestif (Marteau et Rambeau, 1998).

Dans l'expérimentation animale et dans des études "in vitro", selon Braegger (2002) la recherche a pu montrer le rôle que peuvent jouer les mécanismes pathogéniques efficaces suivants :

- Stabilisation de la flore intestinale par compétition avec des bactéries pathogènes au niveau de la fixation aux récepteurs et au niveau des substances nutritives.
- Production d'acides gras à courtes chaînes.
- Acidification du suc intestinal.
- Augmentation de la solubilité des minéraux.
- Diminution de la résorption des acides biliaires.
- Stabilisation de la fonction barrière de la muqueuse intestinale.
- Production de substances antibactériennes.
- Modification de toxines ou de récepteurs toxiques.
- Stimulation de la réponse immunologique aux germes pathogènes (production augmentée des IgA, IgG, IgM ; augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires,

Interleukin-10, TgF-bêta ; diminution de la production des cytokines-pro-inflammatoires TNF-alpha, Interferon-gamma ainsi que d'autres médiateurs inflammatoires tels que les matrix metalloprotéinases.

III.5.Effets physiologiques des probiotiques

Les effets bénéfiques attribués aux probiotiques sont nombreux, mais les preuves confirmant ces allégations sont encore rares. Les principaux effets rapportés dans la littérature sont :

III.5.1. Sur les fonctions intestinales

Les probiotiques alimentaires revendiquent en général des allégations fonctionnelles et s'intègrent dans le groupe large des « aliments fonctionnels ». La démonstration d'un effet sur une fonction intestinale n'est pas synonyme d'une action sur la santé : la relation effet physiologique-santé doit faire l'objet d'une analyse attentive et documentée, de même que les éventuelles variations des résultats d'une population à une autre. En matière d'affirmation d'effets de probiotiques sur les fonctions intestinales, il faut bien distinguer les effets décrits à partir d'études physiologiques (c'est à dire sur intestin normal -humain et/ou animal- *in vivo* et/ou *in vitro*) et ceux déduits d'études physiopathologiques humaines et/ou animales- *in vivo* et/ou *in vitro* (Marteau et al, 2003).

III.5.1.1. Digestion et absorption intestinale

- **Digestion de disaccharides**

- ❖ **Lactose**

Un effet stimulant de plusieurs souches probiotiques sur la digestion du lactose a été démontré par des études physiopathologiques *in vivo* chez l'homme adulte hypolactasique ou ayant un syndrome du grêle court (Boclé, 2005) : Les souches *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* augmentent la digestion du lactose dans l'intestin grêle (Marteau et al., 1997). Le yaourt améliore aussi la tolérance clinique au lactose, sans que celle-ci soit en stricte corrélation avec le degré de malabsorption du disaccharide améliorant Ainsi, l'absorption du lactose. *Saccharomyces boulardii* (250 mg x 4/j d'un Saccharose

Chez l'homme, *Saccharomyces cerevisiae*, levure riche en saccharase, aide à la digestion du saccharose (Marteau et al., 1997) et supprime les signes cliniques d'intolérance au cours de la carence congénitale en saccharase-isomaltase, situation clinique exceptionnelle surtout observée chez l'enfant.

- **Absorption du glucose**

Dans l'intestin résiduel (iléon) de rat entérectomisé recevant 1 mg/kg pendant 7 jours d'un lyophilisat de *S. boulardii* à 10^9 ufc/100 mg, la levure stimule fortement *in vitro* l'absorption sodium-dépendante du D-glucose par la bordure en brosse et double l'expression du cotransporteur 1 sodium-glucose (Rambaud et al., 2004).

- **Absorption hydrominérale**

Les prébiotiques peuvent avoir un effet stimulant sur la réabsorption colique de l'eau et du sodium, *via* les AGCC, notamment le butyrate (Topping et Clifton, 2001). Quantitativement, l'intérêt pour l'homme sain de cet effet physiologique n'est pas clairement connu ; certainement plus marqué avec les oligosaccharides non digestibles (NOS) les plus fermentescibles à dose faible ou moyenne, il s'efface, avec les fortes quantités de NOS et la diminution relative de leur fermentation, derrière leur effet laxatif.

Divers modèles physiopathologiques ont montré que certains probiotiques pouvaient inhiber ou prévenir la sécrétion entérocytaire de chlore d'origine bactérienne ou toxinique conduisant à une diarrhée infectieuse. Dans les lignées intestinales humaines HT29/cl.19A et Caco-2, *S. thermophilus* ATCC19258 et *L. acidophilus* ATCC4356 n'ont pas d'effet sur la sécrétion basale de chlore mais bloquent celle induite par *Escherichia coli* entéropathogène (Resta-Lenert & Barrett, 2003). Expérimentalement, l'effet antisécrétoire de *S. boulardii* vis à vis des toxines cholérique et d'*E. coli* a été étudié dans plusieurs modèles (Marteau et al., 1990). Sur l'intestin de rat *in vitro*, *S. boulardii* stimule fortement le co-transporteur 1 sodiumglucose.

De nombreux travaux expérimentaux ont suggéré, sur des modèles animaux et notamment chez le rat, que les ferments lactiques stimulent l'absorption colique du calcium et du magnésium, comme celle du fer et du zinc. Un lait fermenté (yoghourt) augmente de 23 %, par rapport à un lait non fermenté, le taux d'absorption duodénale du calcium (67 % *versus* 44%)

- **Absorption des protéines et de l'azote**

Chez le porc *in vivo*, les souches probiotiques du yaourt optimisent, par comparaison à un lait fermenté thermisé ou à un lait standard, l'absorption d'azote N¹⁵ (jugée à partir de prélèvements dans le sang portal) en l'étalant sur 4 h – par rapport à 2h - post-prandiales (Mpassi *et al.*, 2001 ; Rychen *et al.*, 2002). Un mécanisme possible est un ralentissement de la vidange gastrique et/ou de son transit oro-caecal induit par le yaourt (Gaudichon *et al.*, 1994). Chez l'homme sain volontaire, un lait fermenté (yaourt) retarde, par rapport à un lait non fermenté, la vidange gastrique de l'azote (Mahe *et al.*, 1994 ; Gaudichon *et al.*, 1995), sans modifier le haut niveau d'hydrolyse des protéines ni le taux d'absorption de N¹⁵ ni la sécrétion intestinale endogène d'azote (Gaudichon *et al.*, 1995). Le retard de vidange gastrique et de l'apport d'azote peut être néfaste chez le sujet âgé, chez lequel il faut au contraire apporter le maximum d'azote le plus vite possible, pour des problèmes d'accrétion digestive et de montée rapide des acides aminés sériques.

III.5.1.2. Synthèse des vitamines

Les probiotiques synthétisent des substances, principalement vitamines du groupe B (B1, B2, B3, B5, B6, B12), A et K (il s'agit de l'une des plus importantes sources naturelles de thiamine, une vitamine du groupe B qui est essentielle au métabolisme des hydrates de carbone et des gras) synthétisé par *Lactobacillus bulgaricus* (Marteau & Boutron-Ruault, 2002).

III.5.1.3. Motricité intestinale et transit intra-luminal

La seule variable étudiée a été le temps de transit intra luminal oro-anal ou colique, total et/ou segmentaire. Une souche de *propionibacterium*, administrée à raison de 5.10¹⁰ UFC/j pendant 14 jours, accélère le transit colique gauche chez l'adulte sain. Un lait fermenté par *Bifidobacterium animalis* souche DN-173 010 (10⁸ UFC/g, x 14j) et par des bactéries lactiques (10⁸ UFC/g, x 14j) accélère significativement le transit oro-anal chez des volontaires sains.

Le mélange probiotique VSL#3[®] n'a pas d'effet, au cours du syndrome du côlon irritable, sur la vitesse du transit gastro-intestinal tout en atténuant certains signes cliniques tels que le météorisme abdominal. Le(s) mécanisme(s) de l'effet des probiotiques sur le temps de transit intraluminal n'est (ne sont) pas établi(s) (Boclé, 2005).

III.5.1.4. Effet des probiotiques sur la Barrière épithéliale intestinale

- **sur les cellules intestinales**

Il faut reconnaître que les détails moléculaires des interactions flore-hôte sont encore peu connus. Schématiquement, on assiste à un dialogue (*cross-talk*) : la bactérie « parle » à la cellule intestinale et modifie son fonctionnement. Quelques signaux microbiens ont été mis en évidence, incluant des peptides **formulés** microbiens comme la formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine, des liposaccharides, des glycopeptides constituant la paroi cellulaire et des nucléotides. La réponse immunitaire innée de l'hôte distingue les signaux des pathogènes de ceux des bactéries bénéfiques, via des récepteurs spécifiques. Les cellules immunitaires utiliseraient ainsi différents récepteurs reconnaissant des points particuliers du système bactérien : lipoprotéines, glycopeptides, flagelline, ADN microbien. L'ADN microbien, comme les oligonucléotides, contient des dinucléotides non méthylés qui stimulent les lymphocytes, alors que l'ADN eucaryote ou les oligonucléotides méthylés ne le font pas.

Rachmilewitz démontre que les effets bénéfiques d'un probiotique sur une population de souris souffrant de colites induites chimiquement, étaient liés à l'ADN des bactéries, puisque de l'ADN non méthylé de cette souche bactérienne suffisait à induire un effet bénéfique (Rambaud et al., 2004).

- **Sur le mucus qui recouvre la muqueuse intestinale**

Les bactéries intestinales sont capables de dialoguer avec les cellules de la muqueuse dans l'optique d'une aide mutuelle.

Les probiotiques peuvent modifier la couche de mucus qui recouvre la muqueuse intestinale et renforcer l'intégrité de cette barrière cellulaire. (Boclé, 2005).

- **Sur La perméabilité intestinale**

La muqueuse intestinale joue un rôle fondamental dans la constitution d'une barrière physique entre le milieu externe (aliments, antigènes, bactéries...) et le milieu interne. Le bon fonctionnement de cette barrière garantit le contrôle de la perméabilité intestinale dont les altérations, dans certains cas, peuvent être délétères. Par exemple, des études montrent que des bactéries pathogènes comme *Escherichia coli* sont capables de perturber le fonctionnement de cette barrière et en conséquence d'induire l'augmentation de la perméabilité intestinale (Cherbut *et al.*, 2003).

les probiotiques pourraient jouer un rôle régulateur, l'administration de *Lactobacillus plantarum* influe sur l'augmentation de la perméabilité induite par *E. coli* (Cherbut et al., 2003 ; Boclé, 2005).

Les chercheurs ont mesuré la perméabilité membranaire en utilisant le modèle du passage du mannitol au travers de segments d'intestins de rats montés dans des chambres d'Ussing (Cherbut et al., 2003).

III.5.2. Prévenir la diarrhée causée par un traitement aux antibiotiques

Environ 20 % des patients qui prennent des antibiotiques contractent une diarrhée. Une méta-analyse de neuf essais cliniques publiés de 1977 à 1999 concluait que les lactobacilles et la levure *S. boulardii* peuvent réduire le risque de contracter une diarrhée à l'occasion d'un tel traitement. Le fait que les types d'antibiotiques et de probiotiques utilisés, les dosages et les durées de traitement varient beaucoup d'une étude à l'autre rend effectivement les conclusions de ces méta-analyses difficiles à appliquer pour les cliniciens. De plus, au cours d'un essai clinique réalisé chez 267 sujets traités aux antibiotiques, les chercheurs n'ont constaté aucune différence quant à la fréquence des diarrhées entre les sujets qui recevaient une préparation à base de lactobacilles (*Lactobacillus GG*) et ceux qui recevaient un placebo (Thomas et al., 2001). Une autre étude a donné le même résultat auprès de 58 sujets âgés à qui l'on avait donné de la levure *boulardii*. L'administration d'un mélange de prébiotiques (fructo-oligosaccharides) et de probiotiques chez 98 enfants a pu montrer son efficacité dans la prévention et le traitement des épisodes de diarrhée associée aux antibiotiques (Lewis et al, 1998).

III.5.3. Prévenir la récurrence des infections à *Clostridium difficile*

Les résultats de deux essais cliniques indiquent qu'un traitement à *Saccharomyces boulardii* (1 g par jour durant quatre semaines), en plus du traitement classique aux antibiotiques, peut diminuer significativement le risque de récurrence chez les personnes souffrant de cette infection gastro-intestinale fortement récurrente (Mcfarland et al, 1995 ; Surawicz et al, 2000).

III.5.4. Rechutes de colite ulcéreuse

La colite ulcéreuse pourrait être associée à la colonisation du côlon par une souche toxique d'*Escherichia coli*. Des chercheurs ont pensé à contrer cette colonisation en favorisant

l'établissement dans le côlon de micro-organismes *E. coli* non toxiques. Les résultats de deux essais ayant porté sur un total de 236 sujets indiquent qu'une préparation de probiotiques à base d'une souche non toxique d'*E. coli* est aussi efficace que la mésalazine, un anti-inflammatoire classique, pour réduire significativement les risques de rechute chez les patients en rémission de colite ulcéreuse (Kruisselbrink et al., 2001). Une autre étude en utilisant deux préparations de probiotiques, VSL#3 ou *lactobacillus* GG, a montrée le rôle possible des probiotiques dans la protection du côlon contre l'éther acide dinitrobenzène sulfonique (DNBS), qui est une substance induisant la colite. Des résultats similaires ont été trouvés par une réduction significative de la durée de la diarrhée, de la masse colique et de la mortalité (Lamine et al, 2004).

III.5.5. Stimulation du système immunitaire

La muqueuse de l'intestin grêle et du côlon contient un nombre de cellules immunes supérieur au nombre total existant dans tout le reste de l'organisme. L'intestin est ainsi le premier organe lymphoïde de l'organisme. Parallèlement, le tube digestif contient, chez l'homme, environ 10^{14} bactéries principalement présentes dans les parties terminales de l'intestin grêle et dans le côlon (Canzi et al, 2002). Il faut cependant signaler que les études cliniques, onéreuses et difficiles, comportent des biais scientifiques non négligeables :

- Elles s'intéressent surtout aux effets curatifs des probiotiques envers certaines pathologies, les effets préventifs étant peu étudiés car beaucoup plus difficiles à démontrer chez l'homme où les études épidémiologiques sont très longues.
- Seuls certains microorganismes ont été étudiés, ce qui ne signifie pas que d'autres sont sans effet.
- Les études aboutissant à l'absence d'effet chez l'homme sain ne sont pas toujours publiées alors qu'elles constituent des données intéressantes. Il est en effet important de savoir que la prise régulière de probiotiques n'a pas d'effets immunostimulants délétères pour l'organisme.

III.5.6. Symptômes associés au syndrome de l'intestin irritable

Le rôle des probiotiques a été efficacement démontré dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable. Les résultats de deux essais cliniques menés auprès d'un total de 100 sujets atteints du syndrome de l'intestin irritable indiquent qu'une préparation à base de

Lactobacillus plantarum (LP299V ou DSM 9843) administrée durant quatre semaines peut soulager la douleur abdominale et diminuer les flatulences associées à cette affection (Niedzielin et al, 2001).

L'association d'un VSL#3[®] et la formule Lactéol Fort[®] (à base de *Lactobacillus acidophilus*) pourrait contribuer à soulager les symptômes de l'intestin irritable chez certains patients (Kim et al, 2003). Par contre, un essai préliminaire croisé mené auprès de 12 sujets n'ont montré aucun effet significatif du probiotique LP299V (Sen et al, 2002).

III.5.7. Prévenir le cancer colique

Les amines hétérocycliques aromatiques (AHA) sont des agents initiateurs du cancer colique chez l'animal et sont suspectées de participer à l'étiologie du cancer du côlon chez l'Homme. Ces composés, et leurs dérivés sont produits lors de la cuisson d'aliments comme les viandes ou le poisson (Cherbut, 2000).

Des études laissent supposées que la consommation de bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus* F4, *Streptococcus thermophilus* V3, *Lactobacillus bulgaricus* 291 et *Bifidobacterium longum* BB536) pourrait jouer un rôle dans la diminution du processus de la carcinogenèse, les lésions de l'ADN, l'activité enzymatique du cytochrome P450 et la prévention des cancers coliques chez l'homme (Cherbut, 2000 ; Fioramonti, 2003).

III.5.8. Prévenir la récurrence en cas de pouchite

La pouchite, une inflammation récidivante de la poche iléale, est une conséquence fréquente du traitement chirurgical (coloproctectomie) de la colite ulcéreuse. Les résultats de trois essais cliniques menés sur un total de 116 sujets souffrant de pouchite récidivante indiquent qu'une préparation spécifique (VSL#3[®]) composée de quatre souches de lactobacilles, de trois souches de bifidobactéries et d'une souche de streptocoques permet de prévenir les rechutes (Mimura et al, 2004).

III.5.9. Traiter les infections à *Helicobacter pylori*

L'infection à *Helicobacter pylori* est, généralement, reliée à la plupart des ulcères gastroduodénaux. Dans 13 essais cliniques, des probiotiques avaient été utilisés (principalement des lactobacilles de différents types) pour traiter cette infection. Dans six de

ces études (180 sujets) seulement les probiotiques sont utilisés : cinq d'entre elles ont donné des résultats encourageants. Aux cours des sept autres essais (682 sujets), les probiotiques sont jumelés au traitement classique (antibiotiques et inhibiteur de la pompe à protons) : dans deux études, les probiotiques ont augmenté l'efficacité du traitement et dans les cinq autres, ils ont réduit les effets indésirables (diarrhée) du traitement aux antibiotiques. Certains de ces essais n'étaient pas à double insu avec placebo et portaient sur un nombre restreint de patients, mais l'auteur de la synthèse conclut que les données indiquent que les probiotiques peuvent être un traitement adjuvant intéressant et pourraient prévenir les infections à *Helicobacter pylori* (Hamilton-Miller, 2003). La plupart de ces études ont porté sur des porteurs sains, c'est-à-dire des patients infectés par cette bactérie, mais qui n'avaient pas de symptômes.

III.5.10. Effet sur la tolérance orale de la β -lactoglobuline

L'effet de *Lactobacillus paracasei* NCC2461, *Lactobacillus johnsonii* NCC533 et *Bifidobacterium lactis* NCC362 sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la β -lactoglobuline bovine (BLG) a été étudié. Des souris axéniques ont été colonisées avec une des trois souches avant l'administration par voie orale de protéines de lactosérum en vue d'induire la tolérance.

Cette étude permet de mettre en évidence l'effet des probiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la BLG chez la souris. L'effet observé dépend de la souche utilisée, la plus efficace étant *L. paracasei* (Prioult, 2003).

III.5.11. Allergie

L'idée de l'utilisation de probiotiques dans le traitement des désordres allergiques est basée sur le fait que cette pathologie pourrait être associée à une dysrégulation des réponses lymphocytaires Th1/Th2 vis à vis des antigènes exogènes. Des études ont suggéré que *Lactobacillus rhamnosus* GG pouvait aider à la diminution des symptômes de dermatite atopique chez des enfants allergiques aux protéines du lait de vache et nourris par des hydrolysats de protéines de lait de vache supplémentés en *Lactobacillus rhamnosus* GG ou en *Bifidobacterium lactis* Bb12. La souche *Lactobacillus rhamnosus* GG donnée aux mères atopiques avant la naissance de leur enfant et à l'enfant pendant les 6 premiers mois de vie, conduisait à une nette diminution de la dermatite atopique. La persistance de cet effet

bénéfique a été retrouvée chez ces mêmes enfants à l'âge de quatre ans (Kalliomaki *et al.*, 2003).

L'administration par voie nasale chez la souris de *Lactobacillus plantarum* recombinant exprimant un peptide d'acarien (der p1) résultait en une inhibition de la production d'IFN γ et d'IL5 (activateur d'éosinophiles) chez les animaux sensibilisé à der p 1, suggérant un effet anti-allergique de la bactérie recombinante exprimant l'allergène (Kruisselbrink *et al.*, 2001).

III.5.12. Réduction du taux de cholestérol

Les ferments lactiques seraient capables de diminuer le taux de cholestérol chez l'animal et chez l'Homme, ces ferment aident à maintenir des niveaux sains de cholestérol et de triglycérides, et régissent la biosynthèse des hormones (déconjugaison des sels biliaires) (Rambaud *et al.*, 2004).

*Partie
expérimentale*

*Matériel et
méthodes*

1. Provenance des échantillons

Un total de 58 échantillons de lait a été prélevé à partir des fermes situées dans la région ouest algérienne (Ghriss 18 Km sud de la ville de Mascara, Makdha 33 km sud-est de la ville de Mascara, Oued Taria 35 km sud de la ville de Mascara, Sidi Amar 25 km nord de la ville de Saida et Ain el Manaa 8 km au sud de la ville Saida) (voire carte de situation ci-dessous). Vingt-huit échantillons ont été prélevés de lait de chèvre, 16 de lait de vache et 14 à partir de lait de brebis. Les prélèvements ont été réalisés sur une période de trois ans 2006-2009.

Après lavage à l'eau tiède javellisée des pis des animaux et après élimination des premiers jets, le lait a été recueilli dans des flacons en verre stériles, transportés dans des glacières réfrigérées, puis conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation. Tous les laits ont été analysés dans les 24h.



Sites de prélèvement des échantillons

2. Caractéristiques physicochimiques des échantillons

Les échantillons des différents laits étudiés (lait de vache, lait de chèvre et lait de brebis) ont été mis dans des flacons stériles. Le pH des échantillons a été déterminé en utilisant un pH mètre (HANNA Instruments. pH 211, microprocessor pH meter) où l'électrode a été insérée directement dans chaque échantillon (Owusu-Kwarteng, 2012), l'acidité Dornic a été déterminée en titrant 20 ml de l'échantillon contre NaOH 0.05 mol.l⁻¹, la phénolphthaléine (à 1%) a été utilisée comme indicateur (Afnor 1975).

3. Dénombrement et isolement des bactéries lactiques

Réalisé aux laboratoires pédagogiques de microbiologie de l'université de Saida, Algérie.

10 ml de lait ont été prélevés à partir de chaque échantillon pour la préparation des dilutions décimales en utilisant le TSE (tryptone sel eau) (voir annexe). Le reste de l'échantillon a été divisé en deux parties dans des flacons stériles ; La première a subi une incubation à 30°C pendant 24 heures et la deuxième à 37°C pendant 24 heures aussi.

Pour obtenir des boîtes dénombrables (nombre de colonies compris entre 30 et 300) les dilutions 10⁻⁷, 10⁻⁸ et 10⁻⁹ ont été utilisées dans l'ensemencement.

Le milieu MRS à pH 6,8 a été utilisé pour réaliser le dénombrement de la flore lactique alors qu'un MRS acidifié à pH 5,4 a été employé pour l'isolement des lactobacilles. Pour l'isolement des streptocoques nous avons utilisé le M17 (De Man et al., 1960).

Les colonies ont été comptées pour chaque dilution pour déterminer le nombre d'UFC/ml en utilisant la formule suivante :

$$UFC/ml = \text{nombre de colonies} \times 1/Ve \times 1/D$$

Ve étant le volume d'ensemencement et D étant la dilution prise en compte.

4. Identification des bactéries lactiques isolées

L'identification des isolats a été réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Toutes les techniques d'identification ont été décrites par Larpent (1997).

4.1. Examen macroscopique

Ce test consiste à apprécier la taille des colonies, leur couleur, leur forme (opaques ou translucides) sur boîtes de pétri contenant du M.R.S après incubation à 37°C pendant 24h à 48heures.

4.2. Examen microscopique

Après l'examen macroscopique des colonies sur gélose MRS, et dans le but d'écartier tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram (annexe), celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement.

4.3. Tests physiologiques et biochimiques

4.3.1. Recherche de la catalase

Ce test a été réalisé selon le protocole expérimental décrit par Prescott et al., (2003). La catalase est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester.

4.3.2. Croissance à différentes températures

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation du bouillon MRS par les cultures pures, les tubes sont incubés pendant 24h à 48h aux températures 10°C, 39°C et 45°C, au bout de ce délai, la croissance est appréciée par examen des milieux. Les bactéries mésophiles poussent à 10°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas.

4.3.3. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine. Pour réaliser ce

test, le bouillon Môeller à arginine a été ensemencé par les cultures à tester. Après une incubation à 37°C pendant 24h, la culture dans le milieu de base se manifeste par le virage du milieu au jaune dû au métabolisme du glucose. La dégradation de l'arginine et la libération de l'ammoniac empêchent le virage au jaune.

4.3.4. Production d'acétoïne

Pour réaliser ce test, du lait écrémé stérile (à 9%) a été réparti en tubes. Chaque tube reçoit une culture à tester. Après une incubation à 37°C pendant 24 h et vérification de la coagulation, 5 gouttes des deux réactifs VPI et VPII ont été ajoutés à chaque tube positif, suivi d'une agitation intense. Après un délai de 10 minutes, une coloration rose traduit la formation d'acétylméthylcarbinol. Cette substance se transforme en acétoïne sous l'action de la soude (VPII) et se combine avec l'a-naphtol (VPI) en donnant un complexe rouge. (vérifier coques et/ou bacilles)

4.3.5. Culture sur lait de Sherman

Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène qui est bleu en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit. Chaque culture à tester a été ensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0.1% et à 0.3%.

Après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h, on note les observations relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait. Les lactocoques réduisent le bleu de méthylène avec coagulation, en revanche les streptocoques thermophiles sont sensibles à ce colorant.

4.3.6. Culture sur milieu hypersalé

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les cultures à tester ont été ensemencées sur des bouillons hypersalés à 4% et à 6.5% de NaCl.

Après une incubation à 37°C pendant 24h, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble.

4.3.7. Recherche de la réductase

Le milieu est préparé à partir du lait écrémé stérile préparé lui-même à raison de 12% additionné de teinture du tournesol jusqu'à l'obtention d'une couleur violette, le pH est ajusté à 7.3. L'ensemencement est effectué à partir d'une culture dense de la souche étudiée, suivie d'une incubation à 37°C pendant 3 à 5 jours.

Ce milieu permet d'observer plusieurs types de réaction:

- Attaque du lactose avec acidification (coagulation de la caséine et virage au rouge);
- Attaque de la caséine avec alcalinisation (virage au bleu);
- Peptonisation de la caséine après ou en dehors de toute coagulation (éclaircissement du milieu ou dégradation du coagulant);
- Réduction du colorant (décoloration).

4.3.8. Recherche de type fermentaire

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO₂). Pour se faire, le milieu Gibson-Abdelmalek préalablement fondu, refroidi et solidifié a été ensemencé par les cultures bactériennes par piqûre centrale, puis un bouchon de la gélose blanche stérile a été coulé en surface.

L'incubation est faite à 37°C pendant 7 jours. Le développement d'une bactérie homofermentaire ne provoque pas de discontinuité entre le milieu et le bouchon de la gélose blanche. Le gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire pousse, au contraire, le bouchon de gélose vers le haut du tube.

4.3.9. Recherche de la citratase

Cette enzyme a été mise en évidence par culture sur gélose semi solide au lait citraté. La gélose a été ensemencée en masse et incubée à 37°C pendant 3 à 5 jours. La décomposition du citrate se manifeste par la production de gaz dans la masse du milieu, c'est la première réaction de transformation du citrate en diacétyle et acétoïne.

4.3.10. Test d'hémolyse

Le caractère hémolytique a été recherché par ensemencement en stries de la gélose au sang de cheval. Après incubation pendant une période de 24h à 37°C, le type d'hémolyse a été examiné.

Les streptocoques peuvent être α hémolytiques (couleur verte autour des colonies); β hémolytiques (éclaircissement autour des colonies) ou γ hémolytiques (le milieu n'est pas modifié).

4.3.11. Résistance au tellurite

La tolérance au tellurite a été recherchée par ensemencement, en stries très serrées, la gélose à 0.4% de tellurite de potassium par les souches lactiques à tester. Après une période de 24h d'incubation à 37°C, les souches résistantes donnent des colonies noires.

4.3.12. Profil fermentaire des sucres

Les bactéries Gram positives, catalase et oxydase négatives ont fait l'objet d'une analyse biochimique par le système API bioMérieux en utilisant la galerie API 50CHL medium (bioMérieux, Marcy l'étoile, France). L'ensemencement et la lecture de la galerie ont été réalisés selon les instructions du fabricant. Ils se font de la façon suivante:

- cultiver la souche pure sur milieu MRS gélosé 24h à 30°C,
- ouvrir une ampoule de Suspension medium (2 ml), prélever toutes les colonies de la culture, à l'aide d'un écouvillon, et réaliser une suspension dense dans l'ampoule,
- ouvrir une ampoule de Suspension medium (5ml) et réaliser une opacité égale à 2 McFarland en transférant un certain nombre de gouttes de la première suspension, noter ce nombre de gouttes (n),
- ouvrir une ampoule de API 50 CHL Medium et inoculer avec deux fois le nombre de gouttes trouvées (2n), homogénéiser,
- répartir API 50 CHL ainsi inoculé dans les tubules, et recouvrir avec de l'huile de paraffine stérile,
- incuber à 30°C en aérobiose pendant 48h.

- tous les tests sont lus à 24h et 48h (on recherche dans chaque tubule l'acidification produite qui se traduit par le virage au jaune du pourpre bromocrésol contenu dans le milieu. Pour le test esculine, on observe un virage du pourpre au noir),

- enregistrer les résultats obtenus,

- le profil biochimique ainsi obtenu peut être lu grâce à un logiciel d'identification APILAB (bioMérieux, Marcy l'étoile, France).

5. conservations des souches :

La conservation des souches pures est faite selon deux formules à court et à long terme.

5.1. Conservation à court terme

Les souches purifiées sont conservées au réfrigérateur à 4°C dans la gélose inclinée (MRS) après l'incubation à 28°C pendant 18h afin d'être utilisées pour des études ultérieures durant les quelques mois qui suivent, le renouvellement des cultures se fait par repiquage toutes les 4 semaines.

5.2. Conservation à long terme

La conservation à long terme des souches retenues est réalisée à -20°C dans une solution contenant 70% de lait écrémé (enrichie par 0.5g/l d'extrait de levure et 0.5g/l de glucose) et 30% de glycérol à 40% (Samelis et al, 1994).

6. Recherche du pouvoir inhibiteur

Les souches indicatrices utilisées dans ce travail sont : *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25921, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, et *Enterococcus faecalis* ATCC 51299.

6.1. Méthode directe

Méthode décrite par Fleming et al. (1975), une boîte contenant le milieu MRS à 1,2 % d'agar et 0,2 % de glucose estensemencé par touche d'une culture de bactéries lactiques, l'incubation se fait à 30°C jusqu'à l'obtention de colonies confluentes (environ 48h).

Ensuite, on inocule un tube contenant (10ml) de milieu Mueller Hinton semi –solide (0,7% d'agar et 0,2% de glucose), avec 0,1 ml d'une préculture de la souche test. Après incubation l'activité antibactérienne est déterminée par mesure des diamètres des zones d'inhibitions (halo clair) au tour de la colonie de la souche lactique testée.

6.2. Méthode indirecte

C'est en utilisant la méthode décrite par Barefoot et klaenhammer en 1983. Cette technique consiste de maitre en contacte le surnageant de la souche lactique productrice de la substance antibactérienne avec la souche indicatrice dans un milieu solide.

Des cultures bactériennes jeunes de 18h ont été soumises à une centrifugation à 9000 rpm/10min, ensuite, les surnageants ont été filtrés sur un millipore de 0.22 μm . Les filtrats ainsi obtenus étaient divisés en deux volumes dont le premier est dit surnageant natif, et le deuxième était ajusté à pH 6.5 avec du NaOH (3N).

Les boites de Pétri contenant la gélose Muller Hinton, préalablement coulée et solidifiée, ont été inondées par la souche indicatrice (inoculum standardisé dont la DO660 varie entre 0.08 et 0.1), puis des puits ont été confectionnés de 5mm de diamètre, la base de chaque puit a été bouchée par la même gélose. Chaque puit a reçu 25 μl de surnageant. Après incubation 24h à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

7. Caractérisation de l'agent inhibiteur

7.1. Inhibition due à l'acidité

La multiplication des bactéries lactiques s'accompagne par la production d'acide organique provoquant la diminution du pH intracellulaire et extracellulaire, tandis que la croissance des bactéries pathogènes est interrompue et même arrêtée parfois lorsque le pH intracellulaire atteint un seuil critique caractéristique de chaque espèce ainsi cet acide inhibe la croissance de plusieurs bactéries pathogènes.

Pour la mise en évidence des inhibitions qui sont dues à l'acide lactique produit par *Leuconostoc sp*, un test a été réalisé selon la méthode de Fleming *et al.*, (1975) en utilisant le

milieu MRS à 0,25% de glucose pour minimiser l'acidification. Ce milieu doit être tamponné à pH= 7 avec du tampon phosphate.

En parallèle on utilise comme témoin le milieu MRS non tamponné.

Le milieu tamponné est préparé de la manière suivante :

La solution A : phosphate mono sodique : 13,9 g de NaH_2PO_4 dans 500ml d'eau distillée.

La solution B : phosphate disodique : 26,825 g de Na_2HPO_4 dans 500 ml d'eau distillée.

Au moment de l'emploi, on mélange 41,25 ml de la solution A avec 76,25 ml de la solution B. Ce mélange est utilisé pour préparer 250 ml de milieu de culture.

Pour savoir si les inhibitions sont dues à l'acide produit ou non, on utilise toujours la méthode Fleming et *al.*, (1975) en remplaçant le milieu MRS par un milieu MRS tamponné.

Les résultats sont comparés à un milieu témoin non tamponné.

7.2. Inhibition due au peroxyde d'hydrogène

La croissance de certaines cultures lactiques entraîne la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est considéré comme un inhibiteur de la croissance bactérienne (Juillard et *al.*, 1987).

Le peroxyde d'hydrogène peut être dégradé par l'enzyme catalase présente chez certaines espèces bactériennes. Pour tester l'inhibition due au peroxyde d'hydrogène on réalise toujours la méthode Fleming et *al.*, (1975), sauf que cette fois ci on ajoute dans la gélose semi-solide une goutte de l'enzyme catalase.

En parallèle des milieux sans catalase ont été utilisés comme témoins en suivant la même méthode.

S'il y a absence de zones d'inhibition dans le milieu contenant la catalase cela signifie que l'inhibition est due au peroxyde d'hydrogène.

7.3. Inhibition due aux bactériocines

Le terme bactériocine englobe les peptides et les protéines produites par des gènes bactériens et ayant une activité antimicrobienne bactéricide ou bactériostatique (Garneau et

al., 2002). Sachant qu'elles sont généralement inactivées par des enzymes protéolytiques, on a utilisé pour notre étude deux enzymes de ce type : une protéinase et la pepsine.

- Le test a été réalisé en suivant toujours la méthode de Fleming et *al.*, (1975) sauf que cette fois ci chaque enzyme a été dissoute dans du tampon phosphate de sodium 0.1 M à pH= 7 à une concentration de 10mg/ml.
- Après 24h d'incubation, les bactéries lactiques sont recouvertes avec 8 ml de gélose molle contenant 500 µl d'une culture pathogène (souche indicatrice) préalablement incubée pendant 24h et 400 µl de la solution d'enzyme : protéinase ou pepsine.

La lecture consiste à comparer les inhibitions en présence et absence d'enzymes protéolytiques.

8. Effet bactéricide ou bactériostatique

Pour démontrer si l'effet inhibiteur de nos souches est bactéricide ou bactériostatique on a procédé de deux manières :

- ✓ La première procédure consiste à découper un fragment de gélose dans la zone d'inhibition que l'on met dans un tube contenant 5ml de bouillon nutritif. Après incubation de 24h à 37°C l'apparition de trouble dans le tube permet de déduire que les bactéries pathogènes sont toujours actives et donc l'effet inhibiteur est bactériostatique, mais si le contenu du tube reste clair ceci confirme que l'effet inhibiteur est bactéricide et par conséquent les bactéries pathogènes ont été complètement tuées par les facteurs inhibiteurs.
- ✓ La deuxième méthode consiste à découper de la même manière un fragment de gélose dans la zone d'inhibition mais cette fois il est étalé à la surface d'une boîte de pétri préalablement coulée avec une gélose nutritive. Après incubation de 24h à 37°C, s'il y a croissance bactérienne à la surface cela veut dire que l'effet est bactériostatique, s'il y a absence de germes sur la gélose l'effet est donc bactéricide.

Cette caractérisation a portée seulement sur les cas où l'inhibition est causée par un agent protéique.

9. Effet de temps d'incubation

Pour chaque bactérie une série de 9 tubes contenant 10 ml MRS liquide étaient ensemencées par les souches productrices de bactériocine. L'incubation est réalisée simultanément aux intervalles de temps réguliers suivants : 0-4-8-12-16-20-24-28-32-36 H.

Les cultures de différents temps en milieu MRS liquide étaient soumises à une centrifugation à 4000 tours /1 min pendant 15 min.

Les surnageants étaient récupérés, en suite inoculés dans des boîtes de pétri selon la méthode de diffusion en puits.

10. Thermostabilité de l'agent inhibiteur

La thermostabilité de l'agent inhibiteur a été étudiée suivant la technique de Klaenhammer (1993) et Ammor et al. (2005). Les surnageants sont traités à différentes températures selon les cas suivants :

1. Un chauffage à 80°C pendant 10 min.
2. Un chauffage à 80°C pendant 20 min.
3. Un chauffage à 100°C pendant 15 min.
4. Un chauffage à 100°C pendant 30 min.
5. Un chauffage à 120°C pendant 20 min.

Les surnageants précédents sont inoculés dans des boîtes contenant TDYM et la souche indicatrice (méthode de Barfoot et Klenhammer, 1983).

Incubation a été réalisée à 37°C pendant 24 h et la lecture des résultats a été réalisée par mesure de diamètre des zones d'inhibitions.

1. Les cas où l'inhibition levée désignent la sensibilité de l'agent d'inhibiteur au traitement effectué.
2. Pour les cas où l'inhibition n'a pas été levée désignent la résistance de l'agent d'inhibiteur au traitement effectué.

11. Rep PCR des isolats

11.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été faite suivant le protocole décrit par Gevers et al., 2001. Les solutions et tampons utilisés pour effectuer l'extraction de l'ADN sont listés dans l'annexe.

a- Préparation des cellules :

- mettre en culture les souches pures dans 10 ml de MRS bouillon (laisser croître jusqu'à une DO600 comprise entre 0.4 et 1)
- centrifuger pendant 10 min à 5000 rpm et à 4°C,
- enlever le surnageant et garder le culot à -20°C pendant une heure au minimum,

b- Rinçage :

- décongeler le culot,
- ajouter 1 ml de TES,
- centrifuger pendant 10 min à 5000 rpm et à 4°C,

c- Lyse des cellules :

- ajouter 300 µl de STET
- ajouter 75 µl d'une solution de lysozyme-mutanolysine (3mg lysozyme, 20 µl mutanolysine à 5000 U.ml⁻¹ et 55 µl TES),
- incuber à 37°C pendant 60 min,
- ajouter 40 µl de SDS 20%,
- ajouter une pincée de billes de glace (Sigma ALDRICH, Steinheim, Allemagne),
- Vortexer 60 sec,
- Incuber 10 min à 37 °C et 10 min à 65 °C successivement,

d- Purification de l'ADN :

- ajouter 10 µl de TE,
- ajouter 515 µl d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (Amresco, Ohio, USA). Le mélange doit être dans les proportions de 49/48/1,
- mélanger soigneusement et centrifuger 5 min, 15 000 rpm à température ambiante.

e- Précipitation de l'ADN :

- ajouter 70 µl de NaCl 5M et 1 ml d'isopropanol (Merck, Darmstadt, Allemagne),
- mettre dans la glace pendant 15 minutes au moins
- centrifuger pendant 30 min à 14 000 rpm et à 4 °C

f- Rinçage et séchage de l'ADN :

- ajouter 500 µl d'éthanol (Merck, Darmstadt, Allemagne) à 70%,
- centrifuger à 14 000 rpm pendant 5 min à température ambiante,
- enlever le surnageant et laisser sécher sous vide pendant 15 min

g- Resuspension de l'ADN :

- ajouter TE (50 à 100 µl, cela dépend de l'importance du culot),
- ajouter 1 à 2 µl de ribonucléase (10 mg/ml),
- incuber 10 min à 37 °C,
- mettre à 4 °C pendant une nuit.

Principe

La Rep PCR permet d'obtenir une empreinte génétique de l'ADN d'un microorganisme.

La Rep PCR est une technique PCR basée sur l'amplification de fragments de différente taille à partir de l'ADN d'un microorganisme grâce à la présence des mêmes séquences répétées dans les ADN de tous les microorganismes (bactéries, levures, et champignons). Les fragments amplifiés sont de séquence inconnue. Les fragments PCR sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose. Chaque piste de gel contient l'empreinte génétique d'un ADN sous forme d'un profil électrophorétique.

Mode opératoire

La Rep-PCR a été réalisée comme décrit par Berthier et al. (2001) selon le protocole suivant.

Un mélange réactionnel a été réalisé, contenant 1ng/µl d'ADN, 200 µM de chaque nucléotide(ATP, CTP, GTP et TTP), 1,0 mM de MgCl₂, du tampon 1x (QBiogenEPQBT025),

0,25 μM de chaque amorce REP1-1R-Dt, et REP2-D, ou 0,25 μM de chaque amorce ERIC1R et ERIC2 ((Gevers et al., 2001; Versalovic et al., 1991) ou 0,5 μM de l'amorce (GTG)₅ et 1 U de Taq polymérase(Q-Biogene EPTQA029).

Les amorces ont pour séquence :

REP1-1R-Dt IIINCGNCGNCATCNGGC

REP2-D NCGNCTTATCNGGCCTAC.

ERIC1R ATGTAAGCTCCTGGGGATTCACA

ERIC2 AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

(GTG)₅ GTGGTGGTGGTGGTG.

L'appareil Gene Amp ® 9700 PCR (Applied Biosystem) a été utilisé et programmé pour 30 cycles d'amplification de 1 min à 94 °C (phase de dénaturation de l'ADN), 1 min à 40 °C (phase d'hybridation des amorces sur l'ADN cible), 6 min de montée en température jusqu'à 72 °C, 1 min à 72 °C (phase de synthèse de nouveaux brins d'ADN), précédés de 1 min à 94 °C. L'amplification a duré 6 heures.

La séparation des fragments d'ADN amplifiés a été faite sur gel d'agarose à 1 % (agarose spécifique Seakem GTG) par électrophorèse d'environ 6 h sous une tension de 90 V; en plus des échantillons d'ADN, un marqueur de taille (123 pb et ses multiples) était déposé pour permettre ultérieurement la normalisation ultérieure des gels; sur chaque gel, 12 réactions PCR pouvaient être analysées, sachant que le marqueur de taille était placé dans les premier, huitième et quinzième puits. La coloration des gels a été réalisée dans un bain d'eau osmosée et de bromure d'éthidium (BET, Biorad, 92 430 Marnes La Coquette, France) à 0,2 ‰, et la photographie des gels a été réalisée sous UV. Les profils électrophorétiques ont été normalisés après avoir enlevé le bruit de fond, puis comparés à l'aide du logiciel Bionumerics (Applied Maths, Ghent) après concaténation des empreintes REP1/REP2, ERIC1/ERIC2 et (GTG)₅. Les fragments dont la taille excédait 2460 pb ont été éliminés de la comparaison à cause de leur mauvaise résolution. La similarité entre les empreintes (position et intensité des bandes) a été calculée sous forme du coefficient de corrélation de Pearson; enfin, un dendrogramme a été créé dans lequel les empreintes ont été classées hiérarchiquement en fonction de leur similarité. Les groupes d'empreintes ayant plus de 40 % d'homologie entre elles ont été nommés A1, A2, etc..

Interprétation

Les isolats dont les empreintes ont plus de 40 % d'homologie avec l'empreinte d'une souche de référence sont repérés et peuvent être affiliés présomptivement à l'espèce (sous-espèce dans le cas de *Lc. lactis*) à laquelle appartient la souche de référence. Les empreintes différentes sont vraisemblablement des empreintes de souches différentes. Pour éviter de conclure à la présence erronée de deux empreintes différentes, la similarité indiquée sur le dendrogramme est confirmée par l'inspection visuelle des empreintes. Les empreintes sont déclarées similaires lorsqu'elles présentent les mêmes bandes avec la même intensité relative. Les empreintes différentes à l'intérieur de chaque groupe A sont nommées empreinte 1, 2, etc., révélant les génotypes 1, 2, etc..

11.2. Electrophorèse des produits de la réaction PCR :

Les produits de la réaction (GTG)₅-PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5 % préparé comme suit :

- peser 2.25 g d'agarose,
- ajouter 150 ml de TAE (1X)
- chauffer jusqu'à dissolution complète de l'agarose,
- refroidir à 55 °C et couler la solution dans un moule de 15 cm sur 20 cm contenant un peigne,
- laisser polymériser pendant 30 min minimum,

Puis, on charge les puits du gel avec 8 µl des produits PCR + 1.6 µl du tampon de charge (Promega, USA). Les puits situés au début, au milieu et à la fin du gel sont chargés de 6µl de marqueur de poids moléculaire (200bp) (Promega, USA). L'électrophorèse est effectuée dans du TAE 1X à 47 V et 100 mA pendant 2 h et à 4 °C. Une fois l'électrophorèse terminée, le gel est coloré dans un litre d'une solution de TAE (1X) contenant 100 µl de bromure d'éthidium à une concentration de (1µg/ml) et décoloré dans une solution du TAE (1X) pendant 10 min.

12. Etude des aptitudes probiotiques des souches lactiques

L'étude des caractéristiques probiotiques a été réalisée seulement sur les souches qui ont montré un pouvoir inhibiteur important dû probablement à une bactériocine.

12.1. Tolérance de l'acidité

L'aptitude des souches à résister à l'acidité gastrique a été testée en utilisant la technique décrit par Hydrominus et al. (2000).

Chaque souche lactique a étéensemencée dans un bouillon MRS ajusté à un pH de 2 et 2,5 de l'ordre de 10%. Les tubes ont été incubés à une température de 37°C pendant 2 heures. Un dénombrement de bactéries survivantes a été ensuite réalisé par repiquage sur milieu MRS après une incubation de 48h à 37°C.

Le taux de survie est déterminé par le rapport suivant :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \log \text{UFC } t_{2h} / \log \text{UFC } t_{0h} \times 100$$

12.2. Résistance aux sels biliaires

Pour la détermination de l'aptitude des isolats à tolérer la bile, la méthode décrite par Hydrominus et al. (2000) a été appliquée:

Avant de réaliser ce test, chaque isolat a été préparé en triple par culture sur bouillon MRS. Le culot bactérien des cultures jeunes a été récupéré après centrifugation à 13000 rpm/4min, puis les cellules sont suspendues dans 10ml du bouillon MRS à 0.5 % (p/v) de sels biliaires et ajusté à un pH 8. Les cultures sont ensuite incubées à 37°C et des prélèvements sont réalisés à 0 h, 1 h, 2 h et 3 h et repiquées sur MRS. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48h et la survie se traduit par la croissance des isolats.

12.3. Adhésion in vitro au tissu épithélial

Ce test consiste à étudier la capacité des ferments à effet probiotique de s'adhérer à l'épithélium intestinal et le colon. Pour se faire, la méthode décrite par Lin et Chien. (2007) qui comporte trois étapes, a été impliquée:

- **Préparation des cellules épithéliales:** Avant de mettre en oeuvre le test d'adhésion, un segment de l'iléum ainsi qu'un segment du colon d'un poulet de chair ont été ouvert et laver avec du tampon phosphate salin stérile (PBS pH 7.2), puis tenu dans le PBS à 4°C pendant 30 min pour être laver. Par la suite, les tissus ont été repris, laver 10 fois avec du PBS stérile puis laisser au repos à 4°C pendant 3 h. Les cellules ont été récupérées en grattant la surface tapissant l'intestin par une lame stérile. Des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à 10⁻⁴, cette suspension cellulaire a été examiné par

microscope pour assurer qu'elle n'était pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales est approximativement 5×10^4 cellules/ml.

- **Préparation d'une culture jeune:** Des cultures bactériennes jeunes ont été centrifugées à 6000 rpm/10min et le culot de chaque souche a été récupéré dans 2 ml du PBS suivis d'une observation microscopique (Gx100) pour que le nombre soit approximativement de 10^8 cellules/ml.
- **Réalisation du test :** 1ml de chaque culture est mélangé avec 1ml de la dilution 10^{-4} de la suspension des cellules épithéliales déjà préparée (ou cellules du côlon). Après incubation à 37°C pendant 40 minutes, une préparation de frottis et une coloration au cristal violet 0.5% pendant 5 min a été réalisée pour observer l'adhésion au microscope optique. Le test est considéré comme positif si le nombre de bactéries adhérentes est supérieur à 15.

12.4. Teste d'antibiotique

Nous avons réalisées un ensemencement de notre souche en inondant toute la surface de la gélose Muller Hinton avec 2 ml de culture bactérienne en bouillon. Des disques imprégnés de solution d'antibiotique (12 disques d'antibiotiques) ont disposés en surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile.

Après incubation à 37°C pendant 48h, la sensibilité ou la résistance de souches de bactéries lactiques est évaluée par la présence ou non d'une zone d'inhibition de croissance autour du disque d'antibiotique.

Le résultat a été exprimé comme sensibles (S) ou résistants (R) ou intermédiaire(I) à l'aide de des abaques de lecteur spécifique(Larpen, 1997).

Les antibiotiques utilisés dans ce test sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4: le code et la dose de chaque antibiotique utilisé.

Antibiotique	Code	Dose
Ampicilline	AM	10µg
Ticarcilline	TIC	75µg
P.aeruginosa	PIP	75µg
Céfazoline	CZ	30µg
Cefuroxme-axétil	CXM	10µg
Ciprofloxacine	CIP	5 µg
Colistine	CS	50 µg
Fosfomycine	FOS	50 µg
Pristinamycine	PT	15 µg
Aztréonam	ATM	30µg
Kanamycine	K	30U.I
Ofloxacine	OFX	5µg
Sulfamide	SUL	15µg
Acide nalidixique	NAL	30µg
Streptomycine	STR	50µg
Spiromycine	SPI	15µg
Amoxicilline	AMX	30µg
Tétracycline	TET	50µg
Ticarcilline	TIC	20µg
Néomycine	NE	50µg

13. Analyses statistiques :

Les résultats sont exprimés en Moyennes \pm SEM. L'analyse de la variance est réalisée ; suit à ce test, d'autre test tel que le test « t » de Student est utilisé.

Un $P < 0.05$ est considéré comme significatif.

Résultats et Discussion

1. Caractéristiques physicochimiques des échantillons

L'ensemble des caractéristiques des échantillons utilisés dans cette étude sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Caractéristiques physicochimiques des échantillons

Origine géographique	Espèce animale	Nombre d'échantillons	pH	Acidité (°Dornic)
Ghriss	Vache	03	6,69±0,06	17,22±0,07
	Chèvre	03	6,64±0,02	16,17±2,03
	Brebis	02	6,72±0,03	16,47±1,41
Makdha	Vache	03	6,67±0,07	15,44±1,33
	Chèvre	11	6,69±0,09	16,39±1,02
	Brebis	04	6,69±0,03	16,69±1,11
Oued Taria	Vache	04	6,54±0,06	17,54±0,09
	Chèvre	06	6,65±0,04	16,39±1,32
	Brebis	03	6,70±0,03	16,11±0,91
Sidi Amar	Vache	02	6,62±0,08	16,54±1,45
	Chèvre	05	6,80±0,07	16,68±1,87
	Brebis	03	6,65±0,04	15,23±0,96
Ain el Manaa	Vache	04	6,73±0,03	17,31±0,16
	Chèvre	03	6,63±0,08	16,79±1,44
	Brebis	02	6,71±0,06	15,80±1,81

Les caractéristiques physico-chimiques des échantillons de lait cru sont variables selon les régions et l'espèce de l'animale (tableau 5). Pour tous les échantillons de lait cru analysés, la valeur moyenne du pH se situe entre 6.54 et 6.73 pour le lait de vache, entre 6,63 et 6,80 pour le lait de chèvre et entre 6,65 et 6,72 pour le lait de brebis. L'acidité Dornic varie moyennement entre 15.23°D et 17.54°D avec des valeurs plus élevées dans les échantillons de lait de vache. Les laits de brebis et de chèvre diffèrent l'un et l'autre du lait de vache, mais présentent aussi entre eux des différences notables concernant certains critères. Ils sont de plus en plus appréciés. Le lait de brebis contient nettement plus de matière grasse et de protéines que les deux autres laits, et donc davantage de vitamines liposolubles (A et E). Il présente aussi une teneur relativement élevée en calcium (Gourssand, 1985).

Auldust *et al.*, (1998) ont rapporté que la composition physico-chimique du lait cru dépend essentiellement du stade de lactation, la période de l'année et le régime alimentaire

des vaches. Les échantillons analysés dans cette étude ont été prélevés durant le printemps (Mars – Juin), alors que les animaux étaient à des stades différents de lactation, à partir de 5 régions du nord-ouest d'Algérie. Les variations légères de pH et d'acidité Dornic observées entre les différentes régions peuvent être liées au type d'alimentation donnée aux vaches. On note ici que les régions de Makdha et Sidi Amar sont des zones montagneuses munies de couvert végétal forestier alors que les autres régions sont des terres agricoles et nues. L'alimentation des animaux laitiers utilisés dans cette étude est saisonnière : elle s'effectue en hiver dans les étables (fourrages et complément nutritif à base de protéines). Durant les saisons chaudes, les vaches sont dans les pâturages.

Les différences légères dans les valeurs du pH et de l'acidité entre les laits des trois espèces animales sont dues généralement aux différences dans la composition chimique de ces derniers. En effet Chilliard, (1997), Jaubert (1997) et Morgan *et al.* (2001) ont montré que les variations des paramètres physicochimiques du lait sont dues aux différences dans les teneurs en caséines, en acides gras libres et en sels minéraux.

Les valeurs de pH et de l'acidité Dornic reflètent d'une façon claire la charge microbienne générale du lait ainsi que la qualité hygiénique de ce dernier. En effet une charge microbienne importante diminue l'acidité du lait en transformant le lactose en acide lactique. La qualité microbiologique d'un lait est influencée par plusieurs facteurs. Quelques études menées sur des laits de vache (Michel *et al.*, 2005, Verdier-Metz *et al.*, 2009) ont montré que les équilibres microbiens des laits crus de vache diffèrent selon les exploitations, les conditions d'élevage et de production. Ces auteurs soulignent qu'il est possible d'obtenir des laits non dépourvus de microflore et cependant de bonne qualité sanitaire. Les quelques études menées sur des laits de chèvre portent essentiellement sur la description de microflore dans un nombre restreint d'exploitations, le lien entre conditions de production et flore microbienne des laits est rarement évoqué (Alonso-Calleja *et al.*, 2002., Foschino *et al.*, 2002., Callon *et al.*, 2007).

2. Isolement des bactéries lactiques

2.1. Dénombrement

Les résultats du dénombrement de la microflore lactique des différents laits sont représentés dans la figure 10. L'isolement a été effectué sur le milieu MRS pour les lactobacilles et sur M17 pour les lactocoques.

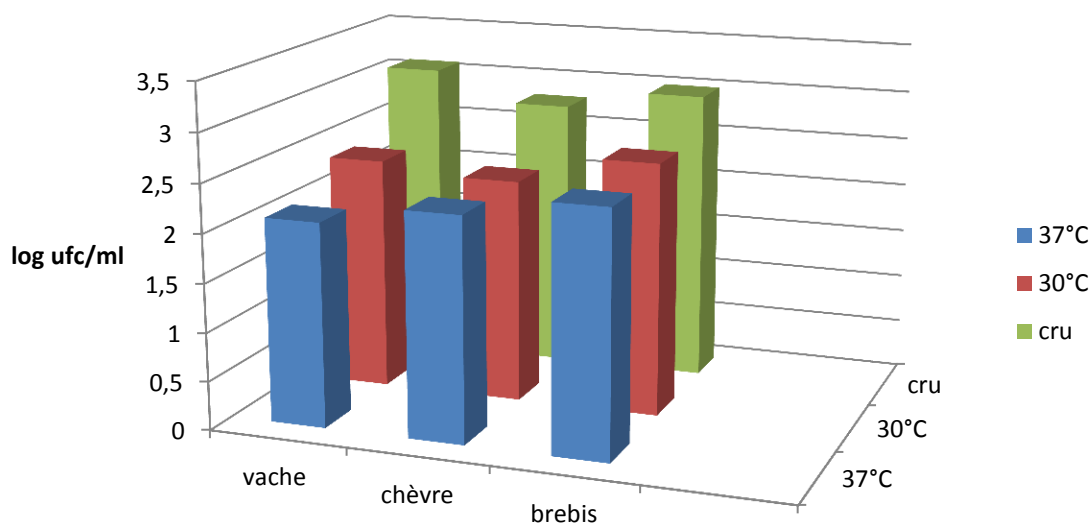


Figure 10 : Flore totale des échantillons de lait de vache chèvre et brebis dénombrée sur le milieu MRS

L'amplitude des variations du nombre moyen de colonies obtenu dans nos échantillons est importante et ceci quel que soit le milieu utilisé et la température d'incubation. Ce nombre est plus important sur les milieux M17 que sur le milieu MRS.

Le nombre le plus important de bactéries concerne le lait de vache avec $3,1 \cdot 10^8$ ufc/ml contre $3 \cdot 10^8$ et $2,1 \cdot 10^8$ ufc/ml dans le lait de brebis et de chèvre respectivement. La faible charge microbienne marquée dans le lait de chèvre a été également remarquée par Desmasures et Gueguen (1996), et Bouton et al (2005). Ces chercheurs ont constaté que les valeurs basses de la flore totale sont dues généralement aux types d'alimentation et à la composition un peu particulière du lait de chèvre. Cependant la charge microbienne la plus faible a été marquée sur le lait de vache quand Kacem et al. (2002) ont réalisé un dénombrement de la flore totale sur milieu M17 et MRS. L'étude effectuée par ces

chercheurs a montré que les échantillons de lait de vache, brebis ou chèvre contiennent moyennement environ $1,7 \cdot 10^7$, $4,6 \cdot 10^8$ et $6,2 \cdot 10^8$ bactéries/ml respectivement. Les faibles valeurs de la flore totale du lait de chèvre sont à l'origine d'une richesse de ce lait en flore d'intérêt technologique (Arnal, 1999 ; Badis *et al.*, 2004 ; Bouton *et al.*, 2005 ; Michel *et al.*, 2005).

Les valeurs obtenues sont en accord avec celles obtenues par Jiwoua et Milliere (1990), qui ont dénombré entre $1 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^8$ ufc/ml de bactéries lactiques sur le milieu MRS à partir des échantillons de lait fermenté à 30°C.

Pour les échantillons des laits fermentés à 30°C, les valeurs obtenues sont très proches avec un taux important dans le lait de chèvre. Le nombre de colonies dénombrées sur le lait fermenté à 37°C a subi une diminution remarquable pour les trois types de lait avec une valeur moyenne importante dans le lait de brebis. Ce taux de bactéries dénombré dans le lait fermenté ne reflète que la flore acido-tolérante.

La réduction marquée sur la charge microbienne des échantillons de lait qui ont subi une incubation de 24 h à 37°C peut être justifiée par l'effet sélectif de cette température sur les microorganismes. Cependant cette température permet un meilleur développement des genres lactiques *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* (Skinnel et Quesnel, 1978).

Selon Beukes *et al.* (2001), Savadogo *et al.* (2004), après le dénombrement et l'isolement des bactéries lactiques à partir de laits fermentés, le nombre étant de 10^9 et 10^8 cfu.ml⁻¹ dépasse largement celui des autres flores de laits fermentés traditionnels en Afrique du Sud et à Burkina Faso respectivement.

Le lait dans les cellules de la mamelle est stérile (Tolle 1980), mais il peut être contaminé à partir de diverses sources (glandes mammaires cas de mammites, peau de la mamelle, moyens de traite, qualité de l'air dans la ferme et les pratiques des éleveurs) ; ce qui explique les différences de nombre des bactéries lactiques dans les différents échantillons analysés entre les différentes fermes ou régions puisque le niveau et les conditions d'hygiène n'étaient pas les mêmes chez tous les éleveurs.

La variabilité de l'incidence des bactéries observée au niveau des fermes pourrait être due au mode de traite des vaches qui est toujours traditionnelle chez ces fermiers. Pendant l'échantillonnage, tous les fermiers traitaient les vaches à la main. Ils différaient par leur manière de préparer les équipements qu'ils utilisaient pour la traite et le niveau d'hygiène. L'ensemble de ces facteurs influence la qualité et la quantité de la charge microbienne du lait comme reporté par Chye *et al.*, (2004) et Lafarge *et al.*, (2004).

2.2. Isolement des bactéries lactiques

Sur 58 échantillons représentant 22 exploitations agricoles et à partir des boîtes contenant un nombre réduit de colonies séparées, 233 isolats à Gram positif, catalase négative ont été retenus selon les critères auxquels répondent les bactéries lactiques et mis au point par Wood et Holzapfel (1995).

L'observation microscopique a révélé deux formes de cellules (Coques et Bâtonnets). Les coques (diplocoques et en chaînette) constituent la flore dominante par rapport à l'effectif total et sont représentées par les genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*. Les formes bâtonnets observées sont représentées par le genre *Lactobacillus*.

Les taux de coques et de bacilles ont été calculés par rapport au nombre total des isolats. La figure 11 représente les pourcentages globaux de coques et de bâtonnets lactiques isolés.

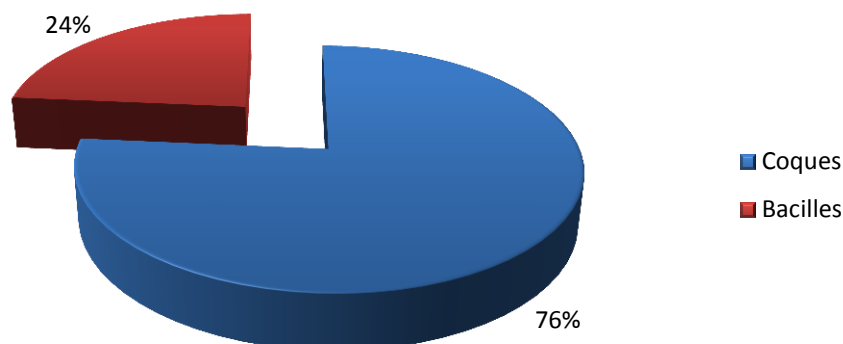


Figure 11 : taux de coques et de bacilles dans les 233 bactéries lactiques isolées.

Cette figure montre la différence majeure entre le nombre de coques et de bacilles isolés de l'ensemble des laits. Ce taux de coques élevé est observé quel que soit le type de lait (cru ou fermenté) et quel que soit la race animale. Une légère différence a été remarquée sur la microflore lactique des laits fermentés où un taux de lactobacilles un peu plus important est obtenu (Figure 12).

Des résultats similaires ont été obtenus par Bekhouche (2006) avec un taux de Coques de 80,3% contre 19,7% de bâtonnets. La dominance des coques dans la flore lactique obtenue à partir de nos échantillons est due à deux facteurs, le premier est le taux élevé des coques naturellement présents dans le lait et le deuxième c'est les milieux de culture utilisés dans notre étude.

Le milieu M17 s'avère le plus sélectif pour la croissance de bactéries lactiques par rapport au MRS. En effet nous avons obtenus un nombre très limité de colonies sur le milieu MRS. Cependant Le milieu MRS (De Man *et al.*, 1960), est un milieu complexe et très riche, il est couramment utilisé pour cultiver les bactéries lactiques auxotrophes. Cependant, ce milieu contient des sources en osmoprotectants (extraits de levure, extraits de viande, peptones) pouvant minimiser l'impact des stress, notamment celui du stress salin (Baliarda, 2003).

Il faut noter que ces résultats obtenus par des méthodes conventionnelles ne sont représentatifs que de la flore cultivable. Or, il a été estimé que dans certains écosystèmes, moins de 1% des micro-organismes sont cultivables (Amann *et al.*, 1995). Le passage par une étape de culture engendre donc la non détection des bactéries viables mais non cultivables et des bactéries qui pourraient être cultivées si un milieu plus approprié était disponible.

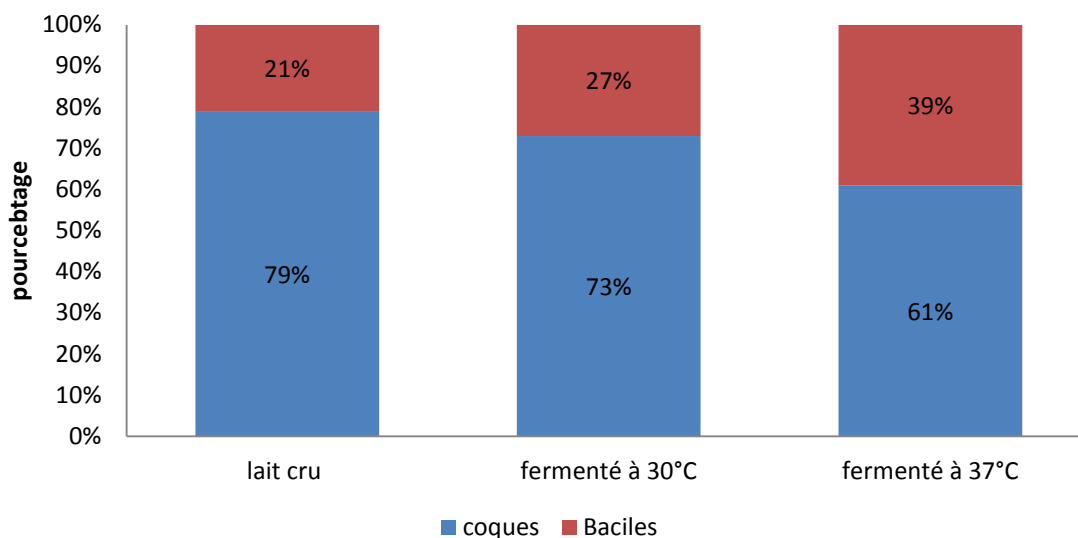


Figure 12 : répartition des isolats lactiques en coques et de bacilles en fonction de la température d'incubation

Les bacilles ont représentées 39% du nombre total de bactéries lactiques isolées à partir des échantillons de lait fermenté à 37°C pendant 24h. L'incubation des échantillons de lait 24h à 30°C a donné un nombre de bacilles moins important. Ils représentent 27% de la flore lactique isolée pour ce type d'échantillon. Le taux de bacilles obtenus à partir du lait cru de différentes espèces animales reste le plus faible par rapport aux laits fermentés, il représente 23% seulement de de la totalité des isolats lactiques. La température d'incubation de 37°C, utilisé pour la fermentation des échantillons avant de réaliser l'isolement, a montré un effet significatif ($P < 0,05$) dans la sélection de la microflore lactique.

La répartition des laits de différentes espèces animales en coque et bacilles est représentée dans la figure 13. Le lait de chèvre apparait le plus riche en bacilles (29%) par rapport aux laits de vache et de brebis (18%) avec une différence significative ($p = 0,02$). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Badis *et al.* (2004) qui ont isolé et caractérisé phénotypiquement la flore lactique à partir de lait de chèvre des deux races caprines algériennes (*Kabyle et Arabia*). Le taux de coques isolés par ces auteurs et représenté par les lactocoques, leuconostocs, Pediocoques et streptocoques a dépassé 73% de la population lactique isolée contre 26,28% lactobacilles.

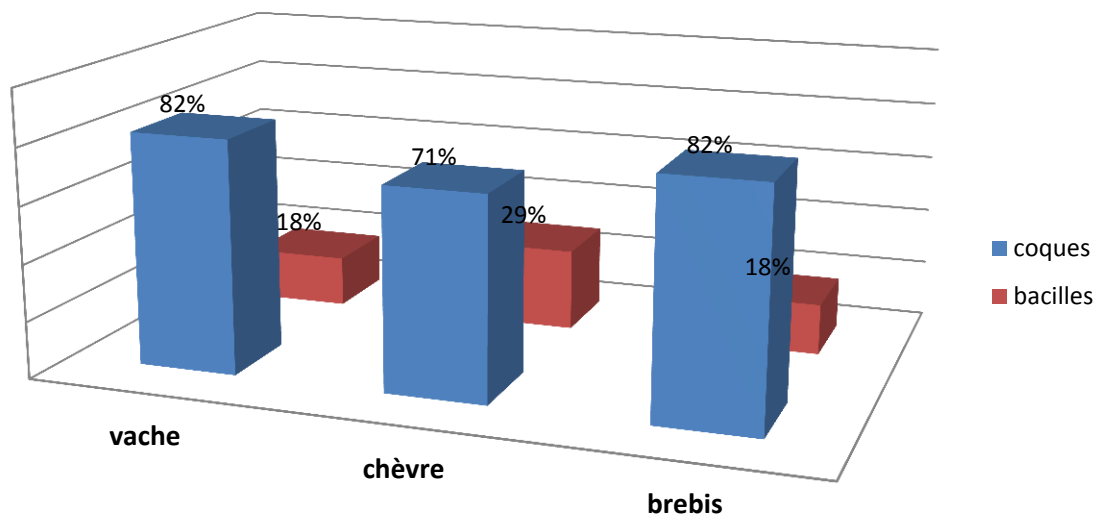


Figure 13 : Taux de coques et de bacilles de laits de différentes espèces animales.

La première sélection révèle la présence de 172 souches à forme sphérique (cocci) et 51 souches à forme bacillaire appartenant aux groupes (genres) suivants: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, lactobacilles du groupe A, lactobacilles du groupe B et lactobacilles du groupe C. Sur un total de 233 isolats, 92 sont isolés à partir du lait de chèvre soit 39,48%, 89 isolés à partir du lait de vache avec un pourcentage de 38,2% et 52, 32% du nombre total d'isolats lactiques.

L'identification phénotypique basée sur les caractéristiques physiologiques et les différents tests biochimiques regroupés dans les galeries API20 nous a orienté vers la détermination des genres lactiques auxquels appartiennent nos isolats. La figure 14 présente les différents genres identifiés à partir de chaque type de lait avec leurs pourcentages.

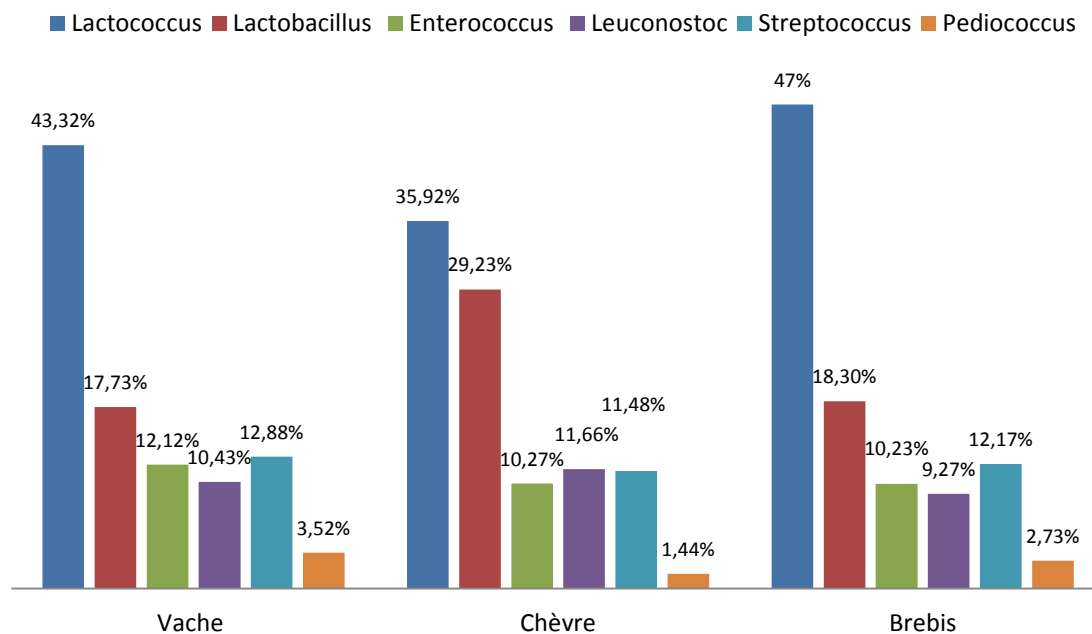


Figure 14 : taux de différents genres lactiques isolés à partir de trois types de lait.

La répartition des genres dans les trois types de lait utilisés dans cette étude montre que le genre *Lactococcus* est nettement prédominant (43,32% dans le lait de vache, 35,92% dans le lait de chèvre et 47% dans le lait de brebis). En deuxième lieu on trouve les bactéries du genre *Lactobacillus* avec un taux important dans le lait de chèvre (29,23%) et avec des taux presque similaires dans le lait de vache et de brebis (17,73% et 18,30% respectivement). Les *Enterococcus* arrivent en troisième place dans le lait de vache et de chèvre (12,12% et 10,23% respectivement), alors qu'ils sont précédés par les *Leuconostoc* dans le lait de chèvre mais avec un taux similaire aux autres espèces animales (10,27%). Les taux des *Leuconostoc* restent très proches dans les trois types de lait avec 10,43% dans le lait de vache, 11,66% dans le lait de chèvre et 9,27% dans le lait de brebis. Le genre *Streptococcus* est présent dans nos échantillons avec des taux allant de 11,48% (lait de chèvre) à 12,88% (lait de vache) avec un taux de 12,17% marqué dans le lait de brebis. Le taux le plus faible est remarqué sur le genre *Pediococcus* et ceci quel que soit le type de lait avec la valeur la plus faible dans le lait de chèvre (1,44%).

Les mêmes genres lactiques ont été identifiés par Saïdi (1998) et Kacem (2003) à partir de laits crus de vaches produites dans la région de l'ouest algérien et par Zadi-Karam (1998) dans le lait de chamelle.

De proches résultats ont été rapportés par Saidi *et al.* (2002), dans la caractérisation de 206 isolats de BL à partir de lait cru de la population caprine des régions arides, où ils ont montré une nette dominance des lactocoques (76.16%), Streptocoques (14.78%), leuconostocs (8.6%) et de l'espèce *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Ainsi, Bekhouche *et al.* (1998), dans l'isolement de BL à partir de lait de vache dans l'est algérien où ils ont montré une distribution hétérogène avec une grande fréquence de *Leuconostoc*, suivi de *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Streptococcus*.

Badis *et al.* (2004) ont isolés les mêmes genres lactiques à partir du lait de chèvre des deux races caprines algériennes (*Kabyle* et *Arabia*) dans la région du centre algérien. Ces auteurs ont montré que le genre *Lactobacillus* est le prédominant dans la population Kabyle (61.48%); suivi de, *Lactococcus* (22.9%), *Streptococcus* (8.88%), *Leuconostoc* (5.92%) et de loin de *Pediococcus* (0.74 %), alors que les deux genres *Leuconostoc* et *Lactococcus* sont représentés de façon presque similaire dans la population Arabia (32.64 % et 31.02 % respectivement), ainsi que *Lactobacillus* (15.27 %), *Streptococcus* (14.82 %) et *Pediococcus* avec une faible représentation (6.25 %).

Guessas et Kihal (2004), ont identifié les bactéries lactiques du lait de chèvre des zones arides et ont constaté une prédominance des coques par rapport aux bacilles où *Lactococcus sp* présentait le pourcentage le plus élevé (76.16%), suivi de *Streptococcus* (14.78%) et de *Leuconostoc* (8.6%).

Afin de vérifier l'effet de la fermentation sur la diversité quantitative et qualitative de microflore lactique, nous avons fait une répartition des genres isolés selon l'origine (Figure 15)

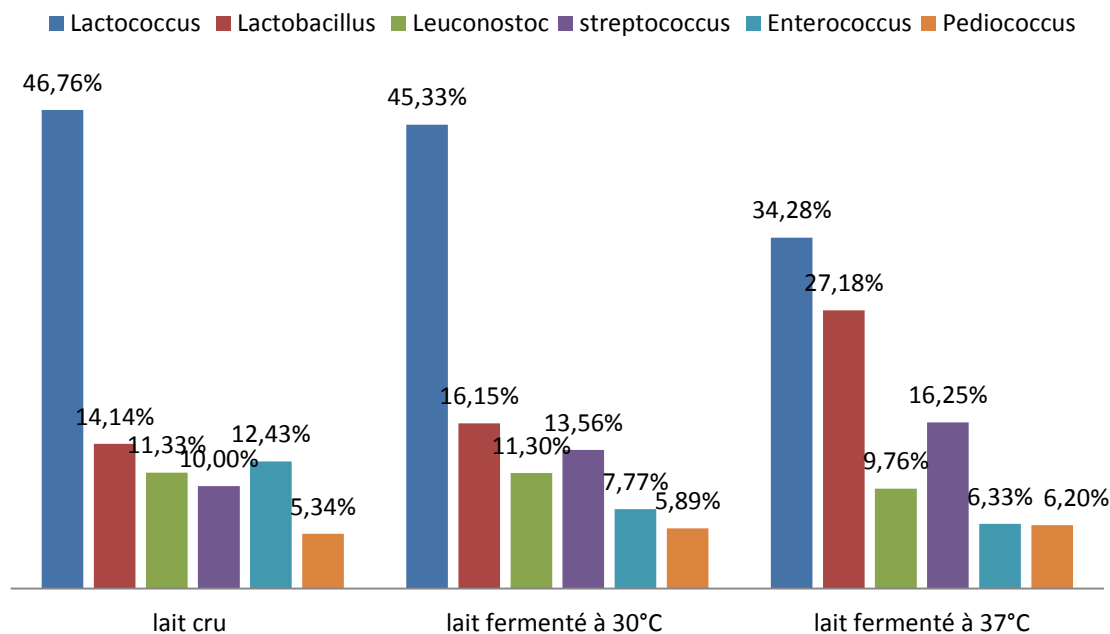


Figure 15 : taux des différents genres en fonction du mode d'incubation des échantillons

Les résultats regroupés dans la figure 15 montrent nettement la prédominance du genre *Lactococcus* dans les trois types d'échantillons avec des taux presque similaires dans le lait cru et le lait fermenté à 30°C (46,76% et 45,33% respectivement). Ce genre reste le prédominant dans le lait incubé à 37°C mais avec un taux significativement ($p < 0,05$) plus faible que les autres laits (34,28%). Au contraire des *Lactocoques* les *Lactobacilles* ont connues une augmentation significative dans le lait fermenté à 37°C (27,18%) par rapport au lait cru et même par rapport au lait fermenté à 30°C. Sous l'effet d'une fermentation des échantillons à 30°C pendant 24 h le taux des *Lactobacillus* subit une augmentation qui reste non significative (de 14,14% à 16,15%). Le taux de présence du genre *Leuconostoc* n'a connu qu'une légère diminution sous l'effet de l'acidification et/ou la température d'incubation, son taux dans le lait cru était de l'ordre 11,33% et 11,30% dans le lait fermenté à 30°C avec une légère chute dans le lait fermenté à 37°C (9,76%). Les entérocoques lactiques ont connu une réduction significative sous l'effet de l'acidification du lait à 30°C ainsi que sous l'effet de la température de 37°C (12,43%, 7,77% et 6,33% respectivement).

Le taux des *Pediococcus* reste le plus faible dans les trois types de lait et il n'a connu qu'une légère variation sous traitement des échantillons. Ce taux est passé de 5,34 % dans le lait cru à 5,89 % dans le lait fermenté 24h à 30°C puis à un taux de 6,20 % dans les échantillons de lait fermentés à 37°C pendant 24h.

L'augmentation des taux des lactobacilles et des streptocoques dans les échantillons du lait fermentés à 37°C accompagnée par la diminution du taux des lactocoques est due principalement à l'effet sélectif de cette température sur la flore lactique (Schillinger et Luke, 1989). Les lactobacilles sont connus par leur croissance favorable à des faibles pH (Kandler and Weiss, 1986).

Cette compétitivité a été observée par Bensoltane et al, (2004) où les lactobacilles ont représenté 32% de la flore lactique isolée à partir de différents produits fermentés. Cheriguene *et al.* (2006) ont isolés à partir de lait cru de chèvre un taux de lactobacilles de l'ordre de 28% de la flore lactique.

Selon Cogan *et al.*, (1997), Les bactéries lactiques qui constituent les ferments utilisés pour la fabrication de différentes variétés de fromage ont une température optimale de croissance proche de 30°C et comprennent toujours des souches de *L. cremoris* et de *L. lactis*. A ces souches peuvent s'ajouter *L. diacetylactis* ou *Leuconostoc*, bactéries dites aromatisantes de par leur synthèse de diacétyle. Ainsi un ferment DL est un ferment composé d'un mélange de *L. cremoris*, *L. lactis*, *L. diacetylactis* et de *Leuconostoc*. Certaines cultures (lactobacilles, *Streptococcus thermophilus*) sont appelées thermophiles dans le secteur laitier car leur température optimale de croissance se situe entre 37 et 47°C.

3. Identification des isolats lactiques

3.1. Caractérisation macroscopique

Sur milieu MRS solide et après 72h d'incubation à 30°C, des colonies répondant aux critères des bactéries lactiques ont été observé sur les boîtes (figure16). Ce sont des petites colonies de 1mm de diamètre environ, de forme lenticulaire, de couleur blanchâtre ou laiteuse, avec une surface lisse et un pourtour circulaire régulier.

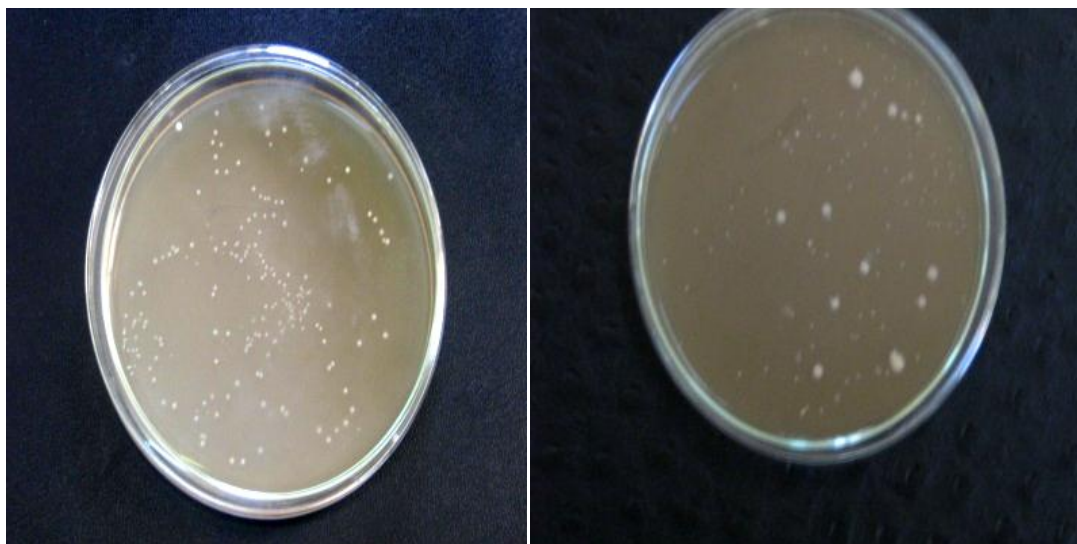


Figure 16: aspect macroscopique des isolats sur milieu MRS après 48h d'incubation à 30°C.



Figure 17 : Aspect des cultures pures des bactéries lactiques sur milieu MRS liquide

3.2. Purification

Pour obtenir des isolats purs nous avons procédé à des repiquages en stries par la méthode des quadrants sur milieu MRS solide (figure18)



Figure18 : résultats de purification d'un isolat par la méthode des quadrants

3.3. Observation microscopique :

L'observation microscopique après coloration de Gram montre que les bactéries sont à Gram positif, et se présentent sous forme des coques et des bacilles isolées, en amas, en paires ou en chainettes.

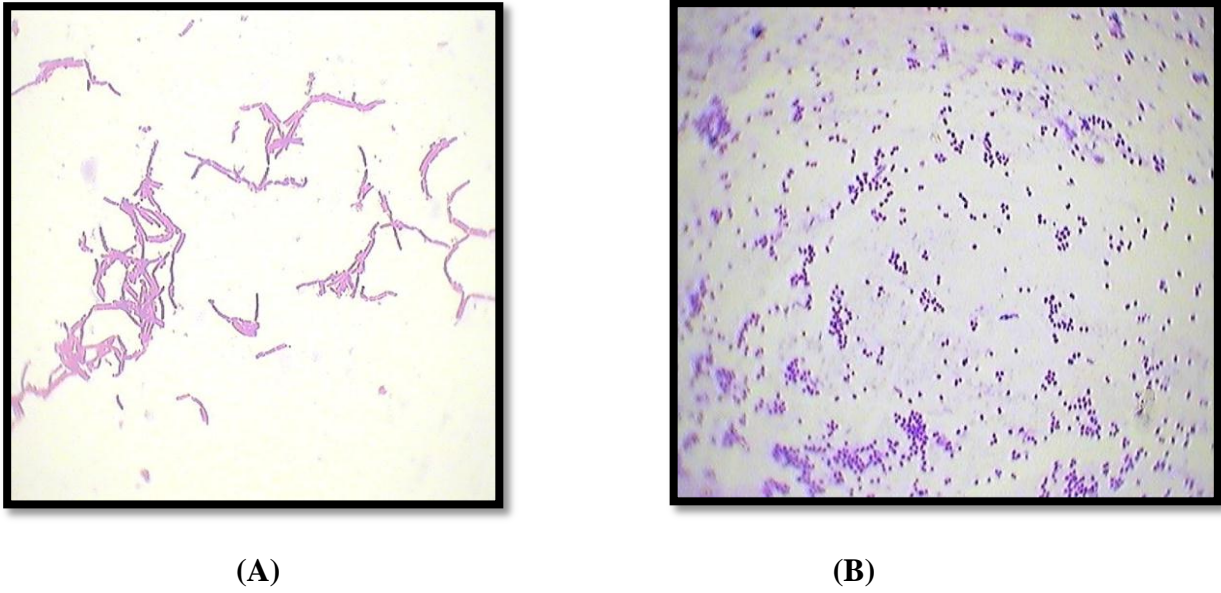


Figure 19: aspect microscopique de quelques isolats A : isolat V17 (bacille), B isolat V3 (coque)

3.4 Résultats des tests physiologiques et biochimiques

Les 68 isolats qui ont montré un effet inhibiteur contre aux moins une souche pathogènes ont subi des tests physiologiques et biochimiques pour une pré-identification. Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des isolats sont présentées dans le tableau 06. Ces résultats nous ont permet de déterminer à quel groupe lactique appartiennent nos isolats et parfois ils nous ont rapproché vers l'identité finale de nos souches.

Tableau 6 : profil physiologique et biochimique des isolats actifs

Caractéristiques																			
	Isolats	Gram	Forme	Catalase	Croissance à 10°C	Croissance à 37°C	Croissance à 45°C	Type fermentaire	Croissance à 4% Na Cl	Croissance à 6,5% Na Cl	ADH	Acétoïne	Lait de Sharman 0,1%	Lait de Shareman 0,23%	Réductase	Citratase	Hémolyse	Résistance aux tellurites	Croissance à pH 6,5
V3	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
V7	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
V11	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	-	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
V12	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
V15	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
V17	+	Bac	-	+	+	-	He	ND	ND	-	-	R/C	R	+	-	γ	-	+	-
C19	+	Coc	-	+	+	-	He	+	-	-	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
C21	+	Bac	-	+	+	+	Ho	ND	ND	-	-	C	C	-	-	γ	-	+	-
C23	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
C24	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
C26	+	Bac	-	+	+	-	Ho	ND	ND	-	-	R/C	R	+	-	γ	-	+	-
B28	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	-	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
B30	+	Coc	-	-	+	+	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	-	γ	-	+	-
B35	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
V36	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	-	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
V40	+	Coc	-	+	+	-	He	+	-	-	-	R/C	R/C	-	+	γ	-	+	-
V41	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
V42	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	-	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
C44	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	-	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
C45	+	Coc	-	-	+	+	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	-	γ	-	+	-
C53	+	Bac	-	+	+	+	Ho	ND	ND	-	-	C	C	-	-	γ	-	+	-
C58	+	Coc	-	-	+	+	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	-	γ	-	+	-
C63	+	Coc	-	+	+	-	He	+	-	-	-	R/C	R/C	-	+	γ	-	+	-
C66	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
B69	+	Bac	-	+	+	-	Ho	ND	ND	-	-	R/C	R	-	-	γ	-	+	-
B79	+	Bac	-	+	+	+	Ho	ND	ND	-	-	C	C	-	-	γ	-	+	-
B80	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
V83	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
V87	+	Coc	-	-	+	+	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	-	γ	-	+	-
V90	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
V97	+	Coc	-	-	+	+	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	-	γ	-	+	-
V104	+	Coc	-	+	+	-	He	+	-	-	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
C117	+	Bac	-	+	+	-	He	ND	ND	-	-	R/C	R	+	-	γ	-	+	-
C120	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-

+: test positif ; -: test négatif ; v : variable ; Coc : cocci ; Bac : bacille ; Ho : homofermentaire ; He: hétérofermentaire ; R : réduction ; C : coagulation.

Tableau 6 (Suite) : profil physiologique et biochimique des isolats actifs

Caractéristiques																			
	Isolats	Gram	Forme	Catalase	Croissance à 10°C	Croissance à 37°C	Croissance à 45°C	Type fermentaire	Croissance à 4% Na Cl	Croissance à 6,5% Na Cl	ADH	Acétoïne	Lait de Sharman 0,1%	Lait de Shareman 0,3%	Réductase	Citratase	Hémolyse	Résistance aux tellurites	Croissance à pH 6,5
C123	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
C124	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
C129	+	Bac	-	+	+	-	He	ND	ND	-	-	R/C	R	+	-	γ	-	+	-
C131	+	Coc	-	+	+	-	He	+	-	-	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
B133	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
B135	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
B139	+	Bac	-	+	+	+	Ho	ND	ND	-	-	C	C	-	-	γ	-	+	-
V150	+	Coc	-	+	+	-	He	+	-	-	-	R/C	R/C	-	+	γ	-	+	-
V154	+	Bac	-	+	+	-	Ho	ND	ND	-	-	R/C	R	-	-	γ	-	+	-
V160	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
V165	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
C168	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	-	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
C169	+	Coc	-	-	+	+	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	-	γ	-	+	-
C172	+	Coc	-	+	+	-	He	+	-	-	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
C174	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
C175	+	Bac	-	+	+	-	He	ND	ND	-	-	R/C	R	+	-	γ	-	+	-
C177	+	Bac	-	+	+	+	Ho	ND	ND	-	-	C	C	-	-	γ	-	+	-
C181	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
C182	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
B184	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
B187	+	Coc	-	+	+	-	He	+	-	-	-	R/C	R/C	-	+	γ	-	+	-
V198	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
V200	+	Coc	-	+	+	-	He	+	-	-	-	R/C	R/C	-	+	γ	-	+	-
V207	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
V213	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
C215	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
C217	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
C219	+	Bac	-	+	+	-	He	ND	ND	-	-	R/C	R	+	-	γ	-	+	-
C220	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
C221	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
B224	+	Bac	-	+	+	-	Ho	ND	ND	-	-	R/C	R	+	-	γ	-	+	-
B226	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-
B229	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	+	-	R/C	R/C	-	-	γ	-	+	-
B230	+	Coc	-	+	+	-	Ho	+	-	-	-	R/C	R	-	V	γ	-	+	-

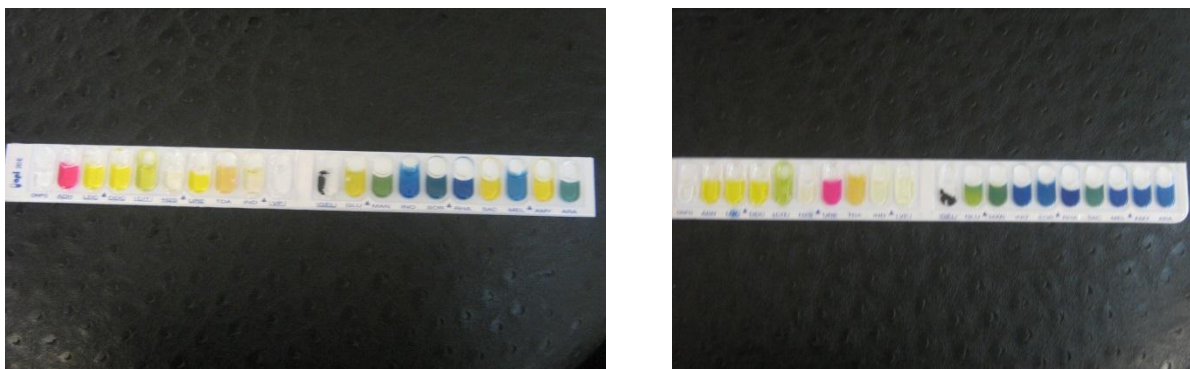
+: test positif ; -: test négatif ; v : variable ; Coc : cocci ; Bac : bacille ; Ho : homofermentaire ; He: hétérofermentaire ; R : réduction ; C : coagulation.

L'analyse de ces résultats a montré que tous les isolats se sont avérés à Gram positif et catalase négative ce qui est caractéristique des bactéries lactiques. Les différents tests vont nous diriger en premier vers le genre et ensuite vers l'espèce et dans certains cas la sous espèce et même le biovar (cas de *Lactococcus subsp.lactis biovar.diacétylactis*).

Parmi les coques retenues, soixante-deux ont montré une capacité à croître à 10°C et 37°C mais pas à 45°C, pourvu d'un caractère homofermentaire et présentant une γ hémolyse. Ils peuvent se développer : à pH6.5, sur lait de Sherman 0.1% et 0.3%, ainsi que dans un bouillon hyersalé à 4%.

L'identification des souches isolées a été achevée par l'étude du profil fermentaire à l'aide des Galerie classiques (API 20) (figure20). Les résultats obtenus pour les différentes souches sont regroupés dans l'annexe ; le virage de l'indicateur (BCP) au jaune révèle la fermentation des sucres ce qui permet d'établir le profil fermentaire d'une souche. on peut observer que certains isolats dégradent lentement certains substrats, car le virage de l'indicateur n'est pas clair au bout de 24h d'incubation ce qui nous a conduit à prolonger l'incubation jusqu'à 48h ; cette prolongation a conduit au virage de l'indicateur au jaune pour les sucre : Glucose, Saccharose et mannitol mais il était faiblement remarqué pour les sucres : Rhamnose, Inositol , Mélibiose , Arabinose, Sorbitol, Amygladine.

L'hydrolyse de l'arginine est un caractère important. Ce test est employé principalement pour les espèces de lactocoques ou de lactobacilles, il permet la détection et la présence de l'ammoniaque libre qui se traduit par une couleur rouge/orangé. (Schillinger et lücke, 1987).



(A)

(B)

Figure 20 : résultats de l'identification par API 20 de deux isolats C44 (A) et B69 (B)

La totalité de ces souches présentent une sensibilité vis-à-vis des tellurite et d'azide de sodium. D'après ces caractéristiques, et en se basant sur le test de l'ADH, l'actéoïne et le profil fermentaire des sucres, nous les avons subdivisé en espèces et sous espèces du genre *Lactococcus* : huit isolats de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (V7, V11, V36, C44, C124, V160, B226, B230) n'hydrolysent pas l'arginine (ADH-), Onze isolats de *Lc. lactis* ssp. *lactis*(V3, C24, V41, V90, C123, B133, V165, B184, V198, C221, B229) sont ADH+ et actéoïne-,

En comparant le profil des sucres, nous remarquons qu'une même espèce de bactéries lactiques peut présenter des biotypes différents. Les souches de *Lactococcus* ont pu fermenter le glucose, le galactose, le lactose, le tréhalose et le cellobiose, mais la production d'acide à partir du xylose, d'adonitol, du tergitol et de l'inositol a été négative. Quelques souches fermentent différemment certains sucres à savoir l'arabinose, le raffinose, le sorbose et le saccharose. En effet les 6 isolats (C23, B35, B182, V213, V215 et C217) sont identifiés comme étant des *Lactococcus lactis* subsp *diaetylactis*.

Dans d'autres travaux, il a été trouvé que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* est plus fréquemment isolée à partir d'échantillons de lait cru (Moreno et Busani, 1990), de fromages fabriqués à base de lait cru (Centeno et al., 1996), du Raib (Hamama, 1992) et à partir de Dahi et d'échantillons de beurre dans l'Inde (Padmanabha-Reddy et al., 1994).

Selon Holler et Steele (1995), *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, n'a été isolée que rarement à partir de sources naturelles. Dans d'autres travaux, Crow et al. (1993) et Weerkamp et al. (1996), ont affirmé que les lactococci isolés à partir de sources naturelles ont été souvent des *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, alors que le phénotype *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, qui est commun dans les cultures industrielles à ferments mixtes, n'a été isolé que rarement. L'habitat naturel de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* reste incertain (Salama et al., 1995).

D'autre part, il a été trouvé que ces espèces sont fréquemment isolées à partir du lait cru et produits laitiers (Tsakalidou et al., 1994).

Les six isolats codés B30, C45, C58, V87, V97 et C169 identifiées comme étant *Streptococcus thermophilus* sont caractérisées par leur capacité à croître à 45°C mais pas à 10°C, n'hydrolysant pas l'arginine et ne produisant pas l'actéoïne. Ce sont des bactéries homofermentaires, non hémolytiques, sensibles plus ou moins aux colorants et au tellurite. Ces espèces fermentent le glucose, le galactose, le lactose, le mannose, le cellobiose, et à

moindre degré, le raffinose, l'arabinose, la dextrine, le saccharose et le sorbose. Elles sont incapables de dégrader le xylose, l'adonitol, l'inositol et le tergitol.

Les 10 isolats caractérisés de mésophiles et hétérofermentaires ont été rattachés au genre *Leuconostoc*. Ces souches sont capables de se développer à pH 6.5 et en milieu hypersalé à 4% et n'hydrolysent pas l'arginine (Hardie et Whiley, 1995). Six d'entre eux sont considérés comme *Leuconostoc mesenteroides* (V40, C63, V150, C181, B187 et V200) et les quatre autres isolats (C19, V104, B131 et C172) sont identifiés comme étant des *Leuconostoc lactis*.

Les isolats de lactobacillus homofermentaire groupe I fermentent les hexoses en produisant exclusivement du lactate et ne produisent pas de gaz à partir du glucose. Ils peuvent aussi fermenter les pentoses (Klein, 2001). Ces lactobacilles se développent à la température de 15°C mais pas à 45°C. Il y a quelques exceptions, *Lactobacillus Fermentum* est capable de pousser à 45°C. La capacité de fermenter le mannitol dissocie les lactobacilles homofermentaires groupe I en deux groupes principaux.

Le groupe mannitol positif renferme les espèces : *Lb. Plantarum*, *Lb. Casei sbsp. Casei*, *Lb. Casei subsp. rhamnosus* et *Lb. Casei sbsp. pseudoplantarum*. Le groupe mannitol négatif comprend : *Lb. bavaricus*, *Lb. sake*, *Lb. curvatus*, et *Lb. casei subsp. tolerans*. Les isolats hétérofermentaire de *Lactobacillus groupe III* fermentent les hexoses en lactate, en acétate et /ou en éthanol et CO₂. *Lb. brevis* ainsi que *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum* et *Lb. parabuchneri* ont été isolés du lait et des produits laitiers (Dellaglio et al, 1994).

Les espèces de Lactobacilles hétérofermentaires, isolées dans les viandes sont incapables de croître sur milieu acétate, ont été introduites dans le Genre *Carnobactérium* (Collins et al, 1987).

En se basant sur ces critères, nos isolats de lactobacillus sont identifiées comme étant des *Lactobacillus plantarum* 4 isolats (C53, B69, V154 et C175), *Lactobacillus casei* 3 isolats (V17, B79 et C117), *Lactobacillus brevis* 2 isolats (C21 et B224), *Lactobacillus sake* 2 isolats (C129 et C219), *Lactobacillus rhamnosus* 1 isolat (C177), *Lactobacillus fermentum* (C26) et *Lactobacillus bavaricus* (B139).

Les figures 21 et 22 représentent les pourcentages de répartition de nos isolats actifs en genres et en espèces en se basant sur les différents critères physiologiques et biochimiques.

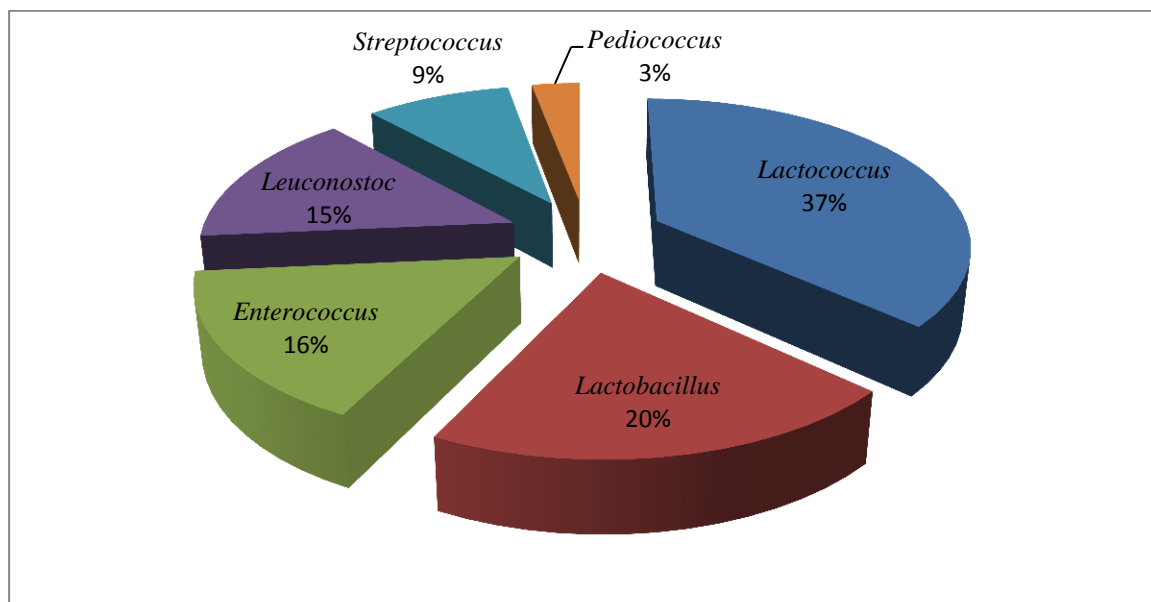


Figure 21 : Répartition des 68 isolats lactiques actifs en genres

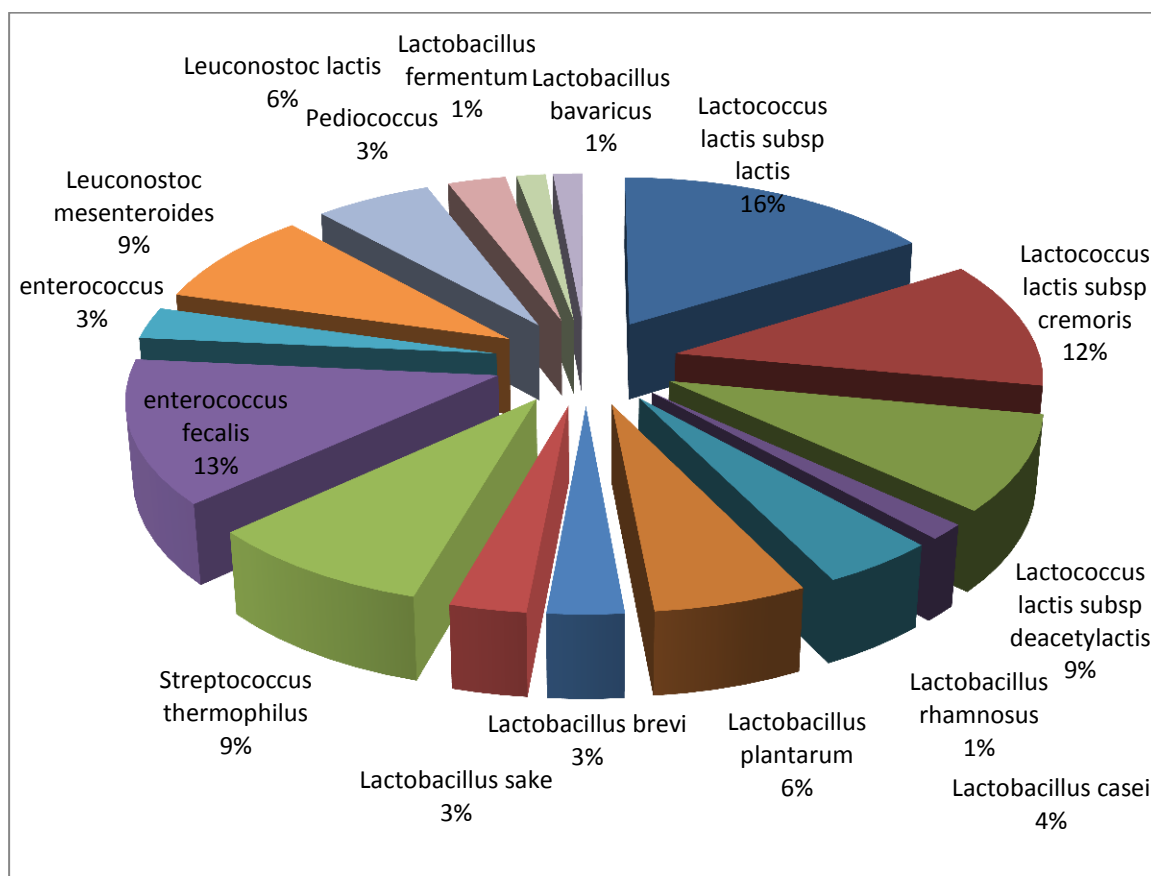


Figure 22 : Répartition des 68 isolats lactiques actifs en espèces

Parmi la flore lactique active identifiée, le genre *Enterococcus* paraît prédominant dans nos échantillons avec 11 isolats. Les entérocoques poussent dans les conditions hostiles, NaCl à 6.5% et à des températures différentes (10°C et 45°C). Tous les isolats d'entérocoques ont utilisé le galactose ; seuls les isolats appartenant à l'espèce *Enterococcus faecalis* ont utilisé l'arginine.

Sept isolats appartiennent à l'espèce *Enterococcus faecium* (V15, B28, C66, B83, C120, V168 et C220) suivis par *Enterococcus faecalis* avec quatre isolats (B80, B135, C174 et V207).

Les *Enterococci* ont également été isolés par d'autres auteurs. En effet, Prodromou et al., (2001) ont démontré que 60% des souches isolées à partir de "Orinotyri" un fromage fabriqué à partir du lait de brebis en Grèce étaient des enterocoques.

Les pédiocoques ne représentent qu'une très faible proportion dans notre collection qui ne compte que deux espèces *Pediococcus pentosaceus*. Il s'agit des isolats (V12 et V42). Ce genre n'est pas souvent isolé à partir du lait et des produits laitiers, par contre, il a été souvent isolé à partir de la bière, du vin, des produits végétaux (ensilages) et des saumures (anchois salés) (Garvie; 1986).

Les bactéries des genres *Leuconostoc* et de *Pediococcus* sont rarement retrouvées dominantes dans la flore lactique comme rapporté par Hitchener *et al.* Cette diversité, en relation avec la composition du lait cru de chaque variété de chèvre, peut-être dû à l'aridité de l'environnement où vivent ces animaux comme signalé par Jenness (1980), Picque *et al.*(1992)et Gomez et Malcata (1998). Cependant, les bactéries lactiques sont exigeantes au plan nutritionnel. Mathara et al., (2004) ont reporté que les souches de *Leuconostoc* ont des exigences nutritionnelles complexes et sont peu compétitives durant la fermentation du lait.

Dans le genre *Leuconostoc*, deux espèces, *Ln. mesenteroides*, et *Ln. lactis* sont rencontrées dans nos échantillons étudiés.

Les mêmes espèces ont été identifiées par Saïdi (1998) et Kacem (2003) à partir de laits crus de vaches produites dans la région de l'ouest algérien et par Zadi- Karam (1998) dans le lait de chamelle.

Dans d'autres travaux Mathara et al., (2004) et Abdelgadir et al., (2001) ont pu isolé *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus* et *Lb. rhamnosus*, et *Lb. fermentum* à partir de produits fermentés, Maasai et Rob respectivement et ont démontré que ces espèces représentent plus de 60% des lactobacilles isolées.

D'autre part, Medina et al., (2001) ont démontré que huit pourcent des Lactobacilles isolés à partir du lait de brebis et du fromage au Nord de l'Argentine appartiennent à l'espèce *Lb. acidophilus*.

3.5 Identification des isolats par API 50 CHL

Vingt-trois isolats de bactéries lactiques ont été obtenus dans cette étude après confirmation de leur capacité à produire une bactériocine. Ils ont tous été étudiés par leurs profils fermentaires des carbohydrates ; ce qui a permis de les identifier (tableau 7).

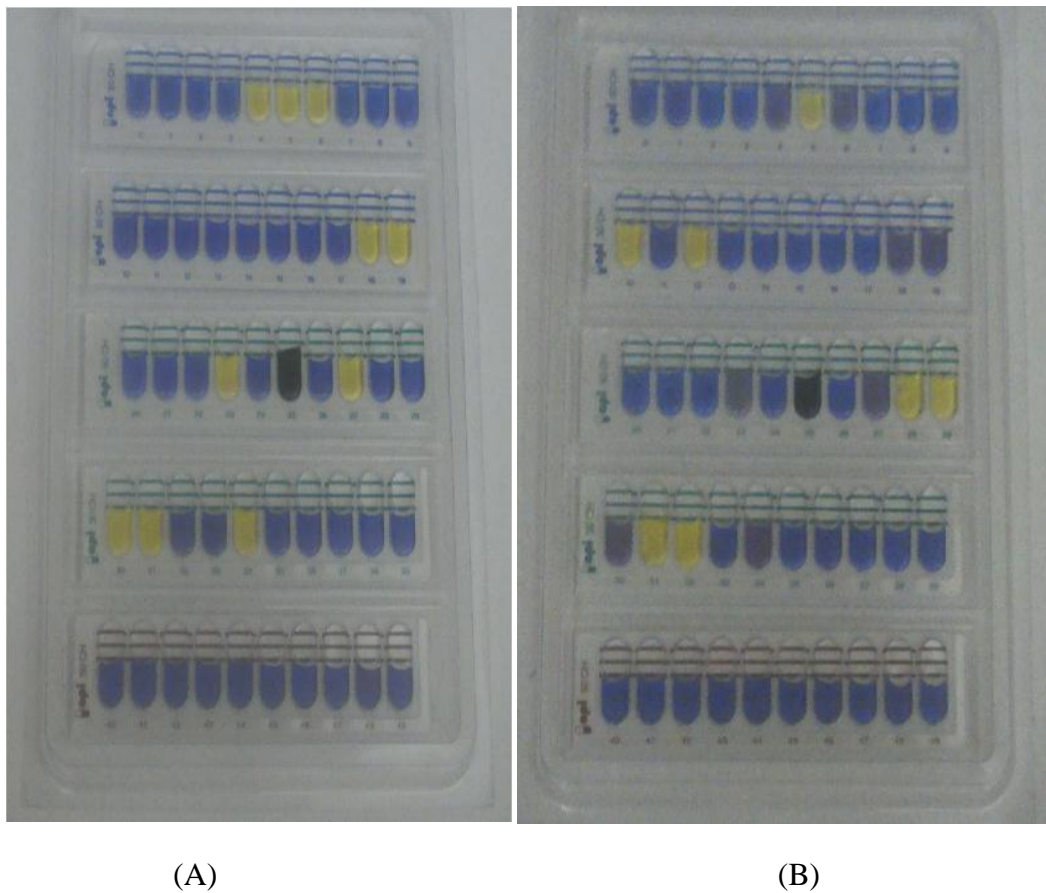


Figure 23 : profil fermentaire de deux souches de bactéries lactiques identifiées par des API 50 CHL ; A: *Lactobacillus plantarium* ; B: *Leuconostoc mesenteroides*

Tableau 7 : profil fermentaire des isolats retenus

Carbohydrates	Souches lactiques											
	V3	V11	V17	C19	C23	B30	C44	C58	B69	V87	C117	B133
Témoin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycérol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
D-Ribose	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fructose	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
MDM	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
MDG	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
NAG	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Amydaline	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Arbutine	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
ESC	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
Salicine	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
D-Celibiose	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
D-Maltose	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
D-mélibiose	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
D-Saccharose	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Trehalose	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
Inuline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mélézitose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
Glycogène	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
Xylitol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
D-Turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNT	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 7(suite) : profile fermentaire des isolats retenus

Carbohydrates	SOUCHES LACTIQUES										
	V154	C172	C177	B182	B187	V198	V200	V213	C215	C221	B230
Témoin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycérol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
L-Arabinose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
D-Glucose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fructose	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MDM	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MDG	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
NAG	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Amydaline	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Arbutine	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
D-Celibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
D-Lactose	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
D-mélibiose	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
D-Saccharose	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inuline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mélézitose	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogène	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
D-Turanose	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
D-Lyxose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ces résultats ont permis d'identifier nos 23 isolats comme étant des *Lactococcus lactis subsp lactis* (4 isolats), *Lc.Lactis subsp.Lactis.biovar.diacétylactis* (4 isolats), *Lc.Lactis subsp.Cremoris* (3 isolats), *Streptococcus thermophilus* (3 isolats), *Lactobacillus plantarum* (2 isolats), *Lactobacillus casei* (2 isolats), *Leuconostoc mesenteroides* (2 isolats), *Leuconostoc lactis* (2 isolats), et *Lactobacillus rhamnosus* (1 isolat).

Tableau 8: identification des isolats lactiques

Code	Identification
V 3, B133, V198, C221	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
V11, C44, B230	<i>Lc.Lactis subsp.Cremoris</i>
C23, B182, V213, C215	<i>Lc.Lactis subsp.Lactis.biovar.diacétylactis</i>
V17, C117	<i>Lactobacillus casei</i>
B69, V154	<i>Lactobacillus plantarum</i>
C177	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
B30, C58, V87	<i>Streptococcus thermophilus</i>
C19, C172	<i>Leuconostoc lactis</i>
B187, V200	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

La répartition des espèces lactiques bactériocinogènes isolées est représentée en pourcentage dans la figure 24.

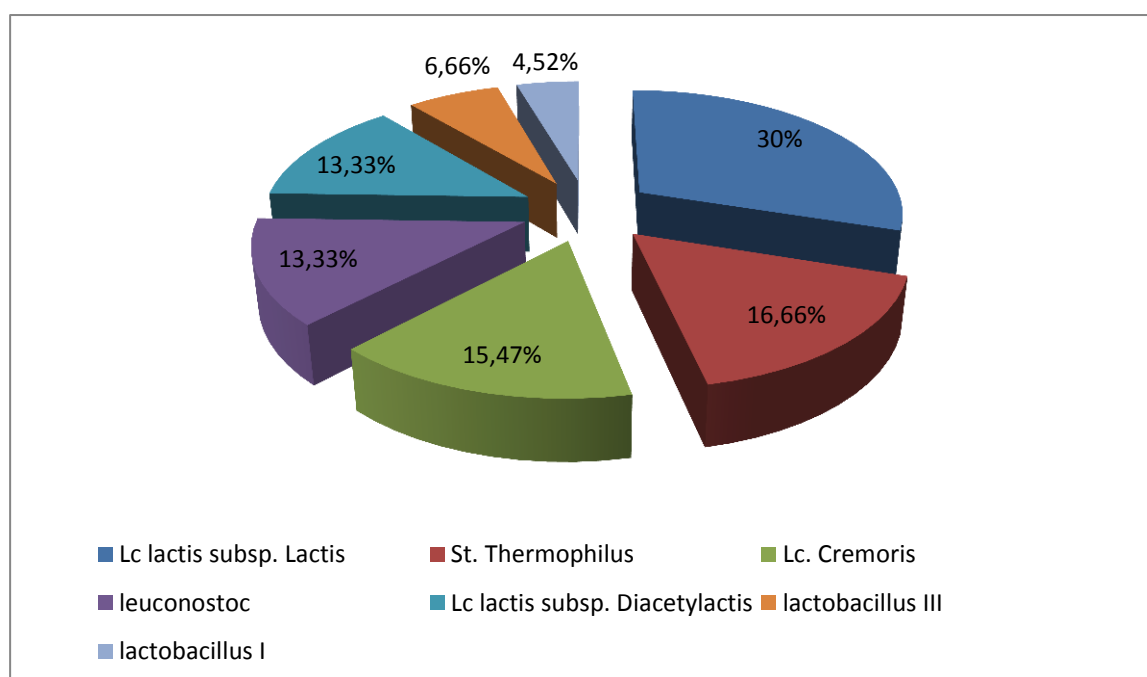


Figure 24 : répartition des isolats bactériocinogènes en genres et espèces

Ces résultats montrent la dominance des lactocoques dans cette population de bactéries lactiques étudiée (58,8%). Les Streptocoques arrivent en deuxième lieu avec 16,66% suivi par les leuconostocs avec un pourcentage de 13,33%. Le taux de lactobacilles dans notre échantillon reste le plus faible (11,18%). La dominance des lactocoques dans ces isolats retenus par rapport aux autres coques est due à leur capacité à produire des bactériocines. Tandis que le faible taux de leuconostocs est dû principalement à leur nombre faible déjà lors de l'isolement à cause de leurs difficultés de se développer dans une culture mixte (Togo *et al.*, 2002). Ceci a été décrit également par Aziz *et al.* (2009) qui ont observé un taux de leuconostocs inférieur de 10% de la flore lactique isolée à partir des laits de cru de vache, chèvre et brebis. L'isolement des leuconostocs, qui sont des bons producteurs de bactériocine nécessite l'ajout d'un antibiotique aux milieux de culture afin d'inhiber le reste de la flore lactique (Matho *et al.* 1994). Bendimerad *et al.* (2012) ont pu isoler un nombre important de ces bactéries en utilisant le M17 et le MRS additionnés de vancomycine.

3.6 Confirmation de l'identité des isolats par la Rep-PCR

Afin de confirmer l'identité de nos souches, nous avons procédé à une identification moléculaire en utilisant la technique rep-PCR. Les amorces utilisés sont de type (GTG)₅ pour pouvoir regrouper les 23 isolats retenus pour leur pouvoir bactériocinogène. La méthode (GTG)₅-PCR utilisée a pu donner les groupes lactiques auxquels appartiennent nos isolats. Cette technique a été déjà utilisée par Ouadghiri *et al.*, (2009) qui ont identifiés la microflore lactique de différents produits fermentés d'origine marocaine. Bendimerad *et al.*, (2013) se sont également basés sur le profil Rep-PCR pour identifier des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de différentes espèces animales dans la région de Tlemcen (ouest algérien). Les photos de 4 gels d'électrophorèse des produits de (GTG)₅-PCR sont présentées dans la figure 25. Sur la figure A, on trouve le gel sur lequel on a chargé 5 isolats parmi les isolats identifiés par API 50CHL comme étant des *Lc. lactis* (V3, B133, V198, C221 et V11). La comparaison des profils à l'oeil nu montre que nos isolats ont des profils qui se ressemblent entre eux surtout pour la partie située entre 400 pb et 1200 pb. La figure B présente le reste des isolats identifiés phénotypiquement comme étant des Lactocoques, il s'agit des isolats C44, B230, C23, V213 et C215. Les profils obtenus semblent très proches toujours dans la partie entre 400 et 1200pb à l'exception de l'isolat B182 qui montre un profil différent.

L'utilisation du logiciel bioinformatique Gel Compar II nous a permis de mieux évaluer les ressemblances entre les différents profils. La figure 26 montre le dendrogramme obtenu après traitement de ce gel, on remarque qu'effectivement les isolats identifiés comme étant du genre *Lactococcus* forment un groupe avec plus de 80% de similitude entre leurs profils ce qui permet de les identifier comme des *Lc. Lactis*.

La figure C montre le troisième gel d'électrophorèse des produits de (GTG)₅-PCR des isolats identifiés par API 50CHL comme étant des *Lactobacillus* (C17, C117, B69, V154 et 177 avec un isolat identifié comme étant *Leuconostoc mesenteroides* (C19). La comparaison à l'oeil nu s'avère trop difficile. Le traitement de ce gel par le logiciel Gel Compar II confirme les similitudes de nos isolats avec le groupe de lactobacilles avec une ressemblance très importante entre C19 et les *Leuconostoc mesenteroides*. Le logiciel a montré une similitude de 85% des isolats V17 et C117 avec l'espèce *Lactobacillus casei* et de 90% entre B69 et V154 avec l'espèce *Lactobacillus plantarum* ainsi que pour C177 avec *Lactobacillus rhamnosus*.

La figure D correspond au gel sur lequel on a chargé des isolats avec des identifications variées obtenues par API 50CHL. Trois isolats (B30, C58 et V87) identifiés phénotypiquement comme étant *Streptococcus thermophilus* et le reste des isolats identifiés comme étant des *Leuconostocs* (V172, B187 et V200).

Le traitement de nos résultats en utilisant l'outil bioinformatique nous a permis de les organiser en 4 groupes représentant 7 espèces. Les résultats obtenus sont regroupés dans le dendrogramme présenté dans la figure 26.

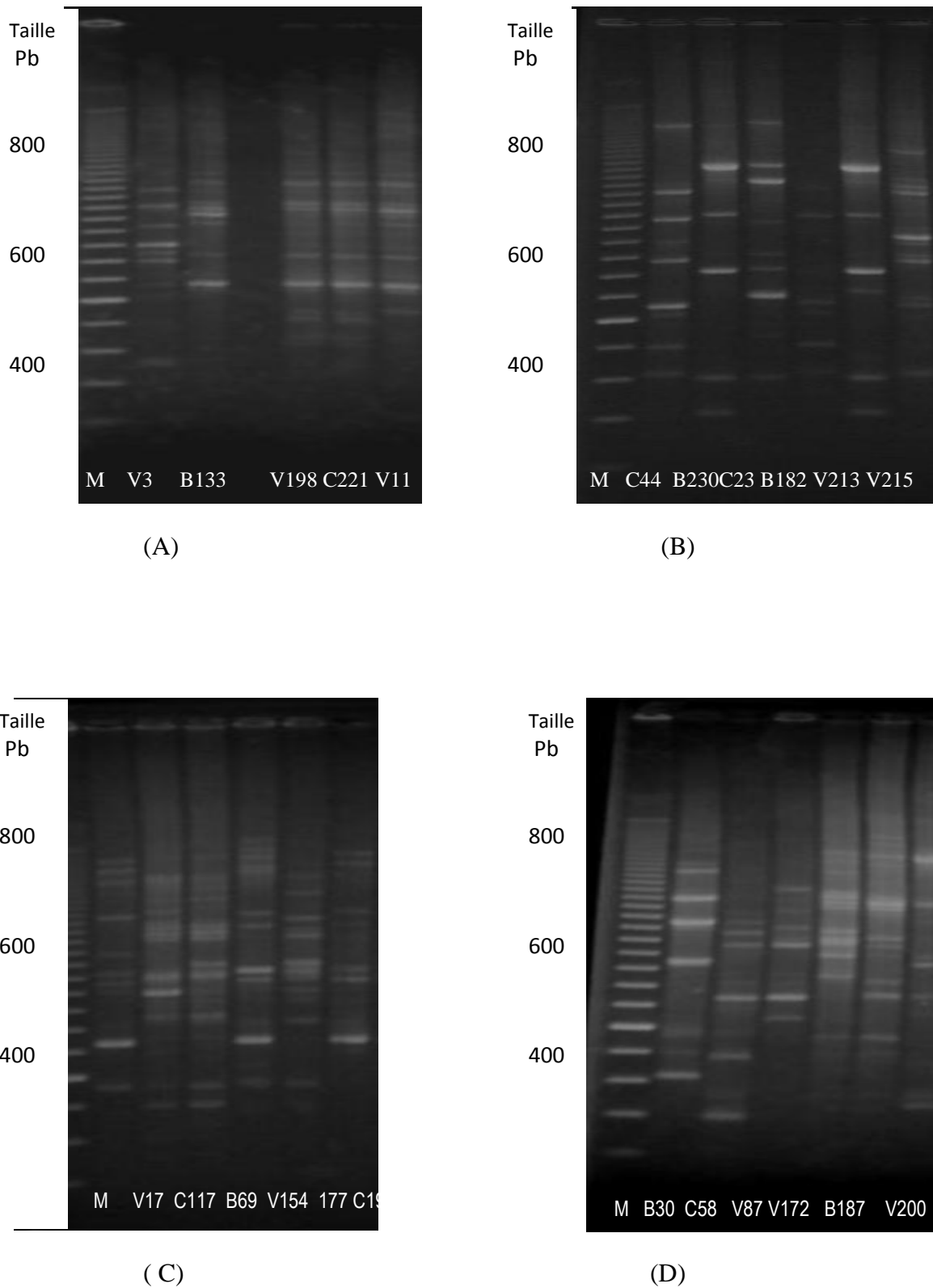


Figure 25 : Gel d'électrophorèse des produits de la (GTG)₅-PCR des isolats identifiés par API 50CHL.

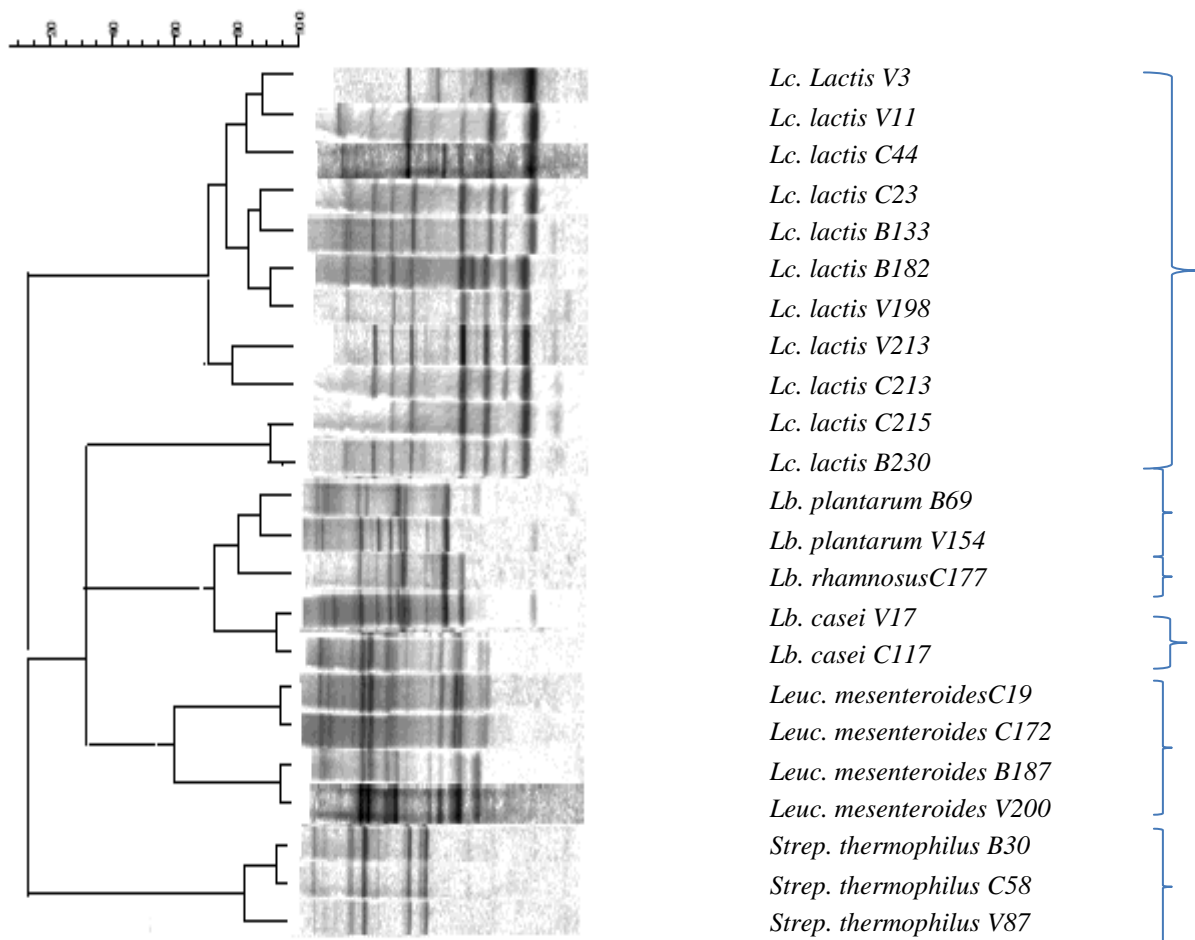
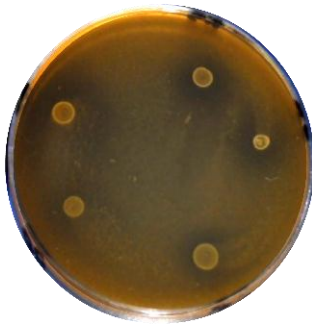


Figure 26 : Dendrogramme et profils (GTG)₅-PCR de bactéries lactiques, isolées de différents types de lait, retenues pour leur pouvoir bactériocinogène, groupés et identifiées au niveau de l'espèce par (GTG)₅-PCR.

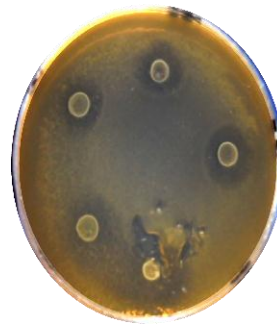
L'attribution d'un isolat à une espèce définie est basée sur son degré de similitude avec différentes souches de l'espèce. La comparaison des profils obtenus dans cette étude avec ceux des souches de référence disponibles dans la base de données construite à partir des études antérieures par les auteurs suivants : Svec et al., 2006 et De Bruyne et al., 2007 nous a permis d'identifier les 23 isolats qui ont été attribués aux espèces suivantes : *Lc. lactis* (11 isolats), *Leuc. mesenteroides* (4 isolats), *Lb. plantarum* (2 isolats), *Lb. casei* (2 isolats), *Lb. rhamnosus* (1 isolat) et *Strep. thermophilus* (3 isolats).

4. Recherche des souches lactiques productrices des agents antimicrobiens

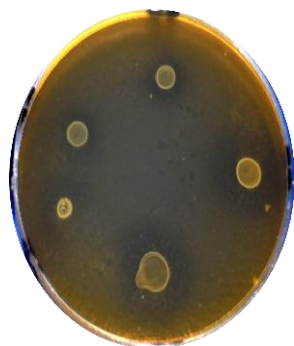
Après la confirmation de l'appartenance de 233 souches isolées, au groupe des bactéries lactiques, les tests antibactériens réalisés par la méthode de Fleming *et al.*, (1975) ont montré la présence d'un pouvoir inhibiteur contre au moins une souche test chez un total de 68 isolats. Les résultats obtenus sont présentés en partie dans la figure 27 et regroupés dans le tableau 9.



Salmonella Typhimurium



Enterococcus faecalis



Pseudomonas aeruginosa



Staphylococcus aureus

Figure 27 : Aspects des effets inhibiteurs des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes.

Tableau 9 : activité inhibitrice de 68 isolats lactiques bioactifs

Isolats lactiques	Souches indicatrices					
	<i>S.Typhimurium</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Ps. aer</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. feac</i>
V3	+	+	-	+	-	-
V7	-	+	-	-	-	-
V11	-	+	+	-	-	-
V12	-	-	+	-	+	-
V15	+	-	-	-	-	+
V26	-	+	-	-	+	-
C19	+	+	+	+	-	-
C21	-	-	-	-	+	-
C23	+	+	-	+	-	-
C24	+	-	+	-	-	-
C26	-	-	-	-	+	-
B28	-	-	-	+	-	+
B30	-	-	-	+	+	-
B35	+	-	-	-	-	-
V36	-	-	+	+	-	-
V40	+	-	-	-	-	-
V41	-	+	-	-	-	-
V42	-	+	-	-	-	-
C44	+	+	+	+	-	+
C45	-	-	-	-	-	-
C53	+	-	-	-	+	-
C58	+	+	+	-	-	-
C63	-	-	+	+	-	-
C66	-	-	-	-	+	-
B69	-	+	-	-	+	+
B79	-	-	-	-	-	-
B80	+	-	-	-	-	-
V83	-	-	+	-	-	-
V87	+	+	-	-	-	-
V90	-	-	-	+	-	+
V97	-	-	-	+	-	-
V104	-	+	-	-	+	-
C117	+	+	+	-	+	-
C120	+	-	-	+	-	+

+ Inhibition, - absence d'inhibition

Tableau 9(suite): activité inhibitrice des isolats lactiques

Isolats lactiques	Souches indicatrices					
	<i>S.Typhimurium</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Ps. aer</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. feac</i>
C123	-	+	-	-	-	-
C124	-	-	-	-	-	-
C129	-	-	+	-	-	-
C131	-	-	-	+	+	-
B133	+	+	-	-	-	-
B135	-	-	-	+	-	+
B139	-	-	-	+	-	-
V150	-	+	-	-	-	+
V154	+	+	-	-	-	-
V160	-	+	-	-	-	-
V165	-	-	-	+	-	-
C168	-	-	+	-	-	+
C169	-	-	-	+	+	-
C172	+	+	-	+	-	-
C174	+	-	+	-	-	-
C175	-	-	-	-	-	-
C177	+	+	-	+	+	+
C181	+	+	-	-	-	-
B182	-	+	-	+	+	-
B184	-	-	-	-	+	+
B187	+	-	+	+	-	-
V198	+	-	-	+	-	+
V200	-	-	+	+	-	+
V207	+	-	-	-	-	-
V213	-	-	-	+	+	-
C215	+	+	+	+	-	-
C217	-	+	-	-	+	-
C219	+	-	-	-	-	+
C220	+	-	+	+	-	-
C221	+	+	-	-	+	-
B224	-	-	+	+	-	-
B226	-	-	-	+	-	+
B229	-	-	-	+	+	-
B230	+	-	-	+	+	-

+ Inhibition, - absence d'inhibition

D'après les résultats regroupés dans le tableau 9, les pouvoirs inhibiteurs de nos isolats sont très variables. On note que 2 isolats seulement ont inhibé 5 sur 6 bactéries indicatrices testées, il s'agit de C44 et C177. Trois de nos bactéries lactiques ont montré une inhibition contre 4 bactéries indicatrices. Cependant, 12 isolats étaient actifs contre 3 bactéries et 32 ont montré un pouvoir inhibiteur contre 2 souches indicatrices parmi les 6. Une seule bactérie a été inhibée par les 18 isolats restant parmi les 68 qui ont montré une activité inhibitrice.

Des effets inhibiteurs importants sont observés généralement chez les isolats identifiés comme étant des lactobacilles (B69, C117, C177) par rapport aux autres genres.

Selon Wilson et al. (2003), l'important effet inhibiteur des Lactobacilles peut avoir deux origines : La première est la production d'acide lactique et /ou acétique ; en effet, les *lactobacilles* sont connus par une grande résistance aux pH acide (jusqu'à un PH voisin de 3,5) contrairement aux autres genres qui sont plus sensibles. Alors que la deuxième est que les *lactobacilles* produisent une autre substance inhibitrice active sur de nombreuses espèces.

La figure 28 présente les taux d'inhibitions des souches indicatrices par nos isolats lactiques.

D'après ces résultats on constate que la souche indicatrice la plus sensible à nos isolats est *E. coli*, elle est inhibée par 31 isolats. Les souches indicatrices *Salmonella typhimurium* et *Staphylococcus aureus* sont inhibées par 29 et 28 isolats respectivement. Alors que *Bacillus cereus* a été inhibée par 22 isolats et *Pseudomonas aeruginosa* par 18 isolats lactiques. *Enterococcus faecalis* a été inhibée par 15 isolats seulement parmi les 68 actifs.

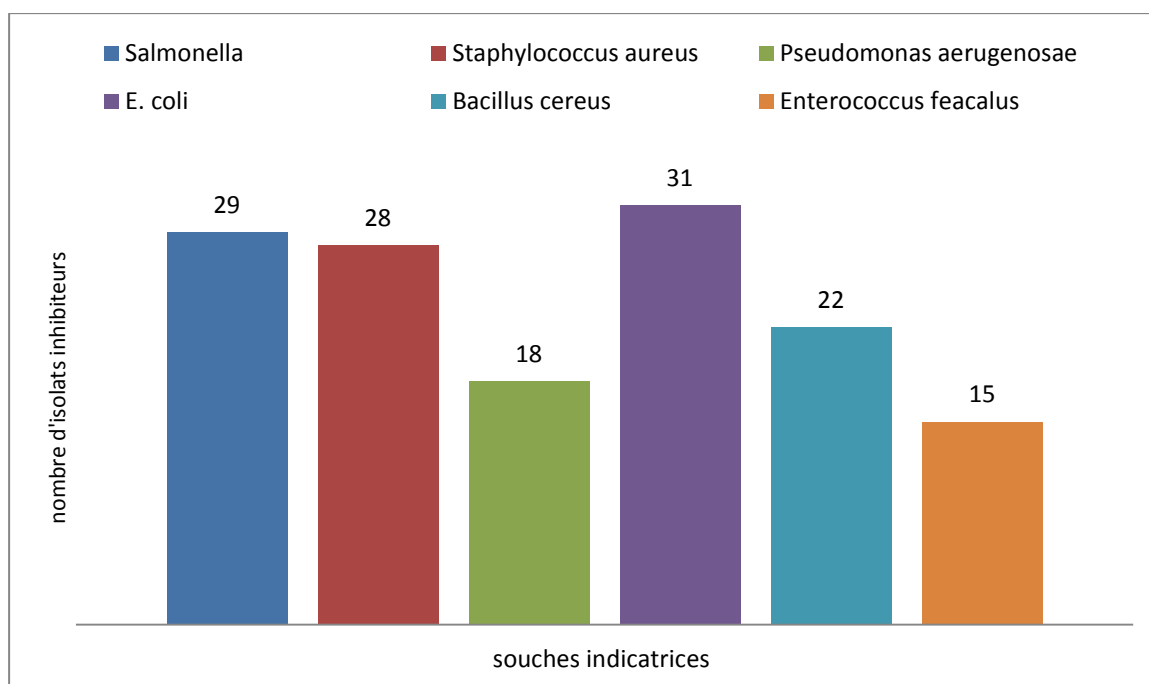


Figure 28 : nombre d'isolats inhibiteurs pour chaque bactérie indicatrice

Beaucoup de travaux ont été effectués dans ce domaine parmi eux ceux Canducci et *al.*, (2000) ; Armuzzi et *al.*, (2001) ; Sakamoto et *al.*, (2001) ; Collado et *al.*, (2005) qui ont montré l'effet inhibiteur des bactéries lactiques contre les espèces pathogènes telles que *E.coli* et *Salmonella*.

La souche *Lactococcus lactis* Lc8 isolée du lait cru de chèvre d'Algérie par Guessas et Kihal (2004) a montré une activité antimicrobienne élevée, inhibant ainsi la croissance de *Staphylococcus aureus*.

4.1. Nature de l'agent inhibiteur

La méthode par diffusion sur milieu solide (Fleming et *al.*, 1975) est utilisée pour la détection des inhibitions. Ce test dont le principe est de mettre en culture et en contact des souches bactériennes, permet non seulement de mettre en évidence les interactions négatives dues au métabolisme des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes mais aussi d'apprécier relativement l'importance des inhibitions observées et ceci par mesure de la dimension des halos clairs.

L'observation de zones d'inhibitions au cours des interactions entre nos souches de bactéries lactiques et la flore pathogène nous a conduit à rechercher la nature exacte de ces

inhibitions observées qui peuvent être dues aux acides organiques (Holzapfel et *al.*, 1995), au peroxyde d'hydrogène (Desmazeaud, 1996), ou à des bactériocines (Desmazeaud, 1998).

Pour les 68 isolats qui ont montré un pouvoir inhibiteur, nous avons essayé de déterminer la nature de l'agent inhibiteur pour cela nous avons procédé comme suit :

- Pour les inhibitions dues aux acides organiques par l'utilisation de milieux tamponnés à pH 7
- L'inhibition due au peroxyde d'hydrogène par l'utilisation de la catalase (1mg/ml)

4.1.1. Inhibition due à l'acidité

En réalisant le test de mise en évidence des inhibitions en conditions tamponnées, la plupart des isolats lactiques ont montré une diminution de leur effet inhibiteur et pour certaines souches une levée totale. Les figures 29, 30, 31 et 32 représentent les variations dans le diamètre de la zone d'inhibition des 68 isolats testés en milieu tamponné et non tamponné.

La souche indicatrice utilisée pour déterminer la nature de l'agent inhibiteur est celle qui a montré la sensibilité la plus importante.

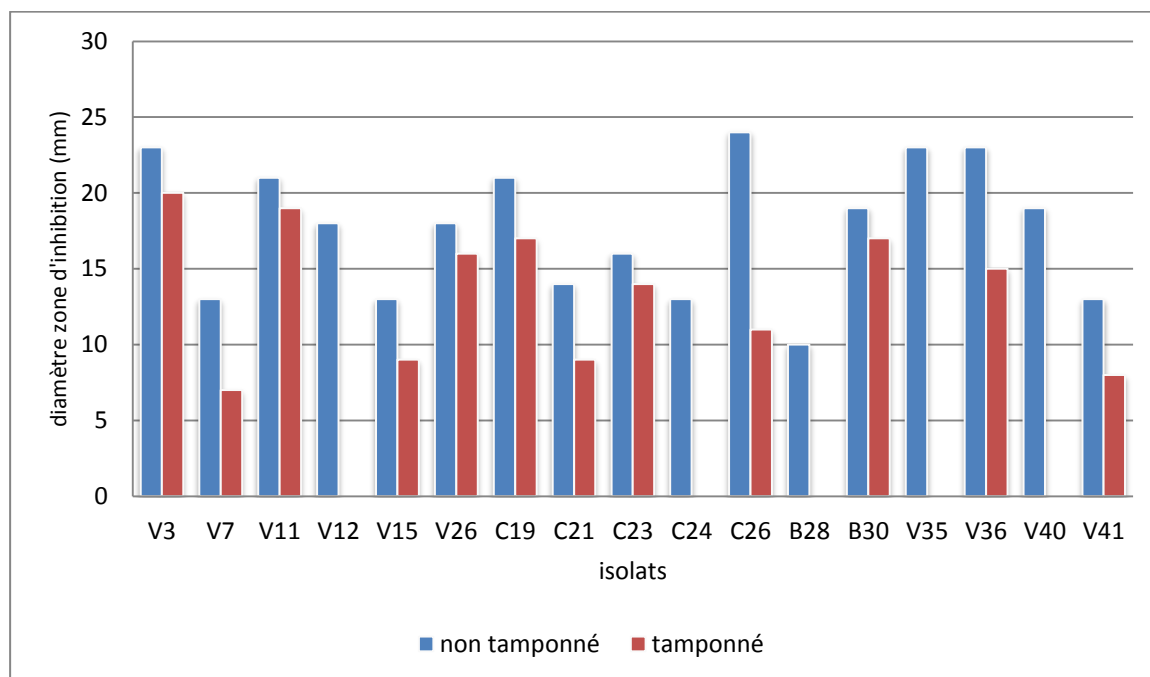


Figure 29 : résultats de la recherche des inhibitions dues à l'acide produit par les isolats lactiques

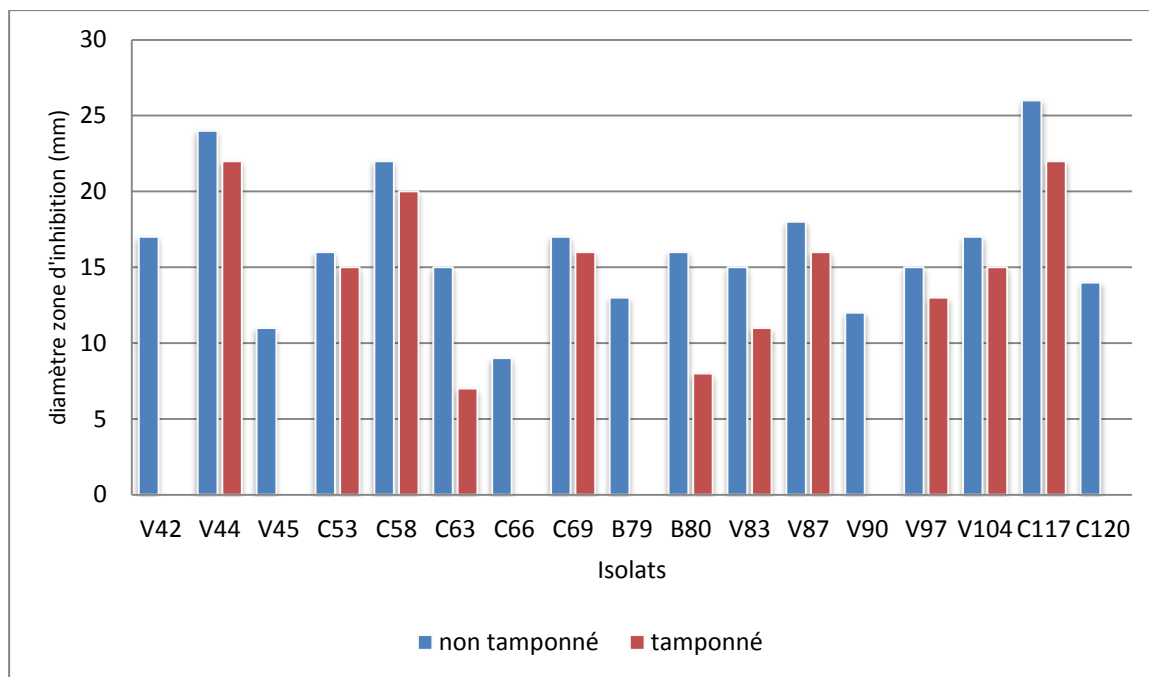


Figure 30 : résultats de la recherche des inhibitions dues à l'acide produit par les isolats lactiques

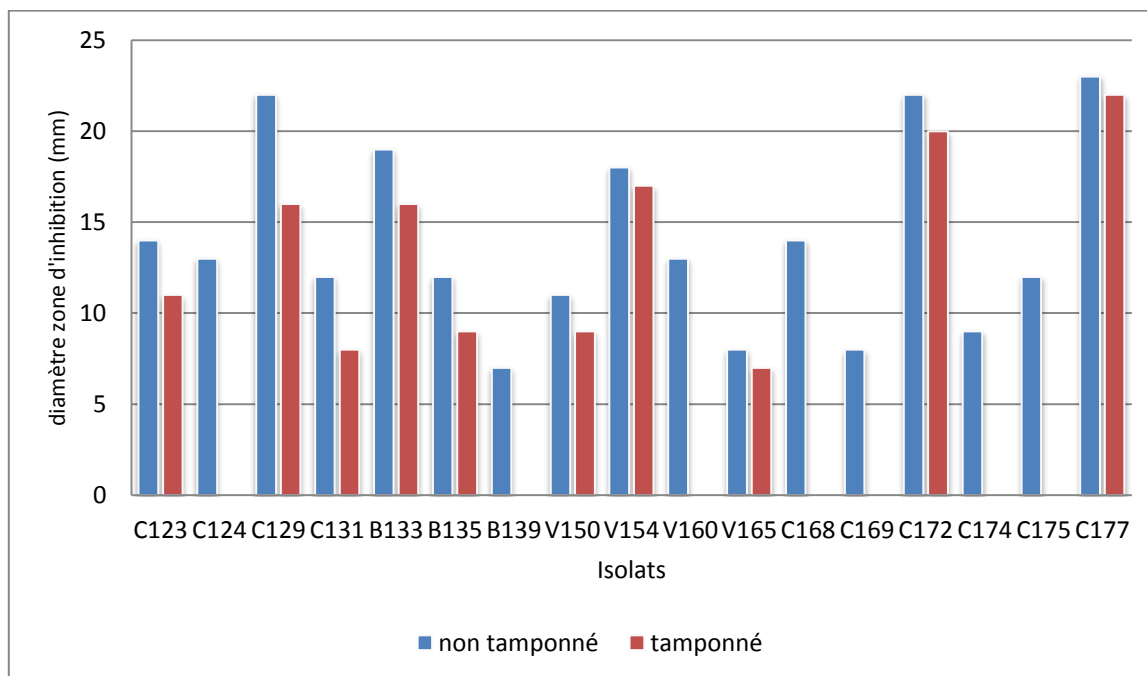


Figure 31 : résultats de la recherche des inhibitions dues à l'acide produit par les isolats lactiques

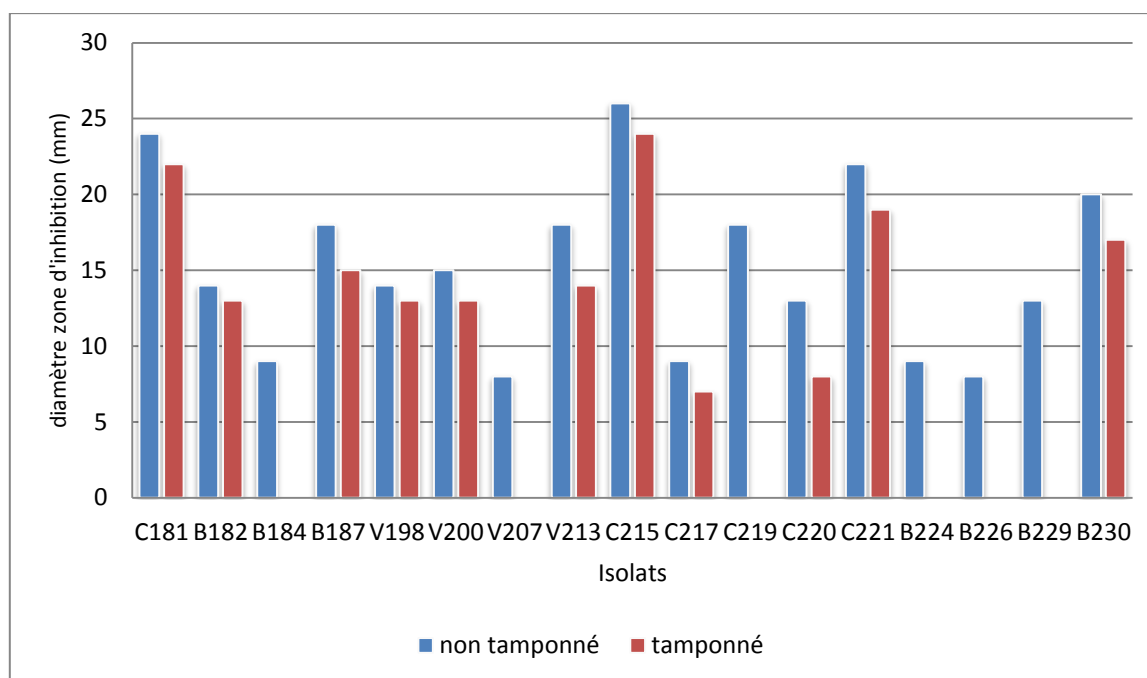


Figure 32 : résultats de la recherche des inhibitions dues à l'acide produit par les isolats lactiques

Les résultats obtenus en utilisant le milieu tamponné ont montrés la disparition totale des halos d'inhibition chez 24 isolats parmi les 68 soit un pourcentage de 35.3%. Les isolats lactiques qui ont perdus leur effet inhibiteur sont : V12, C24, B28, B35, V40, V42, V45, C66, B79, V90, C120, C124, B139, V160, C168, C169, C174, C175, B184, V207, C219, B224, B226, B229. Pour les 44 souches restantes, nous avons observé une diminution dans le diamètre de la zone d'inhibition.

D'après Helander *et al.*, (1997) l'inhibition par les souches lactiques peut être due à la production d'acides organiques tel que l'acide lactique, l'acide formique et l'acide benzoïque.

Klaenhammer, 1993; Brul *et al.*, 1999; Caplice *et al.*, 1999; Hsiao *et al.*, 1999; Cotter *et al.*, 2005; Janssen *et al.*, 2007 ont montré que l'acide lactique et acétique produits par les bactéries lactiques sont les produits terminaux du métabolisme fermentaire, sous leurs formes dissociées ils traversent passivement la membrane cytoplasmique et pour de fortes concentrations le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire annulé. 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 (Bey, 2009).

La production de l'acide lactique et acétique et donc l'abaissement du pH ont un effet essentiellement sur les microorganismes acido-sensibles tels que *Pseudomonas*, *Salmonella*, *E. coli*, en plus l'acide lactique est toxique pour beaucoup de bactéries mais aussi des champignons et des moisissures (Geis, 1989 ; Piard et Desmazeaud, 1991). C'est la forme moléculaire (non dissociée) de l'acide lactique qui est le facteur toxique pour les bactéries (Pilet et *al.*, 1996).

Selon Klaenhammer, (1993), certaines bactériocines ne sont pas actives à pH 7, ceci a été expliqué par Ennahar et *al.*, (2000) in Dalache, (2006) ; Bayoub et *al.*, (2006) par le fait que la fixation des bactériocines sur la membrane plasmique de cellules cibles est favorisée par des pH proches de la neutralité, dans ce cas une activité due à la production d'une bactériocine pourrait être considérée comme étant due à la production d'acide. Ceci nous amène à dire que l'absence de zones d'inhibitions en milieu tamponné s'explique par l'importance du pouvoir inhibiteur des acides produits par nos souches lactiques mais n'exclue pas un éventuel pouvoir inhibiteur des bactériocines.

4.1.2. Inhibition due au peroxyde d'hydrogène

Afin de déterminer les inhibitions dues au peroxyde d'hydrogène, des surnageant traités par la catalase (5mg/ml) ont été utilisés en présence d'une bactérie test. Les résultats obtenus sont regroupés dans la figure 33.

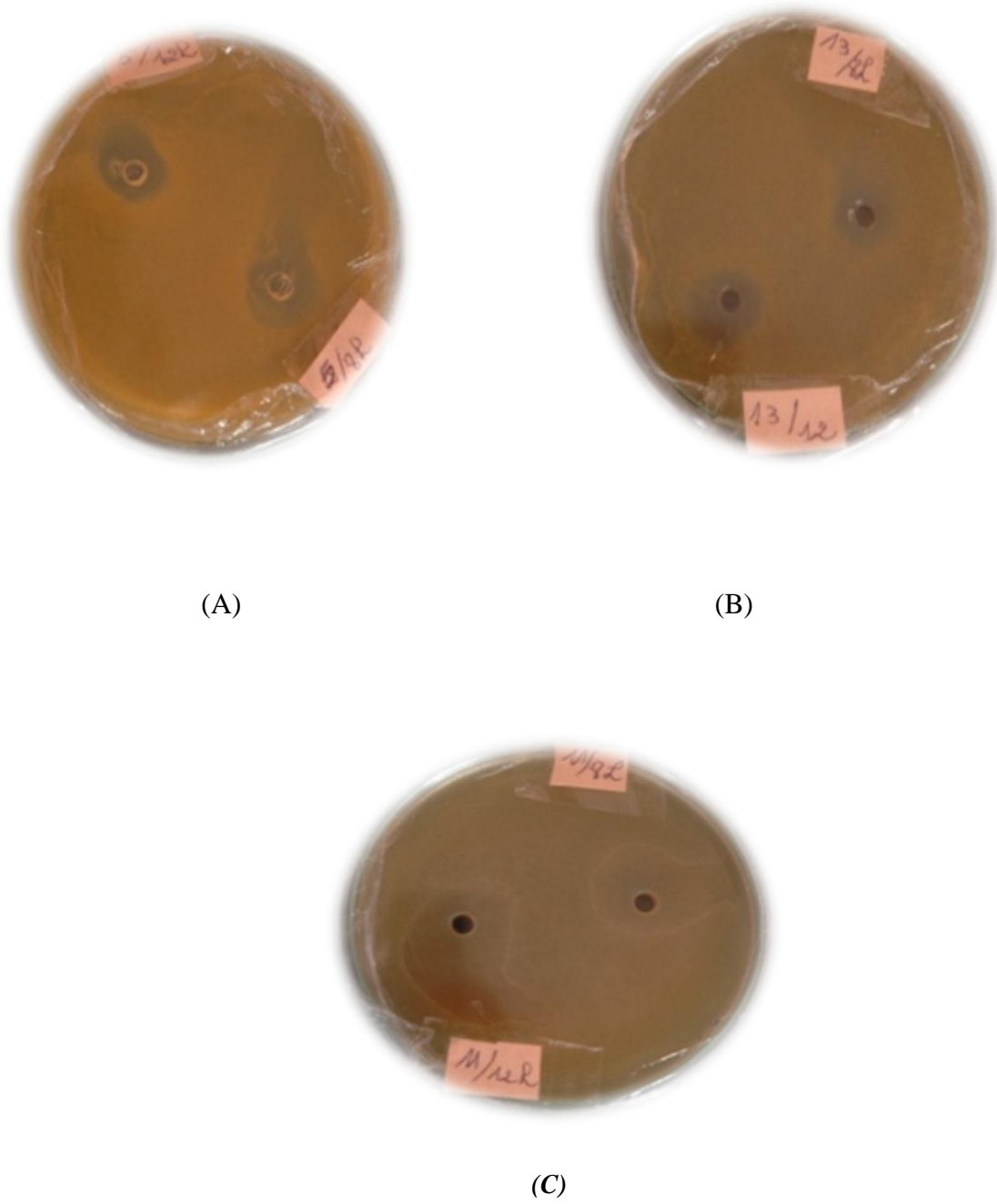


Figure 33: recherche des inhibitions dues au peroxyde d'hydrogène. (A) témoins (B) après traitement par la catalase présence d'inhibition (C) absence d'inhibition

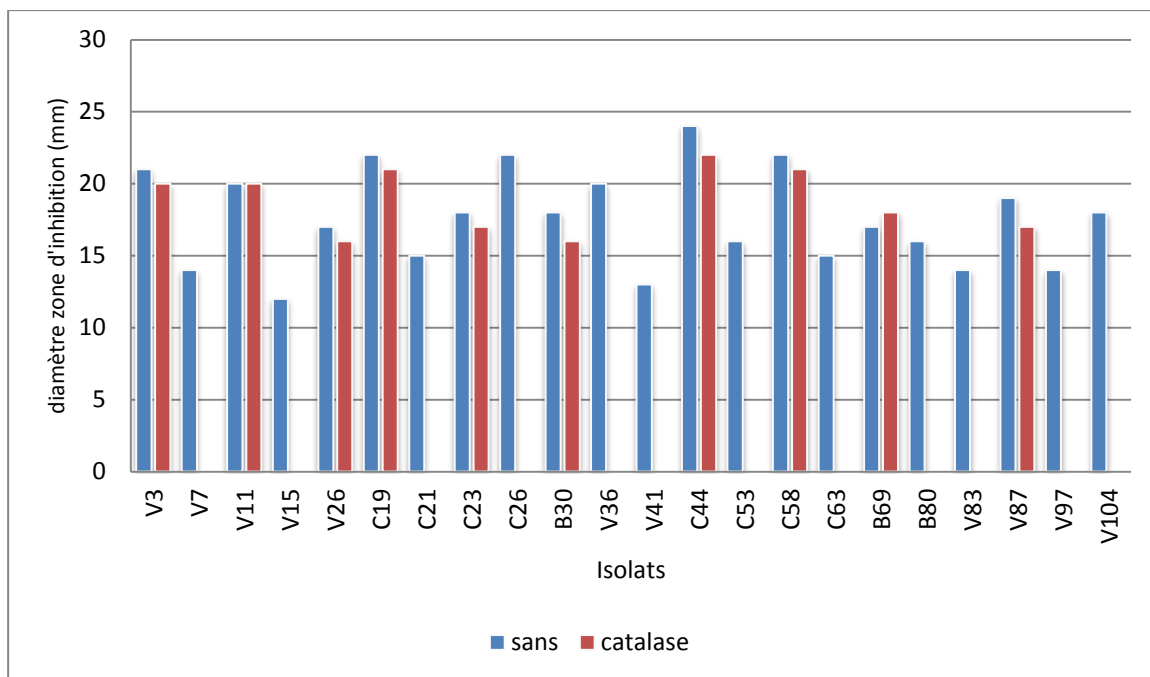


Figure 34 : résultats de la recherche des inhibitions dues au peroxyde d'hydrogène produit par les isolats lactiques

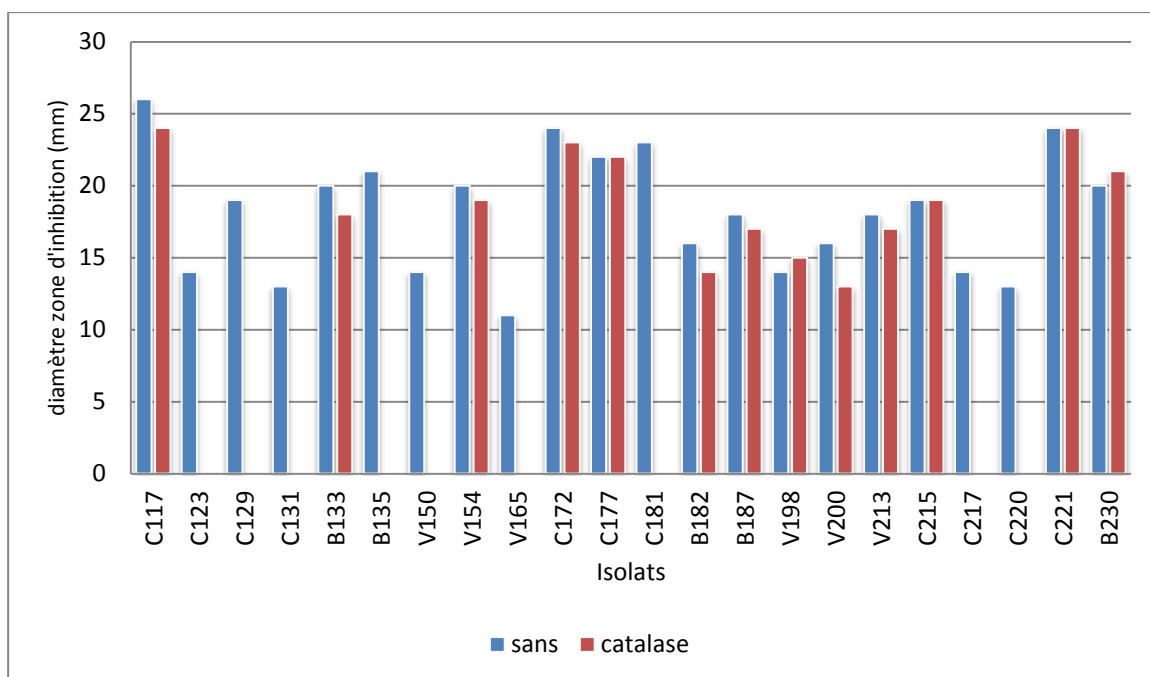


Figure 35 : résultats de la recherche des inhibitions dues au peroxyde d'hydrogène produit par les isolats lactiques

Sous l'effet de la catalase 19 isolats ont perdu totalement leur pouvoir inhibiteur, il s'agit de V7, V15, C21, C26, V36, V41, C53, B80, V97, V104, C123, C129, C131, B135, V150, V165, C181, C217 et C220. En ce qui concerne les autres isolats qui ont gardé une activité antibactérienne, nous avons remarqué une stabilité dans le diamètre de la zone d'inhibition, pour la plupart des souches, avant et après le traitement par la catalase. Ceci est au contraire avec les résultats obtenus après élimination de l'acidité où on a marqué une diminution qui prouve l'effet synergétique entre l'acide et les autres agents.

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler pour être inhibiteur de différents microorganismes. Son action se manifesterait aussi bien sur les germes indésirables que sur ceux qui sont indispensables au bon déroulement de la fermentation. Il est donc rarement utilisé pour son activité inhibitrice. (Zalan *et al.*, 2005 in Dortu, 2008).

Le peroxyde d'hydrogène est capable d'endommager les membranes bactériennes des bactéries à Gram négatif les plus sensibles mais aussi il peut provoquer des altérations au niveau de l'ADN comme dans le cas d'*Escherichiacoli* et ceci en provoquant des ruptures de la chaîne de l'ADN en libérant des nucléotides, ce qui empêche la réplication chromosomique. Le peroxyde d'hydrogène peut aussi inhiber les enzymes de la glycolyse, perturber les systèmes de transport des sucres et des acides aminés ou la synthèse des protéines et des acides nucléiques (Byczkowski et Gessner, 1998 ; Doleyres, 2003).

Davidson *et al.* (1983) ont constaté que la production de H₂O₂ par *Lactobacillus* et *Lactococcus* inhibe la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas sp.* et de divers microorganismes psychrotrophes. L'inhibition est provoquée par l'effet d'oxydation fort sur des lipides de membrane et des protéines cellulaires.

4.1.3. L'effet des enzymes protéolytique sur l'agent inhibiteur

Comme les bactériocines sont de nature protéique, la sensibilité aux enzymes protéolytiques est un critère principal dans leur caractérisation. Les réponses obtenues après l'action des enzymes protéolytiques (trypsine, pepsine et α -chymotrypsine) nous permettront d'identifier la substance inhibitrice comme étant une bactériocine (Callewaert et De Vuyst, 2000 et Aslim *et al.*, 2005).

La disparition du halo d'inhibition après le traitement des surnageants de culture des isolats lactiques par des enzymes protéolytiques affirme que la substance inhibitrice est de

nature protéique, il s'agira de bactériocines chez ce groupe de bactéries (Çon et Gökalp, 2000).

L'effet de divers enzymes protéolytiques sur la substance inhibitrice est montré dans le tableau 10.

Tableau 10 : pouvoir inhibiteur des isolats lactiques sous l'effet des enzymes protéolytiques

	Pepsine	Trypsine	α-Chymotrypsine
V3	-	-	-
V11	-	+	-
V17	-	-	-
C19	+	-	-
C23	-	-	-
B30	-	+	-
C44	-	-	-
C58	-	-	+
B69	-	-	-
V87	-	-	-
C117	-	+	-
B133	-	-	-
V154	-	-	-
C172	-	-	-
C177	-	-	-
B182	+	-	-
B187	-	-	-
V198	-	-	-
V200	-	+	-
V213	+	-	-
C215	-	-	-
C221	-	+	-
B230	-	-	-

+ croissance positive, - pas de croissance

Les résultats regroupés dans le tableau montrent la sensibilité de l'agent inhibiteur produit par les 23 isolats à 2 enzymes protéolytiques au moins. Seulement la souche C58 a montré une résistance à l'effet de l'enzyme α -Chymotrypsine cependant la même souche a perdu son pouvoir inhibiteur en présence de la pepsine et la trypsine. Pour la trypsine, 5 isolats (V11, B30, C117, V200 et C221) ont montré une inhibition sous l'effet de cette enzyme, alors que les trois isolats C19, B182 et V213 ont gardés un effet inhibiteur par traitement à la pepsine. Ces résultats affirment que les inhibitions exercées par les 23 souches lactiques retenues sont dues à une substance protéique.

les bactéries lactiques sont capables de synthétiser des bactériocines actives non seulement contre d'autres bactéries lactiques mais également contre d'autres bactéries à Gram+ et selon certains contre des bactéries à Gram - parmi lesquelles on rencontre des Entérobactéries et autres germes pathogènes (Perdigon et *al.*, 1998).

Selon Nissen-Meyer et *al.*, (1993), la bactériocine peut prendre la forme d'un complexe hétérogène incluant des groupements lipidiques ou saccharidiques ou encore une combinaison de protéines ou peptides distincts.

Plusieurs facteurs peuvent avoir un effet sur l'activité antimicrobienne parmi lesquelles l'interaction entre la bactériocine et les constituants des cellules ou du milieu de croissance, de la pureté et de la concentration de l'enzyme et de la technique employée pour déterminer la sensibilité enzymatique (Piard et Desmazaud, 1991).

Bhunja et *al.*, (1991) et Parente & Ricciardi (1999) ont montré que la présence des enzymes protéolytiques dans le milieu perturbe légèrement la sensibilité des bactéries aux bactériocines. Dans le même contexte, plusieurs facteurs influent sur l'efficacité d'une bactériocine notamment la composition du milieu, la température d'incubation et en particulier le pH optimum pour l'activité (Carolissen-Mckay et *al.*, 1997; Daba et *al.*, 1993; Parente & Ricciardi, 1999; Tagg et *al.*, 1976).

5. Caractérisation de l'agent inhibiteur

Après avoir identifié les isolats lactiques bactériocinogènes, des tests de stabilité de l'agent inhibiteur après des traitements thermiques et enzymatiques sont réalisés. Ensuite la cinétique de production de la substance inhibitrice a été suivie durant toutes les étapes de la croissance bactérienne afin de déterminer la phase de production maximale.

5.1. Thermostabilité de l'agent inhibiteur

Les résultats de l'effet du traitement thermique sur la stabilité de l'agent inhibiteur sont représentés dans la figure 36. Cette thermostabilité est déterminée par la présence ou non d'un effet inhibiteur après un traitement thermique du surnageant de culture de la souche bactériocinogène (figure 36).

Le traitement thermique de surnageant de cultures à 80°C pendant 10 minutes n'a donné qu'une légère diminution du diamètre de la zone d'inhibition produite par tous les isolats. Alors qu'aucune souche n'a donné une zone d'inhibition après traitement du surnageant à la

même température pendant 2 heures. La stabilité de la substance impliquée dans cette inhibition sous l'effet de la température de 80 °C pendant 10 minutes et la dénaturation de l'agent inhibiteur après 2 heures de traitement par cette température confirme qu'il s'agit bien de bactériocines produites par nos isolats (Ammor et al. 2005).

Les résultats obtenus montrent aussi une thermostabilité de l'agent inhibiteur produit par tous les isolats à la température de 100°C pendant 15 et 30 minutes. Cependant, 2 isolats seulement (V17 et V213) ont présentés une inhibition après avoir subi un traitement thermique de 120 °C pendant 20 minutes. Ces résultats nous ont conduits à classer nos bactériocines en classe I ou II (De Vuyst et Van Damme, 1994). Cette propriété demeure très intéressante pour la valorisation des bactériocines de ces deux souches dans des produits traités à une haute température (UHT ou appertisation).

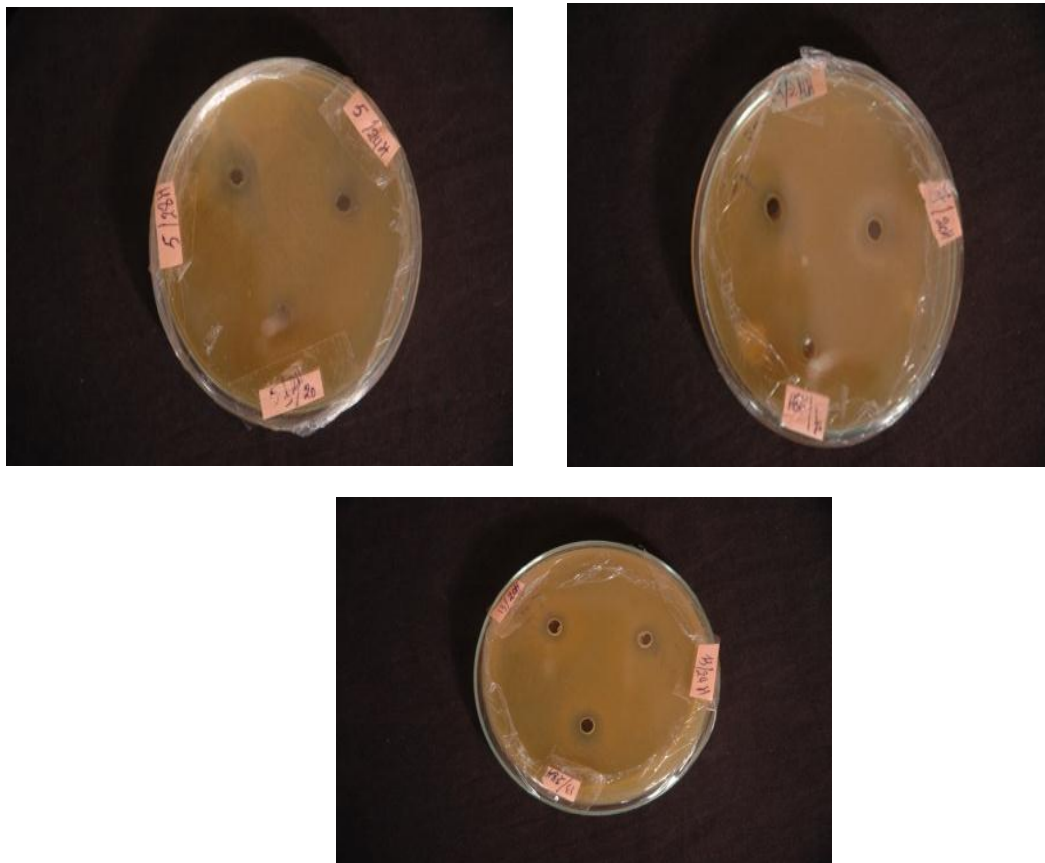


Figure 36 : résultats de l'effet inhibiteur de quelques souches après traitement thermique

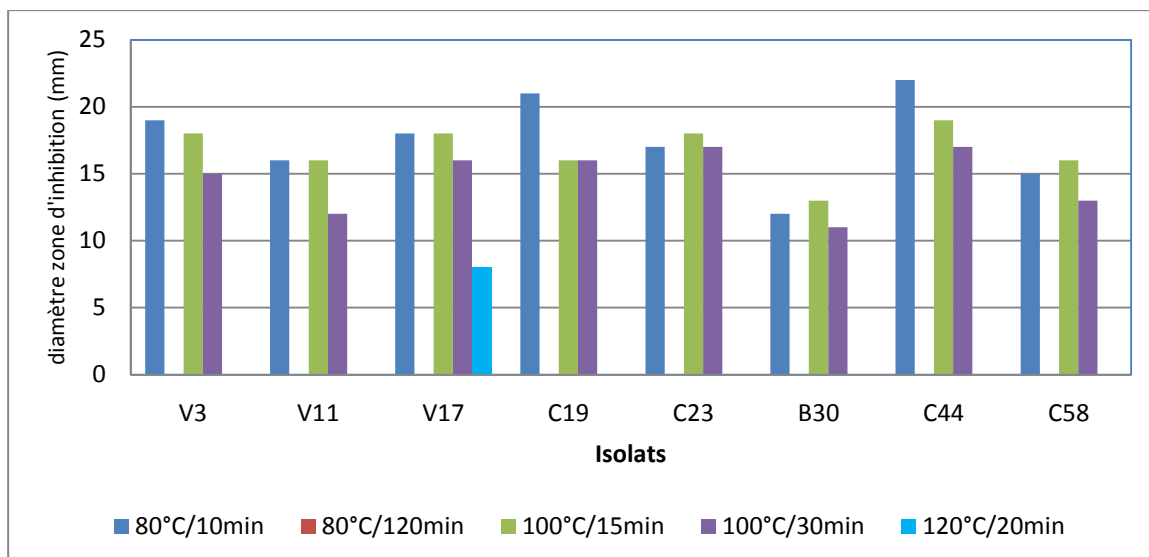


Figure 37 : représentation des résultats de l'effet inhibiteur des isolats bactériocinogènes après traitement thermique

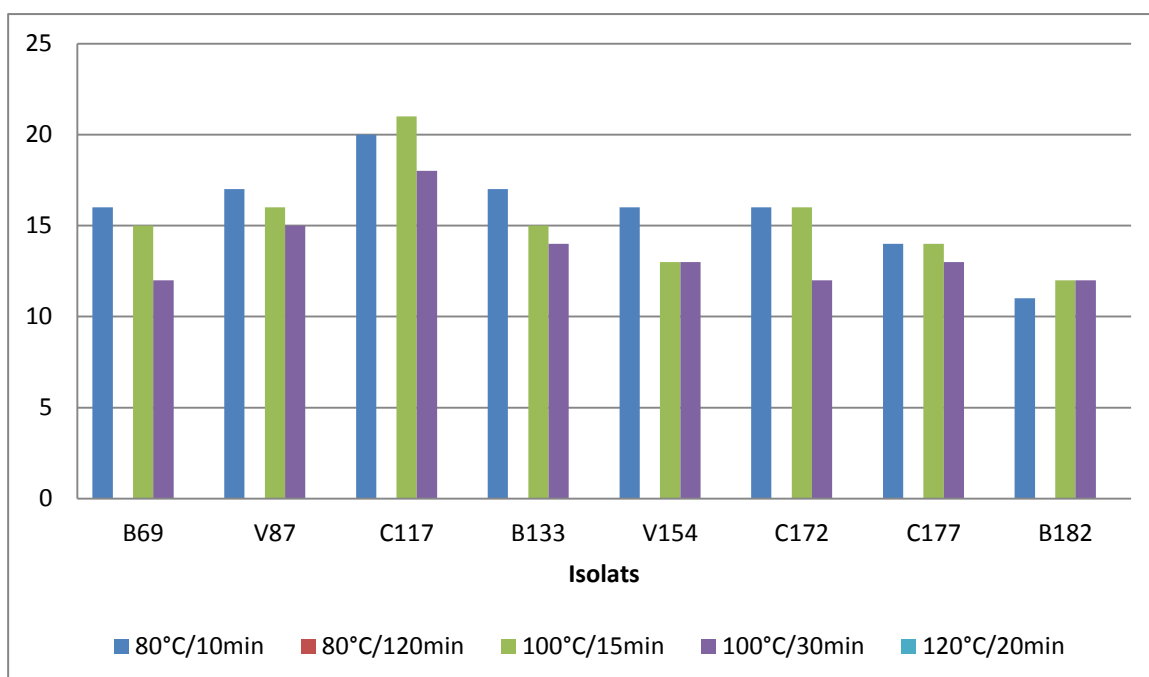


Figure 38 : représentation des résultats de l'effet inhibiteur des isolats bactériocinogènes après traitement thermique

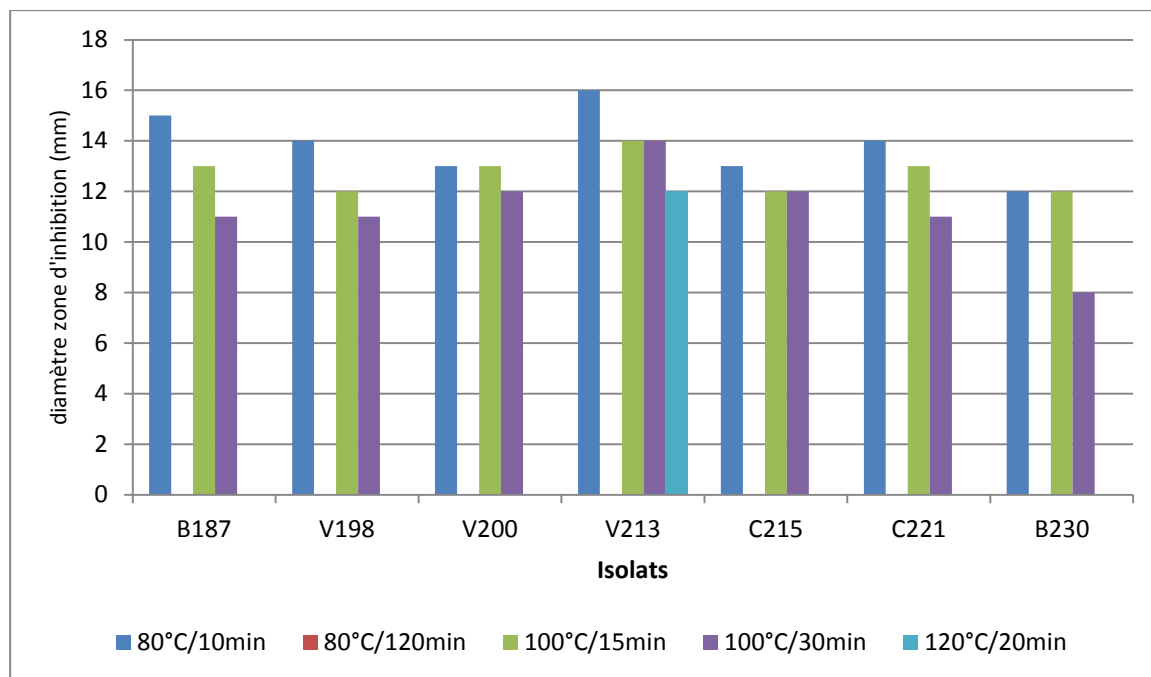


Figure 39 : représentation des résultats de l'effet inhibiteur des isolats bactériocinogènes après traitement thermique

5.2. Cinétique de production de l'agent inhibiteur

D'après la littérature la phase de croissance exponentielle de bactéries lactiques se situe entre 3 et 18 h d'incubation sur un milieu synthétique.

Afin de déterminer la phase de croissance, d'une bactérie lactique isolée, dans laquelle la production de la bactériocine est maximale, une cinétique de production a été établie (figures 40, 41 et 42). Les résultats obtenus montrent que 15 isolats parmi les 23 ont une inhibition maximale à 12 h d'incubation. Pour le reste des isolats 2 seulement ont montré une inhibition maximale après 16 h d'incubation contre 6 isolats qui ont donné la zone d'inhibition la plus importante à 14h de croissance.

En revenant à l'identification des isolats on trouve que les deux souches qui ont un maximum d'activité antibactérienne au temps 16h sont des lactobacilles, il s'agit de B69 et V154 appartenant à l'espèce *Lactobacillus plantarum*. Ceci confirme, d'une part l'identité de ces deux isolats et d'autre part l'optimum de croissance et de production des métabolites par les lactobacilles qui se manifeste généralement à des pH acides. Ces résultats sont en accord

avec les travaux de Gänzle et al. (1999) qui ont affirmé que la bactériocinogénèse dépend principalement des conditions de cultures et en particuliers du pH.

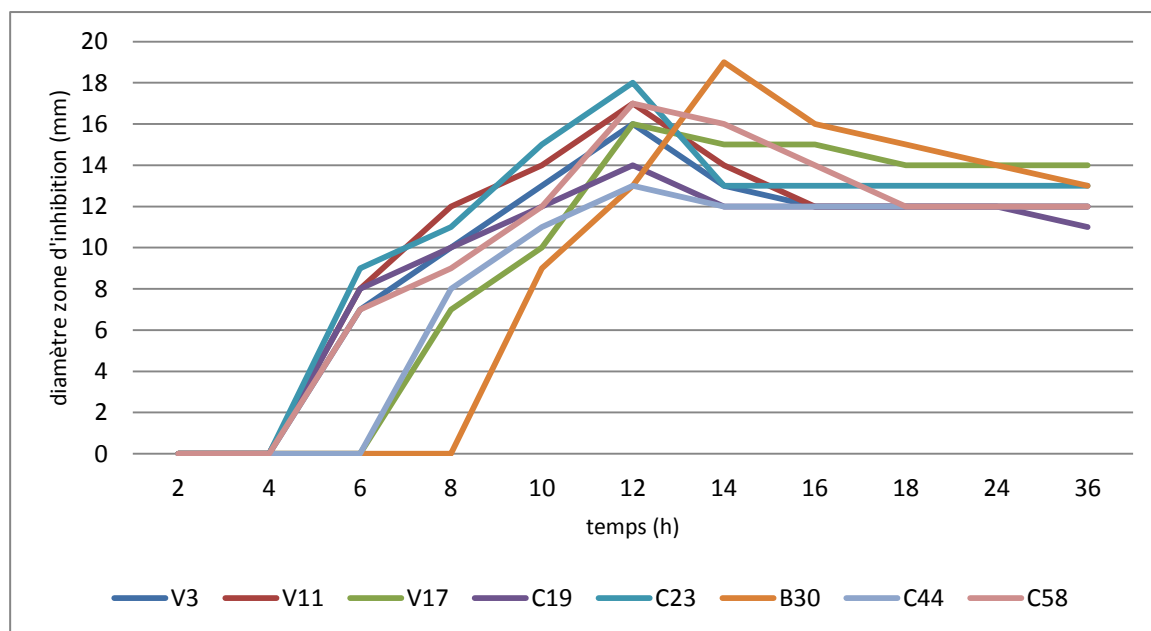


Figure 40 : Cinétique de production de l'agent inhibiteur des isolats bactériocinogènes

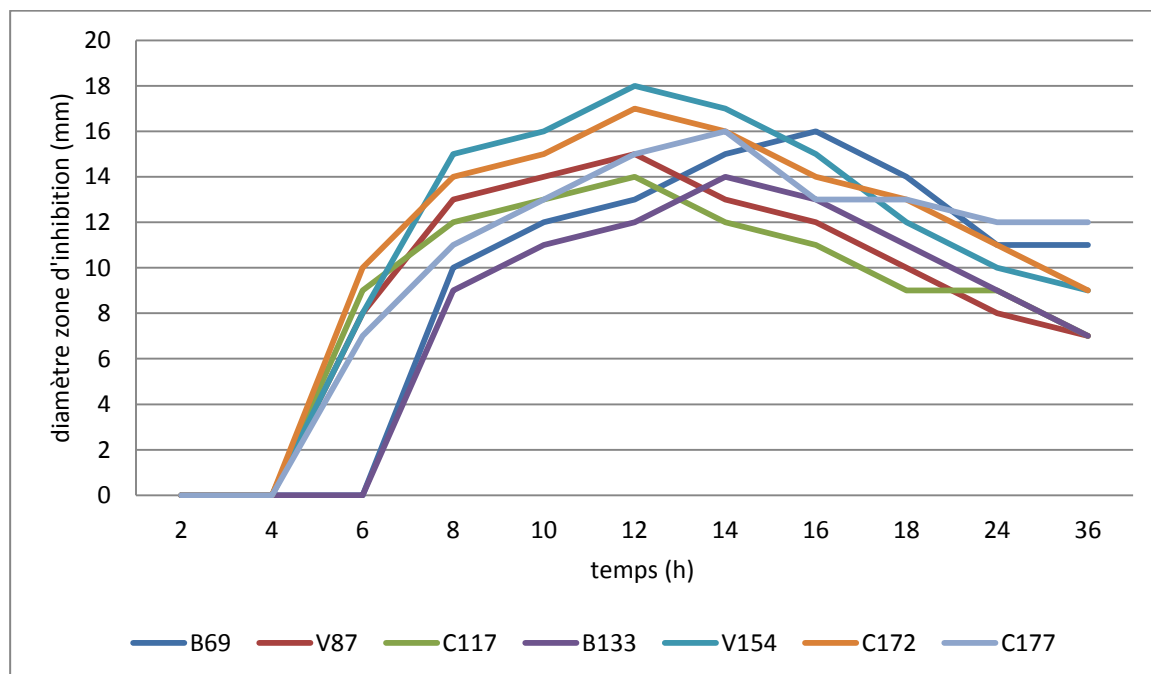


Figure 41 : Cinétique de production de l'agent inhibiteur des isolats bactériocinogènes

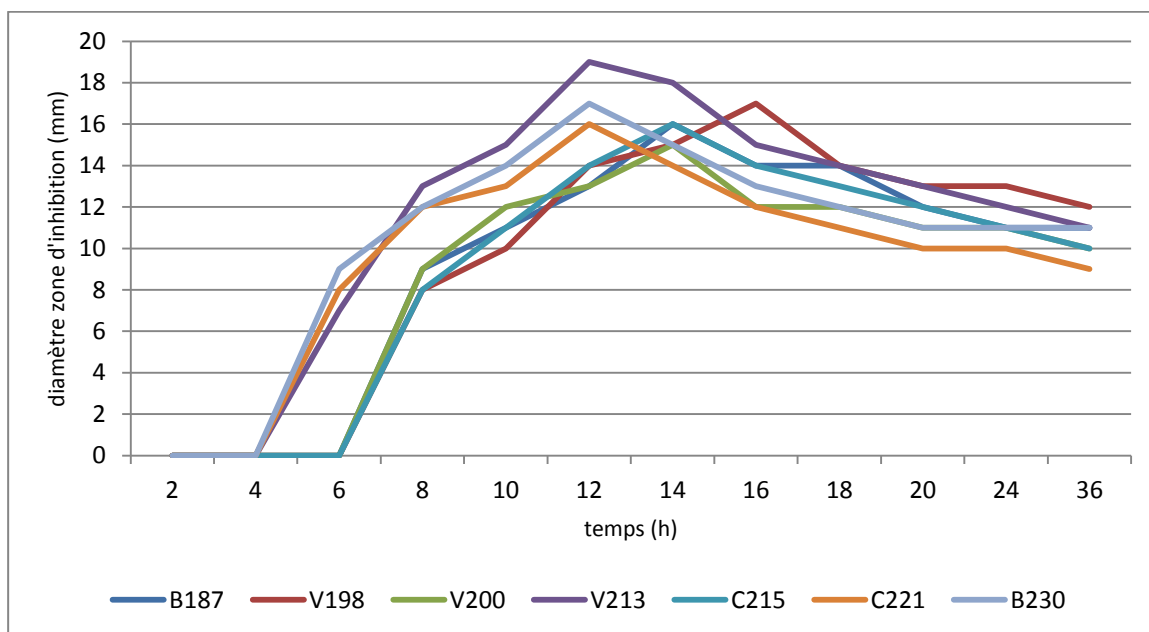


Figure 42 : Cinétique de production de l'agent inhibiteur des isolats bactériocinogènes

Les bactériocines de bactéries lactiques sont exprimés sous forme d'un pré-peptide dont l'extension terminale, ou peptide leader, est clivé pour libérer la bactériocine au cours de l'étape de maturation. Cette maturation se déroule pendant ou immédiatement après la sécrétion de la molécule. C'est donc la pré-bactériocine qui est reconnue par la (ou les) molécule(s) qui va transférer le peptide à travers la membrane bactérienne. Mis à part quelques bactériocines de classe II.

La diminution du diamètre de la zone d'inhibition après une valeur maximale après la phase exponentielle de croissance est due principalement à la régression de l'activité de ces substances à cause de l'acidité du milieu. Le pH acide du milieu perturbe la perméabilité membranaire et par la suite la maturation et la sécrétion de l'agent inhibiteur dans le milieu extérieur (Gänzle et al. 1999).

6. Comportement des souches vis-à-vis des conditions du tractus gastro intestinale

6.1 Résistance au pH des isolats retenus

Le comportement des isolats vis-à-vis de différents pH bas est représenté dans la figure 43. La plupart des isolats, à l'exception des *Leuconostoc*, ont montrés une tolérance du pH de l'estomac avec un taux de survie remarquable chez les lactobacilles.

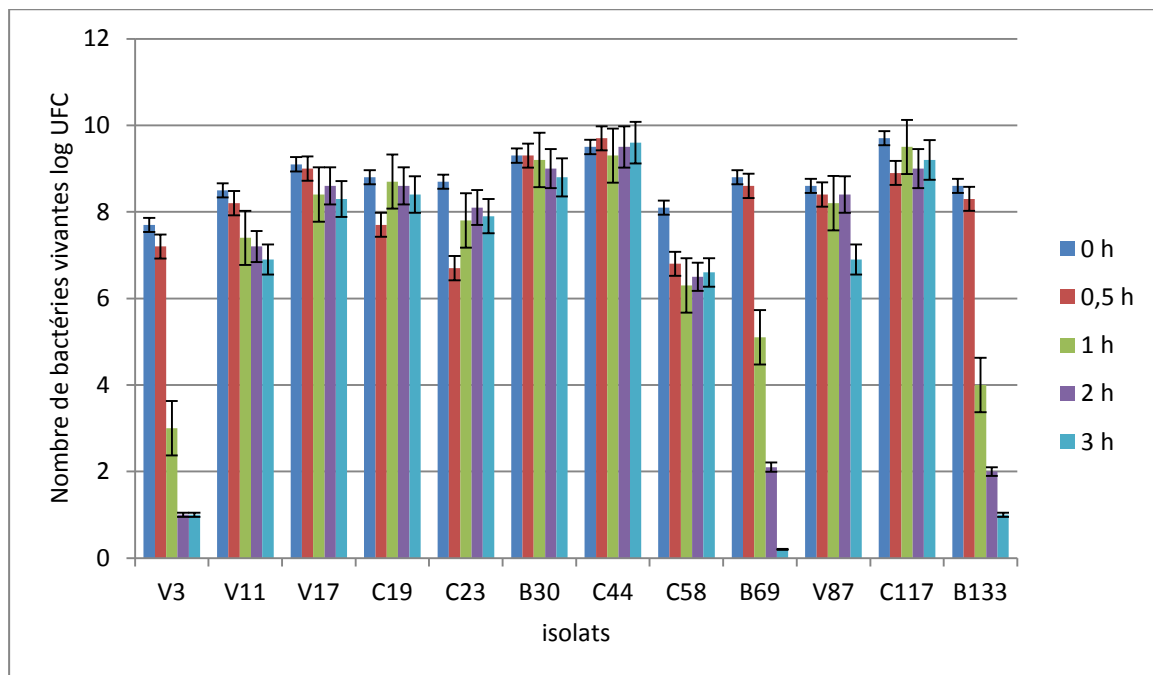


Figure 43 : tolérance au pH des isolats lactiques bactériocinogènes

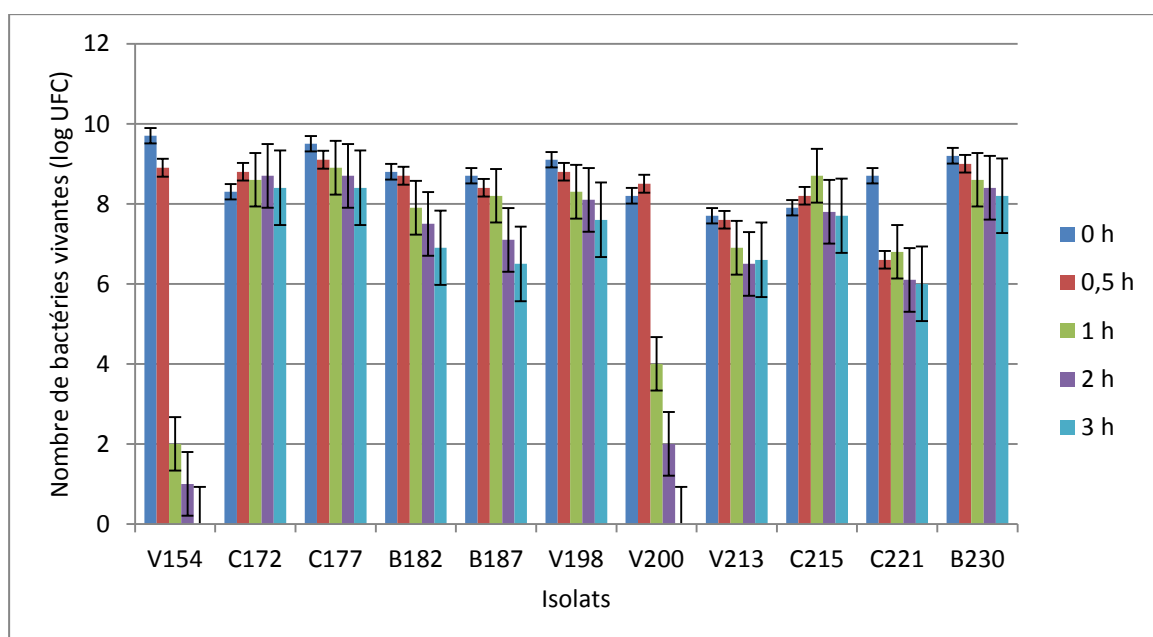


Figure 44 : tolérance au pH des isolats lactiques bactériocinogènes

L'ensemble des isolats a montré une survie importante à pH 2 quel que soit la durée de contact. Nous avons remarqué une diminution significative dans le nombre de bactéries viables pour 3 isolats seulement il s'agit de C23, C58 et C221 après 30 minutes de contact avec le milieu acide. Pour les autres isolats une légère réduction est observée à l'exception des isolats C44, C172 et C215 pour lesquels une faible augmentation a été observée.

Plusieurs travaux menés sur la survie in vitro de bactéries lactique à des pH similaires à ceux de l'estomac ont montré l'aptitude de ces microorganismes à résister à ces conditions défavorables (Conway et al., 1987; Marteau et al., 1997 ; Prasad et al., 1998 ; Park et al., 2002 ; Fernández et al., 2003).

O'Sullivan et Condon (1997) ont montré une bonne résistance de la souche *Lc. lactis* ssp. *Cremoris* au pH acide dont la survie était de 100% à pH 4 après 2h d'incubation. Ils ont rapporté que la majorité des bactéries lactiques possèdent un mécanisme de tolérance en milieu acide, elles sont capables de survivre à des concentrations en acide létales.

Even et al. (2003) ont observé un effet important de l'acidification sur l'activité glycolytique des cellules. En conditions acides, le taux spécifique de consommation de glucose est augmenté, permettant ainsi un plus grand apport d'énergie ce qui permet aux bactéries lactiques de mieux résistées à pH acide.

Les résultats d'une étude menée par Mc Donald et al. (1990) révèlent un arrêt de la croissance des souches de *Ln. mesenteroides* et *Lb. plantarum* à pH voisin de 3. D'autre part, les travaux de Mathara et al. (2008) ont montré une tolérance élevée des souches de *Lactobacillus* sp. aux pH 2.5 et 2 après 2h d'incubation.

6.2. Survie en présence des sels biliaries

Les résultats du comportement des isolats vis-à-vis de différente concentration des sels biliaries sont regroupés dans le tableau 11.

18 isolats qui ont montré une survie au pH 2 sont testées dans un milieu contenant une concentration de 0,5% en sels biliaries et la survie a été suivie à 1h, 2h et 3h. Les résultats obtenus montrent une tolérance de ces conditions par 16 isolats lactiques. Les deux souches qui ont perdus leur survie en présence de sels biliaries sont V198 *lactococcus lactis subsp lactis* et B230 *lactococcus lactis subsp cremoris*. Les autres isolats lactiques ont pu survivre avec un taux important quel que soit le temps de contact. Les taux les plus importants de survie sont observés chez les lactobacilles.

Tableau 11: survies des isolats en présence des sels biliaries

Isolats lactiques	Durée de contact avec les sels biliaries à 0,5%			
	0h	1h	2h	3h
V11	+	+	+	+
V17	+	+	+	+
C19	+	+	+	+
C23	+	+	+	+
B30	+	+	+	+
C44	+	+	+	+
C58	+	+	+	+
V87	+	+	+	+
C117	+	+	+	+
C172	+	+	+	+
C177	+	+	+	+
B182	+	+	+	+
B187	+	+	+	+
V198	+	+	-	-
V213	+	+	+	+
C215	+	+	+	+
C221	+	+	+	+
B230	+	+	-	-

+ croissance positive, - pas de croissance

Kimoto-Nira et *al.* (2009) ont rapporté que les facteurs influençant la résistance des lactocoques à la bile sont associés à la composition du milieu de croissance. Ils ont prouvé que la résistance à la bile de quelques souches de *Lactococcus* a été changée quand le sucre dans le milieu est changé du glucose en lactose. En d'autres termes, l'exclusion de la bile par les bactéries exige de l'énergie. Les hydrates de carbone qui sont facilement ou rapidement métabolisés pour apporter cette énergie, augmentent la résistance aux sels biliaries. D'autre part, et comme la bile est un détergent, la résistance aux sels biliaries semble être associée à la stabilité de la membrane cellulaire.

Des résultats observés par Burns et *al.* (2008) ont montré que la plus part des souches de *Lb.*

delbrueckii ssp. *bulgaricus* et *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* sont sensibles aux sels biliaries. De même Zago et *al.* (2011) ont révélé une moyenne de survie de 40% chez des lactobacilles isolés à partir de lait et du fromage.

6.3. Adhésion *in vitro* aux cellules épithéliales de l'intestin grêle et du côlon

Comme l'étude de l'adhésion aux cellules épithéliales *in vivo* est difficile à réaliser, l'adhésion *in vitro* est le model le plus utilisé (Gu et *al.*, 2008). Dans notre étude nous avons utilisé des cellules épithéliales d'origine animale (cellules épithéliales de poulet de chair).

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 12.

Tableau 12 : capacité d'adhésion aux tissus épithéliaux de souches retenus

Isolats lactiques	Iléum	Côlon
V11	+	+
V17	++	++
C19	+	+
C23	+	+
B30	++	++
C44	+	+
C58	++	++
V87	+	+
C117	++	++
C172	-	-
C177	+	+
B182	+	+
B187	-	-
V198	+	+
V213	+	++
C215	-	-
C221	+	++
B230	+	+
+ adhésion, ++ bonne adhésion, - absence d'adhésion		

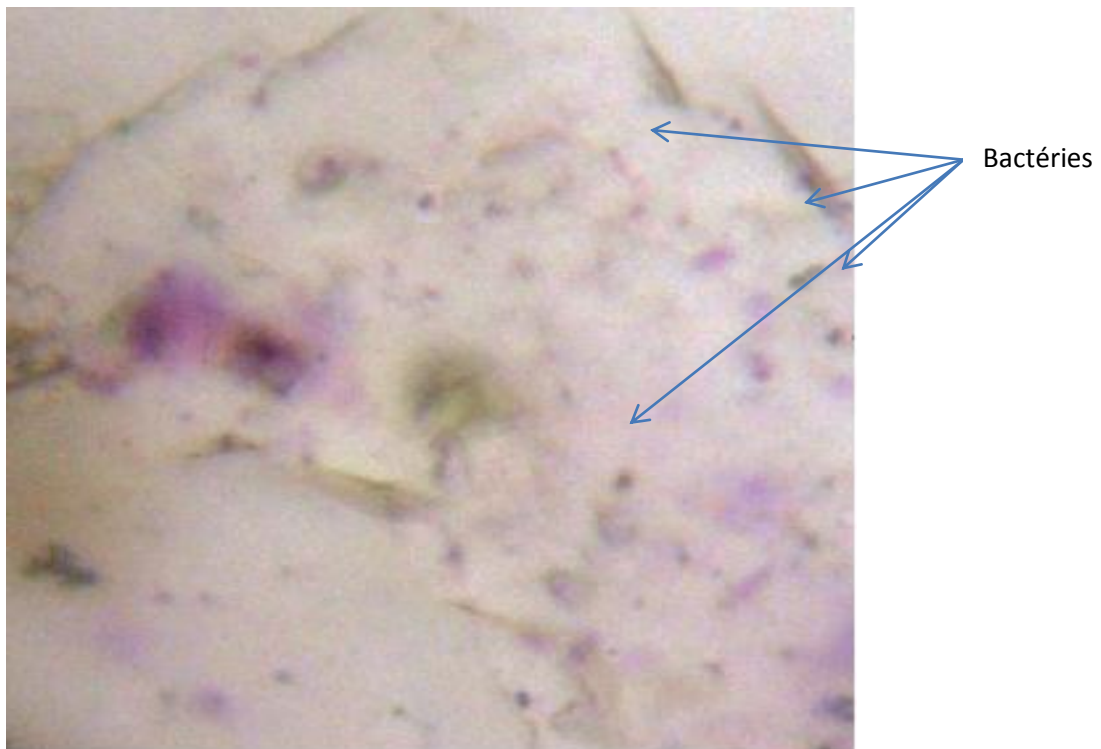


Figure 45 : résultats du test d'adhésion d'une souche lactique (V11) au tissu épithélial du côlon

Parmi les 18 souches testées, 15 ont présenté une adhésion aux cellules épithéliales de l'iléum et du colon de poulet de chair. Les souches C172, B187 et C215 n'ont montré aucune capacité d'adhésion. Les deux souches C172 et B187 sont identifiées comme étant *Leuconostoc lactis* et *Leuconostoc mesenteroides* alors que la souche C215 est une *Lc.Lactis* subsp. *Lactis*. biovar. *diacétylactis*.

L'adhésion aux cellules épithéliales humaines est un test important suggéré pour l'évaluation du pouvoir probiotique des souches lactiques (Schillinger et al., 2005 ; Guglielmotti et al., 2007). Cette colonisation est nécessaire pour exercer leurs effets bénéfiques par l'inhibition des bactéries indésirables et la stimulation du système immunitaire. Les probiotiques pourraient agir en limitant l'implantation des germes pathogènes par compétition au niveau des sites de fixations pour la colonisation (Robin et Rouchy, 2001).

D'après certains auteurs, l'origine des probiotiques joue un rôle dans les capacités d'adhérence, il a été trouvé que les bactéries d'origine humaine peuvent adhérer mieux aux muqueuses intestinales de l'homme (Gu et al., 2008). Cependant Kimoto-Nira et al. (2009)

ont constaté que des souches de *Lactococcus* (*Lc. lactis* ssp. *lactis* et *Lc. lactis* ssp. *cremoris*) isolées à partir de divers produits laitiers, peuvent adhérer aux cellules épithéliales intestinales humaines.

6.4. Résistance aux antibiotiques

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques grâce à leur structure et physiologie (Temmerman et al., 2003). La résistance des probiotiques aux antibiotiques peut poser un problème si elle peut être transmise à des pathogènes chez lesquels la résistance thérapeutique pourrait avoir des conséquences néfastes. L'utilisation de différentes souches lactiques en tant que probiotiques doit faire l'objet de travaux extrêmement attentifs (Marteau et al., 2004). De même l'autorité Européenne de Sécurité Alimentaire, suggère que les probiotiques ne doivent pas avoir une résistance acquise aux antibiotiques (Zago et al., 2011).

Les résultats de l'antibiogramme des isolats lactiques retenus sont représentés dans le tableau 13. La lecture a été faite en utilisant les abaques de lecture spécifiques pour chaque type d'antibiotique et à une dose bien déterminée. Ce test a permis de constater que nos souches ont une sensibilité remarquable à la plupart des antibiotiques commercialisés et administrés pour le traitement de différentes maladies. Le résultat intermédiaire indique que à cette dose commercialisée, la souche a une résistance à cet antibiotique ce qui nécessite l'augmentation de la concentration administrée.

Tableau 13 : résultats du test d'antibiogramme des isolats

Antibiotique s																		
	Isola ts	Ampicilline	Ticarcline	Céfazoline	Cefuroxime-axétil	Ciprofloxacine	Colistine	Fosfomycine	Pristinamycine	Aztréonam	Kanamycine	Ofloxacine	Sulfamide	Acide nalidixique	Streptomycine	Amoxicilline	Tétracycline	Spiromycine
V3	S	I	I	R	S	I	I	R	S	I	S	I	R	R	I	I	S	R
V11	S	I	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R	S	R
V17	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	I	R	S	I	S	I	S
C19	I	S	I	I	S	I	I	R	S	I	R	I	R	S	I	I	R	S
C23	I	S	I	R	S	I	I	R	S	I	R	I	I	I	I	I	R	I
B30	S	I	I	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
C44	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	R	S	I	S	S	S	R	S
C58	I	S	S	R	S	R	I	R	S	R	R	I	I	I	I	R	R	I
B69	I	S	I	I	S	R	I	I	S	R	R	I	R	R	I	R	R	R
V87	I	S	R	R	I	I	I	R	S	I	I	I	R	R	I	I	I	R
C117	S	S	I	S	S	I	R	R	S	I	R	R	R	S	R	I	R	S
B133	S	I	I	R	S	I	R	I	S	I	S	R	I	I	R	I	S	I
V154	I	S	I	R	S	R	I	I	S	R	S	I	I	I	I	R	S	I
C172	S	R	S	I	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R
C177	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S
B182	I	I	R	S	S	R	I	I	S	R	R	I	R	R	I	R	R	R
B187	I	S	S	R	S	R	I	I	S	R	S	I	R	R	I	R	S	R
V198	I	S	S	S	R	I	I	R	S	I	R	I	I	I	I	I	R	I
V200	S	I	R	R	S	I	R	R	S	I	S	R	R	R	R	I	S	R
V213	S	S	S	S	S	I	S	R	S	I	R	S	I	S	S	I	R	S
C215	I	S	I	R	S	R	I	R	S	R	R	I	R	R	I	R	R	R
C221	I	S	S	R	S	R	I	R	S	R	R	I	R	R	I	R	R	R
B230	I	I	S	S	S	I	I	R	S	I	R	I	R	R	I	I	R	R

S : sensible, R : résistante , I : intermédiaire

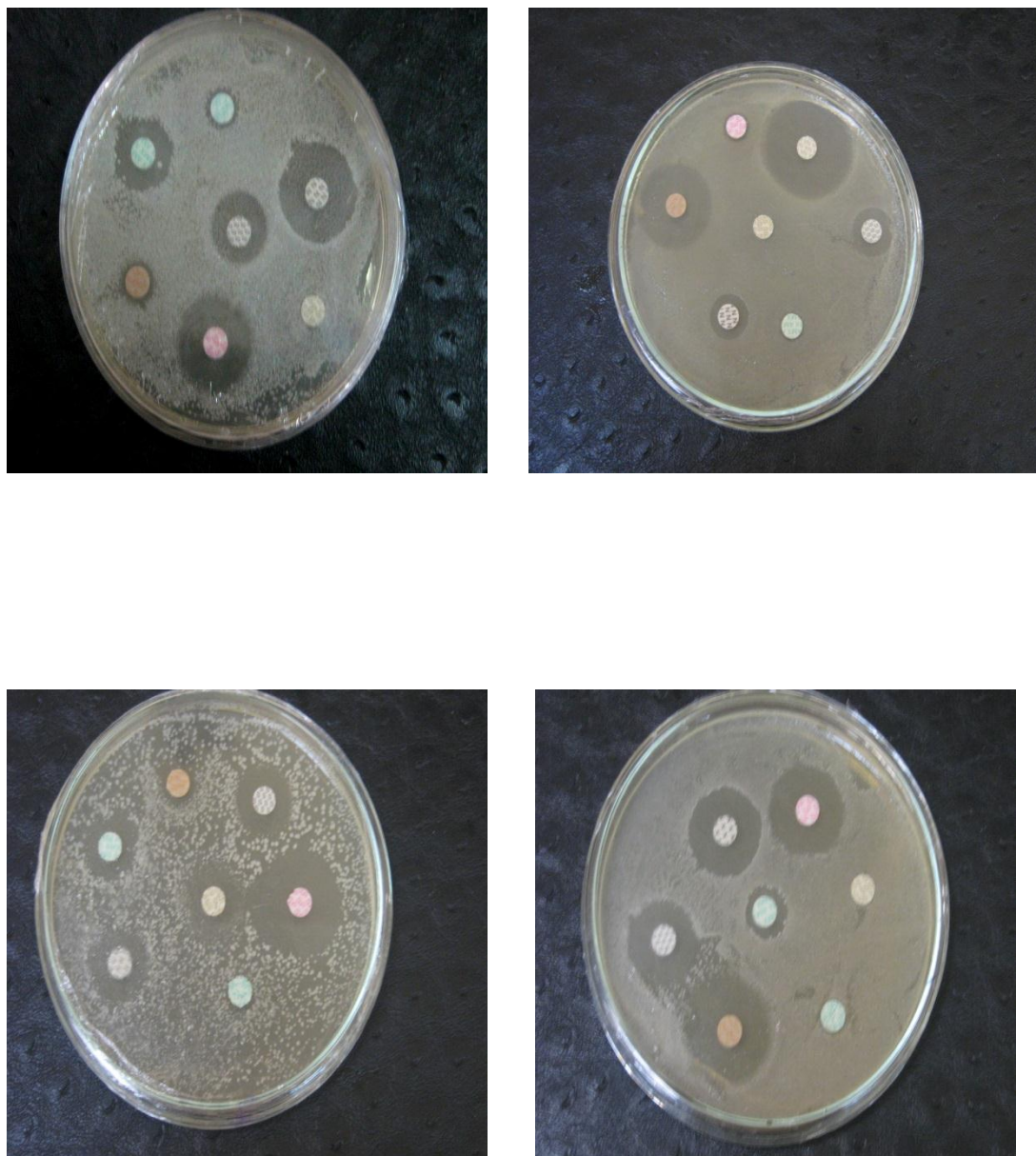


Figure 46 :Résultats de l'antibiogramme de quelques isolats lactiques .

Les résultats obtenus montrent qu'une seule souche a une résistance à l'Ampicilline (V17), et une seulement pour le Ticarcilline (C172) ainsi que pour l'Aztréonam (B30). Deux isolats seulement ont présenté une résistance à la Ciprofloxacine (C44 et V198). La majorité des souches sont résistantes à l'acide nalidixique, l'Ofloxacine et à la Pristinamycine. La souche B30 a présenté une résistance à la plupart des antibiotiques testés (13/19). Les deux isolats C215 et C221 sont résistants à 10 antibiotiques parmi les 19 testés alors que le reste des isolats ont montré une résistance à un nombre d'antibiotiques compris entre 3 et 8. La souche V17 n'a présenté une résistance qu'à deux antibiotiques (acide nalidixique et Ampicilline).

Essid *et al.*, (2009) travaillant sur les lactobacilles, ont observés que presque la totalité des souches sont sensible à l'amikacin (30 lg), la cefuroxime (30 lg), la gentamicin (10 lg), la norfloxacine (10 lg) et la streptomycine (10 lg). Ces mêmes auteurs trouvent 88.2% et 82.3% des souches résistante à l'erythromycin et la rifampicin respectivement. 70.5% de leurs souches étaient résistantes à l'ampicillin et la penicillin G. Nguyen *et al.*, (2007) trouvent qu'une souche de *Lactobacillus plantarum* est résistante à la tetracycline, la gentamicine et la penicilline et sensible à l'erythromicine et l'ampicilline.

Gevers *et al.*, (2003) trouvent que 100%, 79% et 64% des bactéries lactiques isolées des saucisses fermentées et séchées sont résistantes à la tetracycline, la gentamicine et la penicilline respectivement. Il faut savoir qu'avant d'utiliser un ferment lactique, il est important de vérifier que les souches bactériennes ne peuvent transférer des gènes de résistance (Mathur & Singh, 2005).

Plusieurs études ont montré la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques (Botes *et al.*, 2008). La résistance de souches de *Leuconostoc* sp. à la Vancomycine, Gentamicine et au Chloramphénicol a été bien élucidée. De même que pour des espèces de *Lactococcus lactis* qui ont présenté une résistance à l'Ampicilline et la Vancomycine (Ogier *et al.*, 2008).

Il est nécessaire avant de lancer une culture d'amorçage ou un produit probiotique de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne contiennent pas des gènes de résistance aux antibiotiques (Ammor et Mayo, 2007). Mais le criblage de telles souches pour la reconstitution de ferments lactiques n'est pas encore entrepris actuellement, à cause de la difficulté de l'évaluation *in vivo* du potentiel de transfert de gènes de résistance.

Conclusion

Conclusion

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation d'aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de ferments et elle est en développement continu.

Le but de cette étude était de mettre en place une collection de souches de bactéries lactiques indigènes ayant des applications alimentaires et sanitaires. A l'issue de ce qui a été réalisé, deux-cent trente-trois (233) isolats lactiques ont été pré identifiés dans le stade de genre, parfois des espèces, et testé pour leur pouvoir inhibiteurs des souches pathogènes impliquées dans les toxi-infections alimentaires et/ou dans des problèmes technologiques. Soixante-huit (68) isolats bioactives ont montré un effet inhibiteur contre au moins une bactérie indicatrice utilisée dans cette étude.

La détermination de la nature de l'agent inhibiteur a permis de retenir vingt-trois isolats bactériocinogènes.

L'identification des souches a été réalisée par la détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques. L'identification biochimique a permis d'identifier nos 23 isolats comme étant des *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (4 isolats), *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. biovar. *diacétylactis* (4 isolats), *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* (3 isolats), *Streptococcus thermophilus* (3 isolats), *Lactobacillus casei* (2 isolat), *Lactobacillus plantarium* (2 isolats), *Leuconostoc lactis* (2 isolat), *Leuconostoc mesenteroides* (2 isolat), *Lactobacillus rhamnosus* (1 isolat). La technique moléculaire Rep-PCR a confirmé l'appartenance des isolats aux différents groupes lactiques.

Les bactériocines produites par ces derniers isolats sont toutes thermostables à un traitement de 80°C et 100°C pendant 20 min alors qu'aucune n'a gardé son effet sous un traitement de 120°C pendant 20 min. L'étude de la cinétique de production de l'agent inhibiteur a révélé un début de production pendant de la phase exponentielle de croissance des bactéries (après 8h à 10h d'incubation) avec un maximum situé entre 14h et 16 h.

Les 23 isolats retenus pour leur effet bactériocinogène ont tous, à l'exception des *Leuconostocs*, montré une tolérance au pH 2 et aux sels biliaries avec un bon comportement des lactobacilles. Un pourvoir adhésif important a été également marqué pour 19 isolats avec un taux moins important chez les 4 *Leuconostocs*.

Les cinq souches identifiées comme étant des lactobacilles (V17, B69, C117, V154 et C177) ainsi que les trois souches identifiées comme étant des *Streptococcus thermophilus* (B30, C58 et V87) ont toutes montré une bonne capacité d'adhésion aux cellules épithéliales *in vitro*. Ces souches peuvent donc être des bonnes candidate en tant que probiotiques. Ces souches méritent d'être à l'origine d'un sujet de recherche *in vivo* pour vérifier leur impact sur la microflore intestinale.

La caractérisation de l'agent inhibiteur en utilisant les techniques chromatographiques et moléculaires permettra d'avoir une autre finalité. En effet les agents inhibiteurs produits par la souche V17 identifiée comme *Lactobacillus casei* et par la souche V213 identifiée comme étant *Lactococcus lactis* Subsp *deacetylactis* ont montré une bonne thermo résistance. Ce traitement (120°C pendant 20 minutes) est le plus sévère contre les germes nuisible ce qui donne l'opportunité à ces substances pour des utilisations comme bio conservateurs dans des produits appertisés.

Références

bibliographiques

- Abdelgadir, W.S., Hamad, S.H., Möller, P.L., Jakobsen, M., (2001). Characteristics of the dominant microbiota of Sudanese fermented milk. *Rob. Int. Dairy J.*, 11: 63-70.
- Afnor (1975). Contrôle de la qualité des produits laitiers : analyses physiques et chimiques. Méthode II-3. *AFNOR-ITSV*. 123-124.
- Afssa, (L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments), (2003). Rapport du groupe de travail « Alimentation infantile et modification de la flore intestinale ».
- Alonso-Calleja, C., J. Carballo, R. Capita, A. Bernardo and M.L. Garcia-Lopez, (2002). Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* strains isolated from goat's milk and Valdeteja cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 34 : 134-138.
- Amann R.I., Ludwig W. and Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 143–169
- Ammor M.S. et Mayo B., (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science.* 76 : 138-146.
- Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Pre´vost, H., Dousset, X., Zagorec, M., et al. (2005). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, 22, 373–382.
- Armuzzi A, Cremonini F, Bartolozzi F, Canducci F, Candelli M, Ojetti V. (2001). The effect of oral administration of *Lactobacillus GG* on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 15:163e9.
- Arnal A., (1999). Propriétés technologiques du lait de vache et de chèvre. Thèse , ENITAC, p65- 80.
- Aslim, B., Yuksekdog, Z. N., Sarikaya, E., & Beyatli, Y. (2005). Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT e Food Science and Technology*, 38(6), 691e694.
- Auldish, M.J., Walsh, B.J. and Thomson, N.A. (1998). Seasonal and lactational influences on milk composition in New Zealand. *Journal of Dairy Research* 65.
- Axelsson, L. (2004). Classification and physiology In: *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. Salsinen S., Wright A.V., Ouwehand A. 3e Ed. New York, Marcel Dekker, Inc. 633: 1 - 66.

- Badis,A.,Laouarbdia Selami,N.,Guertarni,D., Kihal,M., et Ouzrout,R.,(2004). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partie du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabile ». *Sciences et Technologie*. 23: 30-37.
- Baliarda A., (2003). evaluation de la reponse au stress chez les bacteries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* approches physiologiques et genetiques. Thèse de Doctorat spécialité science des aliments et nutrition. Université de Bordeaux 1. France.
- Bayoub K., Elotmani F., Assobhei O., Jaoua S., et Soukri A. (2006). Contribution à l'étude des bactériocines produites par des souches isolées du lait fermenté traditionnel « Raib ». Substances naturelles et environnement. Congrès International de Biochimie. Agadir.
- Bekhouche F. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes Pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique.
2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat. U. costantine.
- Bendimerad N., Kihal M. & Berthier F., (2012). Isolation, identification, and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation. *Dairy Sci. & Technol.* 92:249-264
- Bendimerad, N., (2013). Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type «Jben». Thèse de Doctorat en Microbiologie alimentaire. Université de Tlemcen.
- Bensoltane, A., Yagoubi, A., Mahi, M., and Cheriguene, A. (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian butter. *Egypt. J. Appl. Sci.*, 19(11B): 604-614.
- Bernardeau M., Micheline G et Paul J. (2006). Beneficial *Lactobacilli* in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific realistic safety assessment. Laboratoires de Microbiologie alimentaire. ISBIO. Université de Caen basse- Normandie, Caen. France.
- Beukes, E.M., B.H. Bester and J.F. Mostert, (2001). The microbiology of South African traditional fermented milks. *Int. J. Food Microbiol.*, 63: 189-197.
- Bey F. (2009). Etude de l'interaction antagoniste entre *Lactobacillus* sp. et quelques souches d'entérobactéries. Mémoire de Magister Option: Microbiologie Alimentaire. Université d'Oran Es-Senia Faculté des Sciences Département de Biologie.

- Bhunja, A. K., Jonson, M. C., Ray, B., & Kalchayanand, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 25–30.
- Boclé JC (2005). Effects of probiotics and prebiotics on flora and immunity in adults. Afssa, pp. 59-128.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. & Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* 11,731–753.
- Botes M., van Reenen C.A. et Dicks L.M.T., (2008). Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastro-intestinal model with infant milk formulations as substrate. *Int. J. Food Microbiol.* 128 : 362-370.
- Bourgeois CM et Larpent JP. (1996). Microbiologie alimentaire. Aliment fermenté et fermentation alimentaire. Tome1. Chapitre I. Edition Lavoisier. Pp : 24-29.
- Bourgeois CM., Mescle J-F et Zucca J. (1996). Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome1. Chapitre II. Les toxi-infections et les intoxications. Edition Lavoisier.
- Bourlioux, (1998) : Composition et rôles de la flore intestinale. Département de Microbiologie – Immunologie. Faculté de Pharmacie - Université Paris-Sud
- Bouton, Y., L. Tessier, T.P. Guyot and E. Beuvier, (2005). Relationships between dairy farmer practices and the level of microbiological population in milk used for Comté cheese making). *Proc. 12th Rencontres Recherche Ruminants Conf.*, 403-403.
- Brul S et Coote P. (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* Pp: 1-17.
- Burns P., Vinderola G., Binetti A., Quiberoni A., de los Reyes-Gavilan C.G. et Reinheimer J., (2008). Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *Int. Dairy J.* 18 : 377-385.
- Byczkowski J. et Gessner T. (1998). Biological role of superoxide ion-radical. *International journal of Biochemistry.* Pp: 569.

- Callewaert T. & De Vuyst L., (2000). Bacteriocin production with *L. amylovorus* DCE471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(2), 606-613.
- Callon, C., F, Duthoit., C, Delbes., M, Ferrand., Y, Le Frileux., R, De Cremoux and M.C. lactic acid bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84 : 197-215
- Canducci F, Cremonini F, Armuzzi A, Di Caro S, Gabrielli M, Santarelli L, et al. (2000). A lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates. *Aliment Pharmacol Ther.* 14:1625e9.
- Canzi Enrica, Maria Cristina Casiraghi, Raffaella Zanchi, Raffaella Gandolfi, Annamaria Ferrari, Furio Brighenti, Riccardo Bosia, Anna Crippa, Paolo Maestri, Renata Vesely, Bruna Bianchi Salvadori, (2002). Yogurt in the diet of the elderly: a preliminary investigation into its effect on the gut ecosystem and lipid metabolism .DOI: 10.1051/lait:2002044.
- Caplice E et Fitzgerald G. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* Pp: 131-149.
- Carolissen-Mckay, V., Arendse, G., & Mastings, J. W. (1997). Review article. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International Journal of Food Microbiology*, *34*, 1–16.
- Château G, N., Larpent. J.P., Castellanos, M.I., Larpent, J.L., (1994). Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Lavoisier, Tec et Doc (ed). Paris, France, 1-192.
- Chen Y.S., Srionnual S., Onda T. & Yanagida F., (2007). Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, **45**, 190-193.
- Cherbut C., Aube, A. C., Blottiere, H. M., and Galmiche, J. P. (1997). Effects of short-chain fatty acids on gastrointestinal motility. *Scand J Gastroenterol* 222 (Suppl), 58-61.
- Cherbut C., Aube, A. C., Blottiere, H. M., and Galmiche, J. P. (2000). Effects of short-chain fatty acids on gastrointestinal motility. *Scand J Gastroenterol* 222 (Suppl), 58-61.
- Cherbut, C., Michel, C., and Lecannu, G. (2003). The prebiotic characteristics of fructooligosaccharides are necessary for reduction of TNBS-induced colitis in rats. *J Nutr* *133*, 21-27.

- Cheriguene A., Chougrani F. et Bensoltane A., (2006). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from goat's Algerian milk. *Pakistan J. Biol. Sci.* 9(7) : 1242-1249.
- Chilliard, Y., (1997). Caractéristiques biochimiques des lipides du lait de chèvre : comparaison avec les laits de vache et humain. Intérêt nutritionnel du lait de chèvre. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 59: 1-51.
- Chye, F. Y., Aminah, A. and Ayob, M. A. (2004). Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology* 535-541.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi- Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Reac, M.C. and Rodriguez, E. (1997). Characterization of lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64: 409–421
- Collado MC, González A, González R, Hernández M, Ferru's MA, Sanz Y. (2005) Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents*; 25:385e91.
- Collins, M.D., Farrow J.A.E., Phillips, B.A. and KANDLER, O. (1983). *Streptococcus garviae* sp. Nov. and *Streptococcus plantarum* sp. Nov. *Journal of General Microbiology*, 129, pp: 3427-3431.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L., Goldin, B.R., (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70 (1), 1e12.
- Corey J.C et Lepage M. (1991). Fromage fermiers, techniques et traduction. Rustique. Paris. Pp: 152-157.
- Corrieu G. (2003). Bactéries lactiques et probiotiques. Définition des bactéries lactiques. Collection Sciences&Techniques agro-alimentaires. Edition TEC&DOC, Lavoisier.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*, 3(10): 777–788.
- Crow, V.C., Coolbear, T., Holland, R., Pritchard, G.G., Martley, F.G., (1993). Starters as finishers: starter properties relevant to cheese ripening. *Int. Dairy J.*, 3: 423-460.

- Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., & Simard, R. E. (1993). Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 166–173.
- Dacosta Y. (2000). La bio-protection des aliments. L'antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologique. Rappel de données indispensables. Edition YVES DACOSTA, Paris.
- Dalache F. (2006). Effets inhibiteurs des bactéries lactiques. Bactériocine de *Lactococcus* et *Enterococcus*: mise en évidence d'un support plasmidique. Thèse de doctorat d'état en biologie (biologie moléculaire et génétique). Université Mostaganem.
- Davidsson T., Carlen B, Bak-Jensen E., Willen R. and Mansson W., (1983). Morphologic Changes in Intestinal Mucosa with Urinary Contact--Effects of Urine or Disuse. *Urology*. 156 (1) : 226-232.
- De Man, J.C., Rogosa, M. and Elisabeth Sharpe, M. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130–135
- De Roissart H et Luquet F.M. (1994). Bactéries lactiques. Intérêt Agro-alimentaire des bactéries lactiques. Vol 1. eds Lorica. Pp : 25-428.
- De Vuyst L., Callewaert R. & Crabbé K., (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *L. amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, **142**, 817-827.
- Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C. & Ross P., (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, **16**, 1058-1071.
- Dellaglio F, de Roissard H, Torriani S, Curk MC, Janssens D., (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Dans: *Bactéries lactiques*. Vol 1.
- Denohue D.C., (2004). Safety of novel probiotic bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 531-546.
- Descheemaeker, P., Lammens, C., Pot, B., Vandamme, P. and Goossens, H. (1997). Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA

- fragments for identification of enterococci important in human medicine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 555-561.
- Desmasures N, Bazin F, Guéguen M. (1997). Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *J. Appl. Microbiol.* 83, 53-58.
- Desmazeaud M.J. (1992). Les bactéries lactiques. Les groupes microbiens d'intérêt laitier. Eds Hermier J., J. Lenoir et F. Weber. CEPIL, Paris. P : 568.
- Desmazeaud M.J. et Gueguen, (1996). Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité. Vol.5. P : 331-280.
- Desmazeaud M.J. (1998). Bactéries lactiques et qualité des fromages. Qualité sanitaire des produits alimentaires. Laboratoire de recherches laitières. INRA Paris.
- Devoyod, J.J., et Pouillain, F., (1988). Les Leuconostocs. Propriétés: leur rôle en technologie laitière. *Le Lait.*, 68: 249-280.
- Devriese, L. A., Pot, B., Van Damme, L., Kersters, K. et Haesebrouck, F., (1993). Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.*, 26 : 187-197.
- Dicks, L.M.T., L. Fantuzzi, F.C. Gonzales, M. Du Toit and F. Dellaglio, (1993). *Leuconostoc argentinum sp.nov* isolated from argentine raw milk. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43: 347-351.
- Doleyres Y. (2003). Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technique des cellules immobilisées. Faculté des études supérieures de l'université Laval Québec. Pp:5-8.
- Dortu C et Thonart P. (2008). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Gembloux Agricultural University – FUSAGx. Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI). Belgique.
- Dortu C. (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique. Communauté française de Belgique.
- Dortu C. et Thonart P., (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Env.* 13(1) : 143-154.
- D'Souza, A. Rajkumar, C., Cooke, J., & Bulpitt, C.J. (2002). Probiotics in prevention of Antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *British Medical Journal* , 324 (7350), 1361-1364 .

- Eck A et Gillis J.C. (1997). Les levains lactiques. Le fromage. Tec & Doc Lavoisier. Pp : 175-194.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K. & Ishizaki A., (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 85-106.
- Essid I, Medini M, Hassouna M (2009). Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strain isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Sci.* 81:203-208.
- Even S., Lindley N.D. et Cocaign-Bousquet M., (2003). Transcriptional, translational and metabolic regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 grown in continuous acidic cultures. *Microbiology*.149 : 1935-1944.
- Fernandez L., Beerthuyzen M.M., Brown J., Coolbear T., Holland R. et Kuipers O.P., (2003). Cloning, characterization, controlled overexpression and inactivation of major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. *App. Env. Microbiol.*66 : 1360-1368.
- Fioramonti, J., Theodorou, V., and Bueno, L. (2003). Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17, 711-724.
- Fleming H.P., Etchells J.L. et Costilow R.N. (1975). Microbiological inhibition of isolate of *Pediococcus* from cucumber brine. *Appl. Environ. Microbiol.*Pp : 1040-1042.
- Foschino, R., A. Invernizzi, R. Barucco and K. Stradiotto, (2002). Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *Journal of Dairy Research*, 69 : 213-225.
- Franz, C.M., Huch, M., Abriouel, H., Holzappel, W., Gálvez, A., (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.*151 (2), 125e140.
- Fuller R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut*; 32: 439-442.
- Galvez A., Abriouel H., Lopez R.L. & Ben Omar N., (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, **120**(1-2), 51-70.
- Gänzle, M., Weber, S., Hammes, W., (1999). Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.*46, 207e217.
- Gänzle, M.G., Hertel, C., van der Vossen, J.M., Hammes, W.P., (1999). Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *Int. J. Food Microbiol.* 48 (1), 21e35.

- Garneau S., Martin N.I et Vederas J.C. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*. Pp: 577 – 592.
- Garrity G.M et Holt G.(2001). Taxonomic outline of the archaea and bacteria.P.155-166 in Borne D.R and. Canten R.W. Vol3. *Bergey manuel of systematic bacteriology 2ed vol 1*.
- Garvie, E.I., (1986). Genus *Leuconostoc*. In: Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, p: 1071-1075.
- Gaudichon, C., Roos, N., Mahe, S., Sick, H., Bouley, C., and Tomé, D. (1994). Gastric emptying regulates the kinetics of nitrogen absorption from 15N-labeled milk and 15N-labeled yogurt in miniature pigs. *J Nutr* 124, 1970-1977.
- Geis A. (1989). Antagonistic compounds produced by lactic acid bacteria. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*. Pp: 97-104.
- Gevers ,D., Huys, G., et Swings, J., (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205:31–36.
- Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2000 Aug;119(2):305-9.
- Giraffa G. (2003): Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 215–222.
- Gomez AMP, and Malcata FX. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus* : biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci Technol* 1999; 10: 139-157.
- Gourssand, (1985). Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses .2. Biochemical and sensory characteristics. *Lait* 77, 151-167.
- Gu R.X., Yang Z.Q., Li Z.H., Chen S.L. et Luo Z.L., (2008). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. *Anaerobe*.14 : 313-317.

- Gueguen M , Corroler, D., I. Mangin, and N. Desmasures, (1996). An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 : 4729-4735.
- Guessas et Kihal (2004), Guessas B. et Kihal M., (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African J. Biotechnol.*3(6) : 339-342.
- Guglielmotti D.M., Marco M.B., Golowezye M., Reinheimer J.A. et Quiberoni A.D.L., (2007). Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants.*Int. Dairy J.* 17 : 916-925.
- Guinane C.M., Cotter P.D., Hill C. & Ross P., (2005). A review: microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota of food. *J. Appl. Microbiol.*, **98**, 1316-1325.
- Hamama, A., (1992). Moroccan traditional fermented dairy products. In: Ruskin, F.R (Ed), *Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods*. National Academy Press, Washington, DC, pp 75-79.
- Hamilton-Miller JM. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection.*Int J Antimicrob Agents*. 2003 Oct;22(4):360-6. .
- Hardie J.M et Whiley,R.A. (1995). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J.App.Microbiology*
- Helander I.M., Von Wright A et MattilaSandholm T.M. (1997).Potential of lactic acid bacteria and Novel antimicrobials against Gram-negative bacteria.*Trends in Food Science and Technology*. Pp: 146-150.
- Holler, B.J., Steele, J.L., (1995). Characterization of lactococci other than *Lactococcus lactis* for possible as starter cultures.*Int. Dairy J.*, 5: 275-289.
- Holzappel W.H., Geisen R. et Schillinger U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes.*International Journal of Food Microbiology*.P: 343.
- Hsiao C., Siebert K. (1999). Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria.*Int. J. Food Microbiol.* Pp: 189-201.

- Hydrominus B., Le Marrec P., Hadj Sassi A. et Deschamps A., (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 61 : 193-197.
- Janssen M., Geeraerd A.H., Cappuyens A., Garcia-Gonzalez L., Schockaert G., Houteghem N.V., Vereecken K.M., Debevere J., Devlieghere F et Impe J. (2007). Individual and combined effects of pH and lactic acid concentration on *L. Innocua* inactivation: Development of a predictive model and assessment of Experimental Variability. *Appl. Environ. Microbiol.* Pp: 1601-1611.
- Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M. and Kersters, K. (1996). Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiol.* 142: 1881–1893.
- Jaubert G. (1997). Biochemical characteristics and quality of goat's milk. *CIHEAM, Options méditerranéennes*, 25, 71-74.
- Jenness, R., (1980). Composition and characteristics of goat milk: *J. Dairy Sci.*, 63: 605.
- Johansson, M. L., Molin, G., Petersson, B., Uhlén, M. and Ahrné, S. (1995). Characterization and species recognition of *Lactobacillus plantarum* strains by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of the 16S rRNA gene. *J. Appl. Bacteriol.* 79:536-541.
- Juillard V., Spinnler H.E., Desmazeaud M.J. et Boquien C.Y., (1987). Phénomènes de coopération et inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Le lait.* 67 : 149-172.
- Kacem M. et Karam N.E., (2006). Physicochemical and microbiological study of “shmen”, a traditional butter made from camel milk in the sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. *Gr. Y. Aceites.* 57(2) : 198-204.
- Kacem M., Zadi Karam H., Karam N., (2002). Bactéries lactiques isolées de lait de vache de chèvre et de brebis de l'Ouest algérien. 9èmes Rencontres Recherches Ruminants (3R), Institut de l'Élevage, INRA, Paris
- Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2003 May
- Kandler, O., Weiss, N., (1986). Regular, non-spore-forming Gram positive rods. In: Sneath, P.H.A., Mair, N., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1208–1234.

- Kim HJ, Camilleri M, McKinzie S, Lempke MB, Burton DD, Thomforde GM, Zinsmeister AR. (2003) A randomized controlled trial of a probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* Apr 1;17(7):895-904.
- Kimoto-Nira H., Kobayashi M., Nomura M., Sasaki K. et Suzuki C., (2009). Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition: Analysis by using different growth media. *Int. J. Food Microbiol.* 131 : 183-188.
- Klaenhammer T. R., (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Biological Rev.* Pp: 39 86.
- Klaenhammer T.R., (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**, 337-349.
- Klaenhammer T.R., Barrangou R., Logan Buck B. & Azcarate-Peril M.A., (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**, 393-409.
- Klaenhammer, T.R., Kullen, M.J., (1999). Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 45e57.
- Klein, G., (2001). International Committee of Systematic Bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and Related Organisms. Minutes of the Meeting. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 259-261.
- Kruisselbrink, A., Heijne Den Bak-Glashouwer, M. J., Havenith, C. E., Thole, J. E., and Janssen, R. (2001). Recombinant *Lactobacillus plantarum* inhibits house dust mite-specific T- cell responses. *Clin Exp Immunol* 126, 2-8.
- La Rosa M, Bottaro G, Gulino N, Gambuzza F, Di Forti F, Ini G, Tornambe E., (2003) [Prevention of antibiotic-associated diarrhea with *Lactobacillus sporogens* and fructo-oligosaccharides in children. A multicentric double-blind vs placebo study]. *Minerva Pediatr.* Oct;55(5):447-52.
- Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M., (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 144 : 237-250. *lactobacillus*sp. *TGR-2* isoleted from *Growol*. *Indonesian.Food Nutr.Prog.* 3(2) : 29-34.
- Lafarge, V., J.C. Ogier, V. Girard, V. Maladen, J.Y. Leveau, A. Gruss and A. Delacroix-Buchet, (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied Environ Microbiol.* 70 : 5644-5650.

- Lamine, F., Fioramonti, J., Bueno, L., Nepveu, F., Cauquil, E., Lobysheva, I., Eutamene, H., and Theodorou, V. (2004). Nitric oxide released by *Lactobacillus farciminis* improves TNBS-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 39, 37-45.
- Lamoureux L., (2000). Exploitation de l'activité β -galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. *National Library of Canada*. 23-47.
- Larpent J.P., (1997). Microbiologie alimentaire. *Tec & doc, Lavoisier*. Paris. 10-72.
- Lenoir-Wijnkoop J. et Hopkins R., (2003).The intestinal microflora, understanding the symbiosis.J *Appl microbiol* 90, 43-52.
- Leveau J.Y et Boiux M. (1993). Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. *Tec. Et Doc. Lavoisier*. Paris.
- Leveau J.Y., Boiux M. et De Roissart H.B., (1993). La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires. *2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 3 : 2-40.
- Lewis, S. J., Potts, L. F., & Barry, R. E. (1998).The lack of therapeutic effect of *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-related diarrhoea in elderly patients.*Journal of Infection*, 36(2), 171-174.
- Lin T.Y. et Chien M.F.C., (2007). Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food .Chem.* 100 : 1419-1423.
- Mahe, S., Marteau, P., Huneau, J. F., Thuillier, F., and Tomé, D. (1994).Intestinal nitrogen and electrolyte movements following fermented milk ingestion in man. *Br J Nutr* 71, 169-180.
- Marteau, P. and Boutron-Ruault, M. C. (2002). Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. *Br J Nutr* 87 Suppl 2, S153-S157.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., Huis In't Veld, J.H.J., (1997).Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J. Dairy Sci.* 80 (6), 1031e1037.
- Marteau P., (2003) Probiotics in clinical conditions. *Clin Rev Allergy Immunol*.Review.Jun;22(3):255-73.
- Marteau, P., Seksik, P., Lepage, P., and Doré, J. (2004).Cellular and physiological effects of probiotics and prebiotics.Mini-reviews in *Medicinal Chemistry* 4, 889-896.

- Mathara J.M., Schillinger U., Guigas C., Franz C., Kutima P.M., Mbugua S.K., Shin H.K. et Holzapfel W.H., (2008). Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 126 : 57-64.
- Mathara, J.M., U. Schillinger, P.M. Kutima, S.K. Mbugua and W.H. Holzapfel, (2004). Isolation, identification and characterization of the dominant microorganisms of *kule naoto*: The Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.*, 94: 267-278.
- Mathot,AG.,Kihal,M.,Prevost, H., et Divies, C., (1994) Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar media. *International Dairy Journal* 4 : 459-469.
- Mathur F. & Singh H. , (2005). Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatr Surg Int* 18, 586-590.
- McAuliffe O. & Hill C., (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**, 285-308.
- McDonald L.C., Fleming H.P. et Hassan H.M., (1990). Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *App. Env. Microbiol.* 56(7) : 2120-2124.
- Medina, R., Katz, M., Gonzalez, S., Oliver, G., (2001). Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. *J. Food. Prot.*, 64 (4): 559-563.
- Michel V, Hauwuy A, Montel MC, Coulon JB, Chamba JF. (2005). Pratiques d'élevage et composition microbienne des laits crus. Symposium International Territoires et Enjeux du développement régional, 9- 11 mars, Lyon.
- Millette M., Luquet F.M. et Ruiz M.T., (2008). Characterization of probiotic properties of *Lctobacillus* strains. *Dairy Sci. Technol.* 88 : 695-705.
- Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, Nicholls RJ, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA., (2004). Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut.* 53(1):108-14.
- Moreno, I., Busani, S.F.B., (1990). Characterization of lactococci isolated from raw milk and commercial lactic starters. *Coletanea do Instituto de Tecnologia de Alimentos.*, 20: 44-50.
- Moretro T., Aasen I.M., Storro I. & Axelsson L., (2000). Production of sakacin P by *L. sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbiol.*, **88**(3), 536-545.

- Morgan, S., Ryan, M., Twomey, D., Meaney, W., Hill, C., (2001). Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* 72, 1.
- Mpassi, D., Rychen, G., Feidt, C., Mertes, M., Laurent, F., Lenoir-Wijnkoop, I., and Antoine, J. M. (2001). Portal absorption of ¹⁵N and amino nitrogen in the growing pig after ingestion of labelled milk, yogurt or heat-treated yogurt. *Reprod Nutr Dev* 41, 153-162.
- Nel H.A., Bauer R., Vandamme E.J. & Dicks L.M., (2001). Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *J. Appl. Microbiol.*, **91**, 1131-1138.
- Nguyen G., Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C., Meile, L., (2007). Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 145e155.
- Niedzielin K, Kordecki H, Birkenfeld B.,(2001). A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*13(10):1143-7.
- Nilsen T., Nes I.F. & Holo H., (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol.*,**69**(5), 2975-2984.
- Nissen-Meyer, J., Larsen, A.G., Sletten, K., Daeschel, M. and Nes, I.F. (1993) Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *Journal of General Microbiology* 139, 1973– 1978.
- Nousiainen J., Javanainen P., Setälä J. et Wright A.V., (2004). Lactic acid bacteria as animal probiotics. In :Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 547-560.
- O’Sullivan E. et Condon S., (1997). Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *App. Env. Microbiol.* 63(11) : 4210-4215.
- Ogier J.C., Casalta E., Farrokh C. et Saïhi A., (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.*126 : 286-290.
- Orla-Jensen S. (1919). The lactic acid bacteria. AF.Hostand son. Coeinighchen Hof-Boghamdel. Copenhagen

- Ouadghiri, M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Naser, S., Gevers, D., Lefebvre, K., Swings, J., et Amar, M., (2009). Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk 'Iben'. *Journal of Applied Microbiology* 106: 486-495.
- Owusu-Kwarteng J., Fortune Akabanda, Dennis S. Nielsen, Kwaku Tano-Debrah, Richard L.K. Glover, Lene Jespersen. (2012) Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional fura processing in Ghana. *Food Microbiology, Volume 32, Issue 1, Pages 72-78*
- Padmanabha-Reddy, V., Habibulla-Khad, M.M., Purushothaman, V., (1994). Plasmid linked starter characteristics in lactococci isolated from dahi and buttermilk. *Cult. Dairy Prod., J. 29: 25-30.*
- Palomares I.C., Pérez-Morales R. et Acedo-Félix E., (2007). Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 49(3-4) : 46-54.
- Papagianni M., (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv.*, **21**(6), 465-499.
- Parente E. & Ricciardi A., (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 628-638.
- Park, J.H., Um, J.I., Lee, B.J., Goh, J.S., Park, S.Y., Kim, W.S., Kim, P.H., (2002). Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cell. Immunol.* 219, 22e27.
- Park, J.H., Um, J.I., Lee, B.J., Goh, J.S., Park, S.Y., Kim, W.S., Kim, P.H., (1999). Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cell. Immunol.* 219, 22e27.
- Patton G.C. & Van Der Donk W.A., (2005). New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 543-551.
- Percival M., (1997). Choosing a probiotic supplement. *Clin. Nutr. Insights.* 6(1): 95-100.
- Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G., Gobbato, N., (1995). Probiotic bacteria for humans: clinical systems for evaluation of effectiveness. *J. Dairy Sci.*, 78: 1597-1606.
- Piard J.C et Desmazaud M. (1991). Inhibiting factors produced by Lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*. Pp: 525-541.

- Picque, D., Perret, B., Latrille, E., Corrieu, G., (1992). Caractérisation et classification des bactéries lactiques à partir de la mesure de leur cinétique d'acidification. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 25: 181-186.
- Piel M., (1996). Bactéries lactiques. Manuel de Bactériologie Alimentaire. Edition Lavoisier. France. Pp: 235-260.
- Pilet M. F., Magras C. et Federighi M. (1996). Bactéries lactiques. Manuel de Bactériologie Alimentaire. Pp: 235-260.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., Gopal, P.K., (1998). Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.* 8 (12), 993-1002.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., (1994). Capsules and slime layers. The study of Microbial structure: Microscopy and specimen preparation. In: *Microbiology*. WmC Brown Publishers, Inc., United States of America, pp. 58-59.
- Prioult G., (2003). Effet des probiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la β -lactoglobuline chez la souris et étude de leurs mécanismes d'action. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de doctorat en sciences et technologie des aliments pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université Laval Québec.
- Prodromou, K., Thasitou, P., Haritonidou, P., Tzanetakis, N and Litopoulou-Tzanetaki, E., (2001). Microbiology of "Orinotyri" a ewe's milk cheese from the Greek mountains. *Food Microbiol.*, 18: 319-328.
- Rambaud J-C., Buts J-P., Corthier G., Flourir B, (2004) : Flore microbienne intestinale : Physiologie et pathologie digestive. Edition John Libbey, Paris ,19,22,23,55.
- Rao, V. A. (2001). The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. *Nutr Res* 21, 843-848.
- Resta-Lenert, S. and Barrett, K. E. (2003). Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 52, 988-997.
- Reyes-Gavilan C.G., Suarez A., Fernandez-Garcia M., Margolles A., Gueimonde M. et Ruas-Madiedo P., (2011). Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Res. Microbiol.* 162 : 514-519.

- Robin J.M. et Rouchy A., (2001). Les probiotiques. *CEDN. Nutrithérapie. Info.1-4.*
- Roussel, Y., Colmin, C., Simonet, J.M. and Decaris, B. (1993). Strain characterization, genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group (Hansen and Mocquot). *J. Appl. Bacteriol.* 74:549-556.
- Roy D., (2002), La santé par les probiotiques. Perspectives biofonctionnelles Ph.D. Chercheur scientifique. Responsable du groupe de recherche sur l'étude des activités métaboliques des bifidobactéries et des lactobacilles au Centre de recherche et de développement sur les aliments, Agriculture et Agroalimentaire Canada.
- Rychen, G., Mpassi, D., Jurjanz, S., Mertes, M., Lenoir-Wijnkoop, I., Antoine, J. M., and Laurent, F. (2002). 15N as a marker to assess portal absorption of nitrogen from milk, yogurt and heat-treated yogurt in the growing pig. *J Dairy Res* 69, 95-101.
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Matto J., et Mattila-Sandholm T., (2000). Probiotic ; *Nat Rev Microbiol*, 3(10): 777–788.
- Saïdi, N. (1998). Bactéries lactiques des laits d'Algérie: isolement, identification, caractéristiques technologiques. Mise en évidence de bactériocines et d'ADN plasmique. Thèse de Magister. Université d'Oran.
- Sakamoto I, Igarashi M, Kimura K, Takagi A, Miwa T, Koga Y. (2001) Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. *J Antimicrob Chemother.* 47:709e10.
- Salama, S.S., Musafija-Jeknic, T., Sandine, W.E., Giovannoni, S.J.,. (1995). An ecological study of lactic acid bacteria: isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. *J. Dairy Sci.*, 78: 1004-1017.
- Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M. and Pappa, A. (1994) Stability and safety of traditional Greek salami ± a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology* 44, 69±82.
- Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Bassole, I. H. N., & Traore, A. S. (2004). Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina faso fermented milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(3), 174e179.
- Savijoki K., Ingmer H. & Varmanen P., (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 394-406.

- Schillinger U., Guigas C. et Holzapfel W.H., (2005). *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int. Dairy J.* 12 : 1289-1297.
- Schillinger, U., Lucke, F.K., (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1901–1906.
- Sen S, Mullan MM, Parker TJ, Woolner JT, Tarry SA, Hunter JO., (2002). Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci.* 47(11):2615-20.
- Skinnel F.A. and Quesnel L.B. (1978). *Streptococci*. Symposium N° 7, The Society for Applied Bacteriology, Academic Press. London.
- Surawicz CM, McFarland LV, Greenberg RN, Rubin M, Fekety R, Mulligan ME, Garcia RJ, Brandmarker S, Bowen K, Borjal D, Elmer GW., (2000). The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. *Clin Infect Dis.* 31(4):1012-7. Epub 2000 Oct 25.
- Svec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedlacek, I. and Swings, J. (2005). Evaluation of (GTG)5-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 247: 59–63.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., & Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40, 722–726
- Temmerman R., Pot B., Huys G. et Swings J., (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbio.* 81: 1-10.
- Thomson ARB, Paré P et Fedorak RN, (2000) : Anatomie macroscopique de l'intestin grêle. AstraZeneca Canada.
- Togo, C.A. , Sara B. Feresu, S.B., Mutukumira, A.N., (2002). Identification of Lactic Acid Bacteria isolated from Opaque beer (*Chibuku*) for potential use as a starter culture. *J. Food Technol in Africa.*, 7 (3): 93-97.
- Tolle, A. (1980). The microflora of the udder.p. 4. In Factors Influencing the Bacteriological Quality of Raw Milk. International Dairy Federation Bulletin, Document 120.

- Topping, D. L. and Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81, 1031-1064.
- Tsakalidou, E., Manolopoulou, E., Kabaraki, E., Pot, B., Karel, K and Kalantzopoulos, G., (1994). The combined use of whole-cell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.*, 17: 444-449.
- Vadyvaloo V., Snoep J.L., Hasting J.W. & Rautenbach M., (2004). Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *L. monocytogenes* strains. *Microbiology*, **150**, 335-340.
- Vandamme, P., Pot, B, Gillis M. n de Vos, P., Kers lers, k, s Wings J., (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics, *Microbiol Rev* 60, 407-438.
- Verdier-Metz I, Martin B, Hulin S, Ferlay A, Pradel P, Coulon JB. (2009). Combined influence of cow diet and pasteurisation of the milk on sensory properties of French PDO Cantal cheese. *In* 26th IDF World Dairy Congress Congrilaite, CIDIL, CD, 24-28 September, Paris.
- Verluyten J., Leroy F. & De Vuyst L., (2004). Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5081-5088.
- Weerkamp, A.H., Klijn, N., Neeter, R., Smit, G., (1996). Properties of mesophilic lactic acid bacteria from raw milk and naturally fermented raw products. *Neth. Milk Dairy J.*, 50: 319-322.
- Wegmann, U., M. O'Connell-Motherway, A. Zomer, G. Buist, C. Shearman, C. Canchaya, M. Ventura, A. Goesmann, M. J. Gasson, O. P. Kuipers, D. van Sinderen, and J. Kok. (2007). Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.* 189:3256-3270.
- Zadi-Karam, H. (1998). Bactéries lactiques de lait de *Camelus dromadarius* : Etude microbiologique et biochimique, caractéristiques technologiques. Elaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages. Thèse de diplôme de Doctorat d'Etat Université de Constantine.
- Zago M., Fornasari M.E., Carminati D., Burns P., Suárez V., Vinderola G., Reinheimer J. et Giraffa G., (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* 28 : 1033-1040.

Annexes

1. Coloration de Gram

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au *violet de cristal*; il est ensuite rincé rapidement à l'eau distillée, traité pendant une minute par une solution de *Lugol*, et de nouveau rincé rapidement à l'eau distillée. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 15 à 30 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau distillée. À ce stade les cellules Gram- seront incolores, les cellules Gram+ violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 10 à 30 secondes à la *fushine* (ou *safranine*) pour colorer les cellules Gram- présentes. Après un bref rinçage à l'eau distillée, on sèche le frottis au buvard ou au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen et on l'examine à l'objectif (X 100) à immersion. Avec cette coloration double, les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge (Delarras, 2007).

2. Identification biochimique par les Galerie API 50CH avec API 50 CHL medium (bioMerieux, Marcy l'étoile, France)

L'ensemencement et la lecture de la galerie ont été réalisés selon les instructions du fabricant. Ils se font de la façon suivante:

- Cultiver la souche pure sur milieu MRS gélosé 24h à $30 \pm 1^\circ\text{C}$;
- Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (2 ml), prélever toutes les bactéries de la culture, à l'aide d'un écouvillon, et réaliser une suspension dense (S) dans l'ampoule ;
- Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (5ml) et réaliser une suspension d'opacité égale à 2 McFarland en transférant un certain nombre de gouttes de suspension (S) : noter ce nombre de gouttes (n) ;
- Ouvrir une ampoule de API 50 CHL Medium et inoculer avec 2 fois le nombre de gouttes trouvé (2n), homogénéiser ;
- Répartir API 50 CHL Medium ainsi inoculé dans les tubes seulement, et recouvrir les tests avec de l'huile de paraffine stérile ;
- Incuber à 30°C en aérobiose pendant 48h (± 6 h) ;

- Tous les tests sont lus à 24h et 48h (on recherche dans chaque tube l'acidification produite qui se traduit par le virage au jaune du bromocrésol pourpre contenu dans le milieu.

Pour le test esculine, on observe un virage du pourpre au noir) ;

- Noter les résultats sur la fiche des résultats ;

- Le profil biochimique ainsi obtenu peut être identifié à partir de la base de données, à l'aide du logiciel d'identification apiwebTM (bioMérieux, Marcy l'étoile, France).

Composition des milieux de culture utilisés

- **TSE (Tryptone-Sel –Eau)**

Tryptone	1g
Na Cl	8,5g
Eau distillée	qsp 1L

- **Le milieu MRS (Mac-Rogosa Sharpe 1960)**

Peptone	10g
Extrait de viande	5g
Extrait de levure	5g
D(+) Glucose	20g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Acétate de sodium	5g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0.1g
MnSO ₄	0.05g
Agar	12g
Tween 80	1ml
Eau distillée	1000 ml
pH	6.5 ± 0.2

Autoclavage à 121°C pendant 15min.

▪ **Bouillon nutritif**

Peptone	15g
Extrait de levure	3g
D(+) Glucose	1g
Nacl	6g
Eau distillée	1000ml
pH	7.5 ± 0.2

Autoclavage à 121°C pendant 15min.

▪ **Gélose nutritive**

Peptone	15g
Extrait de levure	3g
D(+) Glucose	1g
Nacl	6g
Agar	23g
pH	7.5 ± 0.2
Eau distillée	1000ml

Autoclavage à 121°C pendant 15min

▪ **Milieu Mac Conkey**

Peptone de caséine	17g
Peptone	3g
Lactose	10g
Mélange de sel biliaire	1.5g
Chlorure de sodium	5g
Rouge neutre	0.03g
Cristal violet	0.001g
Agar- Agar	13.5g
Eau distillée	1000ml
pH	7.1

Autoclavage à 121°C pendant 15min.

Milieu M17 (TERZAGHI et SANDINE. 1975)

Lactose	5 g
Peptone tryptique de caséine	2,5 g
Peptone pepsique de viande	2,5 g
Peptone de soja	5,0 g
Extrait de levure des hydrates	2,5 g
Extrait de viande	5,0 g
Glycérophosphate de sodium	19,0 g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,25 g
Acide Ascorbique	0,50 g
Agar- Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7.1 – 7.2.

Dissoudre les ingrédients dans l'eau à l'ébullition, laisser refroidir à 50 °C

4-Milieu Hyper salé :

<i>Peptone</i>	<i>10g.</i>
<i>Extrait de viande</i>	<i>05g.</i>
<i>Lactose</i>	<i>10g.</i>
<i>Eau distillée</i>	<i>1000ml.</i>
<i>Chlorure de sodium</i>	<i>65g.</i>
<i>PH.....</i>	<i>7,2.</i>

Autoclavage a 120°C pendant 20 minutes.