

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS-MOSTAGANEM
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA
VIE



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

FILIERE : SCINECES AGRONOMIQUES

OPTION : Biotechnologie et santé

Présenté par le post graduant :

Abdelmalek Chaalel

Sous le thème intitulé :

Les substances antagonistes (i.e Bactériocines) produites par une souche de *Lactobacillus rhamnosus* et une souche de *Lactobacillus plantarum*: caractérisation biochimique et effets *in vitro* attendus chez quelques germes responsables de toxi-infections

Composition du jury de soutenance

<i>Nom et prénom</i>	<i>Grade</i>	<i>Qualité</i>	<i>Appartenance administrative</i>
Mr Lotmani Ibrahim	Professeur	Président	Université de Mostaganem
Mr Benali Mohamed	Professeur	Rapporteur	Université de Sidi-Bel-abbès
Mr Slimani Miloud	Professeur	Rapporteur	Université de Saida
Mme Merzouk Hafida	Professeur	Rapporteur	Université de Tlemcen
Mr Abbouni bouziane	Professeur	Rapporteur	Université de Sidi-Bel-abbès
Mr Riazi Ali	Professeur	Directeur de thèse	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2015/2016

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail tout d'abord à mes très chers parents qui ont fait de moi ce que je suis maintenant..., à ma chère sœur Mahdjouba et mes chers frères Mohamed, Mourad, Omar, Hichem et Samir.

A ma chère femme Nawal qui m'a encouragé et soutenue dans le pire et le meilleur, merci pour ta patience et ton soutien qui sans lui je n'en serais pas là.

A mes chères jumelles Ghozléne, Nesrine et mon petit cœur Mayssa.

Je dédie aussi le fruit de ma recherche à mon cher beau-père Boukezzoula Abdelkader ainsi qu'à tous les membres de sa famille, merci pour ton soutien dans les moments difficiles.

A tous mes ami(e)s.

A. CHAALEL

Avant-propos

La présente thèse a été réalisée conjointement au sein du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'Université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem, du Centre Wallon de Biologie Industrielle, Unité Bio-Industrie, Gembloux Agro-Bio Tech, et du Laboratoire des Interactions des Bactéries Commensales et Probiotiques avec l'Hôte, INRA UMR 1319 Micalis, Jouy-en-Josas, France.

J'aimerais en tout premier lieu adresser ma plus sincère gratitude à mon directeur de thèse, Mr A. Riazi, Professeur à l'université de Mostaganem, un homme scientifique distingué, méticuleux et qui m'a forgé tout au long de mon parcours scientifique, je ne saurais exprimer à quel point je suis reconnaissant envers vous pour votre soutien, vos conseils, votre enseignement et votre confiance.

En dépit de la grande responsabilité scientifique et administrative qu'il assure, le Professeur B. Lotmani de l'université de Mostaganem, a accepté de présider mon jury de soutenance ; qu'il trouve ici l'expression de mes plus vifs remerciements.

J'exprime ma gratitude au Professeur M. Benali de l'université Djillali Liabes à Sidi-Bel-Abbès pour toute votre aide et vos conseils dont j'avais besoin.

Je suis très honoré par la participation de Professeur M. Slimani de l'université Moulay Tahar de Saida à mon jury d'examen malgré le temps restreint dont il dispose, ses critiques ne feront qu'enrichir ce travail.

Je remercie également Mme H. Merzouk, Professeur à l'université Abou bakr Belkaid à Tlemcen, d'avoir aimablement accepté d'apporter ses critiques à ce travail.

A. Chaalel (2015). Substances antagonistes protéiques produites par *L. plantarum* et *L. rhamnosus* »
thèse de doctorat Univ. Mostaganem.

Mes vifs remerciements sont également adressés au Professeur B. Abbouni, de l'université Djillali Liabes de Sidi-Bel-Abbes, pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Mes remerciements les plus forts sont adressés au Professeur P. Thonart et au Dr Robin-Dubois Dauphin, Docteur au Centre Wallon de Biologie Industrielle, Unité Bio-Industrie, Gembloux (Belgique), pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Je tiens à remercier également le Docteur Philippe Langella et le Docteur Luis G. Bermúdez-Humarán du Laboratoire de Interactions des Bactéries Commensales et Probiotiques avec l'Hôte, INRA, France, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe de recherche et pour avoir mis à ma disposition tous le matériel dont j'avais besoin, sans oublier l'aide précieuse de leurs deux ingénieurs Mme Pascale Kharrate et Mme Catherine Philippe.

Mes remerciements sont adressés aussi au Docteur Luis Miguel Izarra de la faculté de médecine vétérinaire, Département de nutrition, science et technologie alimentaire, Madrid, Espagne, qui m'a initié aux différentes techniques d'évaluation du pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes.

Je n'oublierais pas de remercier tous mes collègues du laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université de Mostaganem.

Un grand merci est, également, adressé à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à mener à bien ce travail.

A. CHAALEL

RESUME :

Le but de ce travail a été l'isolement et l'identification de deux nouvelles souches lactiques à partir de selles de nourrissons, saints, allaités exclusivement au sein et ne recevant aucune antibiothérapie. La caractérisation de ces deux souches par des tests biochimiques et un séquençage de l'ADNr 16S a révélé leur appartenance au genre *Lactobacillus* et aux espèces *plantarum* (LbM2a) et *rhamnosus* (LBRE-LSAS). Le pouvoir antagoniste de ces deux souches vis-à-vis d'une large gamme de bactéries Gram positives et Gram négatives a été mesuré par trois méthodes différentes : l'Agar Spot, la diffusion en puits et le contact cellulaire. Ces mesures ont confirmé une forte action inhibitrice des souches isolées vis-à-vis de 18 souches appartenant à *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Micrococcus luteus*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteria*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* et *Carnobacterium maltaromaticum*. Les surnageants bactériens à acidité neutralisée (SBAN) ont également exercé une forte activité inhibitrice vis-à-vis des souches pathogènes testées. Cette activité s'est révélée stable à des pH allant de 2 à 6, sensible aux enzymes protéolytiques, relativement thermostables (20 min à 100°C ou 120 jours à -80°C) et insensible au rayonnement ultra-violet ou à un traitement à la mycomycine C. Un dépistage des gènes codant pour des bactériocines plantaricine basé sur la PCR a été réalisé pour la souche LbM2a en utilisant des amorces spécifiques, ce qui a permis de détecter la présence des plantaricines EF et K. Le fractionnement des protéines des surnageants SBAN des deux souches LbM2a et LBRE-LSAS par HPLC inverse a permis l'isolement d'un seul pic actif par surnageant. Ces pics ont été concentrés par ultrafiltration et testés positivement pour leur activité antagoniste vis-à-vis d'une souche indicatrice, *Micrococcus luteus* ATCC 10420. Ces molécules ont un poids moléculaire compris entre 3 et 10KDa pour les deux souches LbM2 et LBRE-LSAS.

Mots clés : Isolement- Selles de nourrissons- *Lactobacillus plantarum*- *Lactobacillus rhamnosus*- Antagonisme.

ABSTRACT:

The aim of this work was the isolation and identification of two new strains of lactic acid from infant stool, healthy, exclusively breastfed and receiving no antibiotics. The characterization of these two strains by biochemical tests and 16S rDNA gene sequences revealed their belonging to the genus *Lactobacillus* species *plantarum* (LbM2a) and *rhamnosus* (LBRE-LSAS). The antagonistic activity of these two strains against a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria was measured using three different methods: Agar spot, the well diffusion and cell contact. These measurements confirmed a strong inhibitory action of the isolated strains against 18 strains belonging to *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Micrococcus luteus*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* and *Carnobacterium maltaromaticum*. The bacterial supernatants with neutralized acidity (SBAN) also exerted a strong inhibitory activity against the tested pathogenic strains. This activity proved stability at pH ranging from 2 to 6, sensitive to proteolytic enzymes, relatively heat-stable (20 min at 100 ° C or 120 days at -80 ° C) and insensitive to ultraviolet radiation or treatment with mycomycin C. Screening of genes encoding plantaricin bacteriocins based on the PCR was performed for the LbM2a strain using specific primers which allowed to detect the presence of plantaricines EF and K. Proteins Fractionation of SBAN supernatants of the two strains LbM2a and LBRE-LSAS by reverse HPLC allowed the isolation of a single active peak by supernatant. These peaks were concentrated by ultrafiltration and assayed positively for their antagonist activity against an indicator strain, *Micrococcus luteus* ATCC 10420. These molecules have a molecular weight between 3 and 10 kDa for both strains LBRE-LSAS and LbM2.

Keywords

Isolation, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, antagonism, pathogens.

Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BET : Bromure d'éthidium

Da : Dalton

dd H₂O : Eau purifiée

dNTPS : Nucléotides triphosphates contenant le désoxyribose

DO : Densité optique

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

g : Gramme

h : Heure

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂SO₄: Acide sulfurique

HCl: Chlorure d'hydrogène

HDL: High Density Lipoprotein

HPLC : High performance liquid chromatography (Chromatographie en phase liquide à haute performance)

kDa : Kilo Dalton

kg : Kilogramme

l : Litre

log : Logarithme

MDa: Méga Dalton

mg : Milligramme

mg: Milligramme

min: Minute

mL: Millilitre

mm : Millimètre

mM : Millimolaire

NCBI : National Center for Biotechnology Information

nm: Nanomètre

OH : Ion hydroxyde

P/V : Poids / volume

pb: Paire de base

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

pH : Potentiel d'hydrogène.

QSP : Quantité suffisante pour

RNA : Acide ribonucléique

RNase: Ribonuclease

rpm : Tour par minute

rpm: Rotation Par Minute.

sec : Seconde

TAE: Tris, Acétate, EDTA

TFA : Acide trifluoro-acétique

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane

UFC : Unité Formant Colonie

UV: Ultra-Violet

V/V: Volume / volume

λ : Longueur d'onde

μ L : Microlitre

Liste des tableaux et figures

Liste des tableaux

Partie expérimentale

Partie matériels et méthodes

Tab. 1	Les différentes souches lactiques expérimentales isolées.	25
Tab. 2	Différentes souches pathogènes et lactiques indicatrices utilisées.	26
Tab. 3	Programme du thermocycleur pour la réaction PCR de la souche LBRE-LSAS.	31
Tab. 4	Liste des amorces utilisées.	31
Tab. 5	Programme du thermocycleur pour la réaction PCR de la souche LbM2a.	33
Tab. 6	Mélange réactionnel pour le séquençage d'ADN.	33
Tab. 7	Programme du thermocycleur pour la réaction de séquençage.	34
Tab. 8	Séquences des amorces utilisées pour les réactions d'amplification et de séquençage de fragments de gènes des bactériocines.	35
Tab. 9	Programme du thermocycleur pour la réaction PCR.	35

Partie résultats et discussion

Tab. 10	Profil Fermentaire des deux souches LbM2a et Bbv2.	46
Tab. 11	Numéros d'accession des isolats et des plantaricines.	48
Tab. 12	Niveaux d'inhibition exprimés en intensité de sensibilité (se référer à la légende ci-dessous pour une expression en mm) obtenus avec la souche LbM2a vis-à-vis de <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 en utilisant la technique SPAT.	52
Fig. 13	Niveaux d'inhibition exprimés en intensité de sensibilité (se référer à la légende ci-dessous pour une expression en mm) obtenus avec la souche LBRE-LSAS vis-à-vis de <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 en utilisant la technique SPAT.	53
Tab. 14	Niveaux d'inhibition exprimés en intensité de sensibilité (se référer à la légende ci-dessous pour une expression en mm) obtenu avec la souche LbM2a vis-à-vis de <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 en utilisant la technique AWDT.	54
Tab. 15	Niveaux d'inhibition exprimés en intensité de sensibilité (se référer à la légende ci-dessous pour une expression en mm) obtenu avec la souche LBRE-LSAS vis-à-vis de <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 en utilisant la technique AWDT.	55
Tab. 16	Pertes de la viabilité (log UFC/mL) et taux d'inhibition (en % des cellules inhibées) de <i>Shigella sonnei</i> CECT 584 en coculture à 37°C avec les souches antagonistes dans un rapport cellulaire égal à 1.	67
Tab. 17	Pertes de la viabilité (log UFC/mL) et taux d'inhibition (en % des cellules inhibées) de <i>Shigella sonnei</i> CECT 584 en coculture à 37°C avec les souches antagonistes dans un	74

rapport cellulaire égal à 1.

Tab. 18	Pertes de la viabilité (log UFC/mL) et taux d'inhibition (en % des cellules inhibées) de <i>Listeria innocua</i> CECT584 en coculture à 37°C avec <i>Lactobacillus plantarum</i> (LbM2a), <i>Bifidobacterium aimalis</i> subsp <i>lactis</i> (Bb12) et <i>Lactobacillus rhamosus</i> (LBRE-LSAS) dans un rapport cellulaire égal à 1.	81
Tab. 19	Pertes de la viabilité (log UFC/mL) et taux d'inhibition (en % des cellules inhibées) de <i>Micrococcus luteus</i> CECT 241 en coculture à 37°C avec <i>Lactobacillus plantarum</i> (LbM2a), <i>Bifidobacterium aimalis</i> subsp <i>lactis</i> (Bb12) et <i>Lactobacillus rhamosus</i> (LBRE-LSAS) dans un rapport cellulaire égal à 1.	88
Tab. 20	Pertes de la viabilité (log UFC/mL) et taux d'inhibition (en % des cellules inhibées) de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 en coculture à 37°C avec <i>Lactobacillus plantarum</i> (LbM2a), <i>Bifidobacterium aimalis</i> subsp <i>lactis</i> (Bb12) et <i>Lactobacillus rhamosus</i> (LBRE-LSAS) dans un rapport cellulaire égal à 1.	96

Listes des figures

Partie bibliographique

Fig. 1	Structure représentative de variétés de Lantibiotiques (Patton et al., 2005).	7
Fig. 2	Détournement des lipides II pour la formation des pores (Patton et al., 2005).	10

Partie expérimentale

Partie matériels et méthodes

Fig. 3	Extraction de l'ADN génomique Avec le Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega).	29
Fig. 4	Protocole de purification des produits de séquençage.	34
Fig. 5	Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).	41
Fig. 6	Speed vaccum concentrator SPD2010-220, savant.	41
Fig. 7	Filtre Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices, MILLIPORE.	42

Partie résultats et discussion

Fig. 8	Purification des souches isolées par la méthode des stries.	44
Fig. 9	Observation au microscope optique après la coloration de Gram : A : LbM2a, B : Bbv2 (grossissement 10).	44
Fig. 10	Arbre phylogénétique basé sur la séquence du gène de l'ARNr 16S des isolats LbM2a et Bbv2 et de leurs plus proches voisins phylogénétiques.	47
Fig. 11	Amplification ADNr 16S réalisée avec l'ADN génomique à partir de (1) <i>Enterococcus</i> EMX1, (2) <i>Enterococcus</i> EMX2, (3) LbM2a et (4) Bbv2, en utilisant les paires d'amorces SP0 / SP6 et plb 16s / mlb 16s, un GeneRuler 100 pb d'ADN ladder plus (Fermentas) a été utilisé comme acide nucléique moléculaire marqueur de taille (colonne M).	47
Fig. 12	Amplification PCR de l'ADN génomique de la souche LbM2a en utilisant des paires de primers spécifiques de la sakacine P (Ligne 1), plantaricine EF (Ligne 2), plantaricine K (Ligne 3), plantaricine J (Ligne 4) et l'entéroïcine P comme control négatif (Ligne 5). Un GeneRuler 100-bp DNA ladder (Fermentas) a été utilisé comme acide nucléique marqueur de taille moléculaire (Ligne M).	48
Fig. 13	Zones d'inhibition obtenues par la technique SPAT de la souche LbM2a (A) et de la souche Bbv2 (B), vis-à-vis de <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420.	50
Fig. 14	Zones d'inhibition obtenues par la technique AWDT de la souche LbM2a (A) et de la souche Bbv2 (B), vis-à-vis de <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420.	50
Fig. 15	Effet du traitement de la chaleur sur l'activité du SCS de la souche LbM2a en utilisant <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 comme une souche indicatrice.	56
Fig. 16	Effet du traitement de la chaleur sur l'activité du SCS de la souche Bbv2a en utilisant <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 comme une souche indicatrice.	56
Fig. 17	Effet de la durée (20 à 120 jours) et de la température (-80, -20, 4 et 37°C) de stockage sur l'activité du SBAN de la souche LbM2a en utilisant <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 comme souche indicatrice.	58
Fig. 18	Effet de la durée (20 à 120 jours) et de la température (-80, -20, 4 et 37°C) de stockage sur l'activité du SBAN de la souche Bbv2 en utilisant <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 comme souche indicatrice.	58
Fig. 19	Activité du surnageant SBAN de la souche LbM2a à différents pH en utilisant <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 comme une souche indicatrice.	60
Fig. 20	Activité du surnageant SBAN de la souche Bbv2 à différents pH en utilisant <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 comme une souche indicatrice.	60
Fig. 21	Effet des enzymes sur l'activité du surnageant SBAN (exprimée en mm de zones d'inhibition) la souche LbM2a en utilisant <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 comme une souche indicatrice.	62
Fig. 22	Effet des enzymes sur l'activité du surnageant SBAN (exprimée en mm de zones d'inhibition) de la souche LBRE-LSAS en utilisant <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 comme une souche indicatrice.	62
Fig. 23	Effet du traitement par les UV sur l'activité du SBAN (exprimée en mm de zones d'inhibition) la souche LbM2a en utilisant <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 comme une souche indicatrice.	63

Fig. 24	Effet du traitement par les UV sur l'activité du SBAN (exprimée en mm de zones d'inhibition) de la souche Bbv2 en utilisant <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 comme une souche indicatrice.	63
Fig. 25	Effet du traitement par la mitomycine sur l'activité du SBAN (exprimée en mm de zones d'inhibition) de la souche LbM2a en utilisant <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 comme une souche indicatrice.	64
Fig. 26	Effet du traitement par la mitomycine sur l'activité du SBAN (exprimée en mm de zones d'inhibition) de la souche Bbv2 en utilisant <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 comme une souche indicatrice.	64
Fig. 27	Activité (exprimée en mm de zone d'inhibition) des fractions HPLC inverse ultra-filtrées du SBAN de la souche LbM2a en utilisant <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420 comme souche indicatrice.	66
Fig. 28	Viabilité des cellules de <i>Shigella sonnei</i> (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 2 h (A) et 4 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de <i>Shigella sonnei</i> en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SEM (n=3).	69
Fig. 29	Viabilité des cellules de <i>Shigella sonnei</i> (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 6 h (A) et 8 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de <i>Shigella sonnei</i> en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SEM (n=3).	70
Fig. 30	Viabilité des cellules de <i>Shigella sonnei</i> (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 10 h (A) et 24 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de <i>Shigella sonnei</i> en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SEM (n=3).	71
Fig. 31	Cinétique d'inhibition des cellules de <i>Shigella sonnei</i> (log UFC/mL) soumise à l'antagonisme des différentes souches testées / souche pathogène=1 /1. Témoin = culture pure de <i>Shigella sonnei</i> en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SEM (n=3).	72
Fig. 32	Viabilité des cellules de <i>Shigella dysenteriae</i> (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries et de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (Bbv2) pendant 2 h (A) et 4 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de <i>Shigella dysenteriae</i> en absence de souches bénéfiques. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SEM (n=3).	76
Fig. 33	Viabilité des cellules de <i>Shigella dysenteriae</i> (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 6 h (A) et 8 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de <i>Shigella dysenteriae</i> en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SEM (n=3).	77
Fig. 34	Viabilité des cellules de <i>Shigella dysenteriae</i> (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 10 h (A) et 24 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de <i>Shigella dysenteriae</i> en absence de souches bénéfiques. Les valeurs représentent la	78

moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

- Fig. 35** Cinétique d'inhibition des cellules de *Shigella dysenteriae* (log UFC/ml) soumise à l'antagonisme des différentes souches testées / souche pathogène=1 /1. Témoin = culture pure de *Shigella dysenteriae* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3). **79**
- Fig. 36** Viabilité des cellules de *Listeria innocua* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 2 h (A) et 4 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Listeria innocua* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3). **82**
- Fig. 37** Viabilité des cellules de *Listeria innocua* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 6 h (A) et 8 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Listeria innocua* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3). **83**
- Fig. 38** Viabilité des cellules de *Listeria innocua* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 10 h (A) et 24 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Listeria innocua* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3). **84**
- Fig. 39** Cinétique d'inhibition des cellules de *Listeria innocua* (log UFC/mL) soumise à l'antagonisme des différentes souches testées / souche pathogène=1 /1. Témoin = culture pure de *Listeria innocua* en absence de souches bénéfiques. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3). **86**
- Fig. 40** Viabilité des cellules de *Micrococcus luteus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 6 h (A) et 8 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Micrococcus luteus* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3). **89**
- Fig. 41** Viabilité des cellules de *Micrococcus luteus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 10 h (A) et 24 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Micrococcus luteus* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3). **90**
- Fig. 42** Viabilité des cellules de *Micrococcus luteus* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 10 h (A) et 24 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Micrococcus luteus* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3). **91**
- Fig. 43** Cinétique d'inhibition des cellules de *Micrococcus luteus* (log UFC/mL) soumise à l'antagonisme des différentes souches testées / souche pathogène=1 /1. Témoin = culture pure de *Micrococcus luteus* en absence de souches bénéfiques. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3). **92**

- Fig. 44** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 2 h (A) et 4 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Staphylococcus aureus* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SEM (n=3). **95**
- Fig. 45** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 6 h (A) et 8 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Staphylococcus aureus* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SEM (n=3). **97**
- Fig. 46** Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries et de *Lactobacillus rhamnosus* (Bbv2) pendant 10 h (A) et 24 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche bénéfique / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Staphylococcus aureus* en absence de souches bénéfiques. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SEM (n=3). **98**
- Fig. 47** Cinétique d'inhibition des cellules de *Staphylococcus aureus* (log UFC /mL) soumise à l'antagonisme des différentes souches testées / souche pathogène=1 /1. Témoin = culture pure de *Staphylococcus aureus* en absence de souches bénéfiques. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations ± SEM (n=3). **99**
- Fig. 48** Chromatogramme représentant les différentes fractions issues du surnageant bactérien à acidité neutralisée (SBAN) de la souche Bbv2 cultivé sur milieu MRS après passage sur une colonne analytique de dimensions 250 x 4,6 mm (NUCLEOSIL 300-5 C18 HPLC) avec une porosité de 120 Å, pour une phase stationnaire de granulométrie de 5 µm. La phase mobile est composée de 2 solvants : un solvant A polaire (Eau-0,1% TFA) et un solvant B apolaire (ACN-0,1% TFA). **101**
- Fig. 49** Chromatogramme représentant les différentes fractions issues du surnageant bactérien à acidité neutralisée (SBAN) de la souche LbM2a cultivé sur milieu MRS après passage sur une colonne analytique de dimensions 250 x 4,6 mm (NUCLEOSIL 300-5 C18 HPLC) avec une porosité de 120 Å, pour une phase stationnaire de granulométrie de 5 µm. La phase mobile est composée de 2 solvants : un solvant A polaire (Eau-0,1% TFA) et un solvant B apolaire (ACN-0,1% TFA). **101**

Table des matières

« Les substances antagonistes (i.e Bactériocines) produites par une souche de *Lactobacillus rhamnosus* et une souche de *Lactobacillus plantarum* : caractérisation biochimique et effets *in vitro* attendus chez quelques germes responsables de toxi-infections »

Dédicace

Avant-propos

Résumé

ABSTRACT

Liste des abréviations

Liste des tableaux et figures

Table des matières

Partie bibliographique

	Page
Introduction	1
<u>Chapitre I: Pouvoir antagoniste des Bactéries lactiques</u>	3
I.1. Les substances antimicrobiennes non protéiques	3
I.1.1. Les acides organiques	3
I.1.2. Le peroxyde d'hydrogène	4
I.1.2. Le dioxyde de carbone	4
I.1.3. Le diacétyl	4
I.1.2.5. La reutérine	4
I.2. Les substances antimicrobiennes protéiques ou bactériocines	5
I.2.1. Définition des bactériocines	5
I.2.2. Structure chimique des bactériocines	6
I.2.3. Classification des bactériocines	6
I.2.3.1. Classe I : Les lantibiotiques	6
I.2.3.2. Classe II	7
I.2.3.3. Classe III	8

1.2.3.4. Classe IV	8
1.2.4. Le mécanisme de production des bactériocines et sa régulation	8
1.2.5. Les mécanismes d'action des bactériocines	9
1.2.5.1. Les lantibiotiques	9
1.2.5.2. Les bactériocines de classe II	11
1.2.5.3. Les bactériocines de classe III	12
1.2.6. Le mécanisme de résistance des cellules cibles aux bactériocines	12
1.2.6.1. La résistance aux lantibiotiques	12
1.2.6.2. La résistance aux bactériocines de classe IIa	13
1.2.6.3. Les cross-résistances ou résistances croisées	14
1.2.7. Les facteurs influençant sur la production des bactériocines	15
1.2.8. Mécanismes d'autoprotection de la cellule microbienne vis-à-vis de sa propre sécrétion de bactériocines	15
1.2.8.1. Autoprotection vis-à-vis de la nisine	15
1.2.8.2. Autoprotection vis-à-vis de la lactacine F	16
1.2.8.3. Autoprotection vis-à-vis de la sacacine A	16
1.2.8.4. Autoprotection vis-à-vis de la mesentéricine Y105	16
I.2.9. Utilisations des bactériocines	17
I.2.9.1. Lutte et prévention contre les infections	17
I.2.9.2. Biopréservation des aliments	17
I.2.9.3. Utilisation à des fins médicales	18
- Traitements d'infections cutanées	19
- Traitements de la gingivite	20
- Traitements de la mastite	20
- Traitements de l'otite	20
- Traitements d'infections systémiques	21
I.2.10. Conditionnements des bactériocines	22
I.2.11. Limites d'utilisation des bactériocines	23

Partie expérimentale

Chapitre II : Matériels et méthodes.

II.1. Nature des souches retenues dans cette expérience	25
II.1.1. Les souches lactiques expérimentales	25

II.1.2. Les souches pathogènes et lactiques indicatrices	25
II.2. Protocole d'isolement et d'identification des souches lactiques expérimentales	25
II.2.1. Prélèvements des échantillons de selles	25
II.2.2. Milieux de culture MRS et conditions de croissance	27
II.2.3. Caractérisation phénotypique des souches	27
II.2.3.1. Examens macroscopique et microscopique des cultures	27
II.2.3.2. Coloration de Gram	27
II.2.3.3. Recherche de la catalase	27
II.2.3.4. Détermination du profil fermentaire	28
II.2.4. Caractérisation génétique des souches	29
II.2.4.1. Extraction de l'ADN génomique des souches	29
II.2.4.2. Identification des souches par séquençage 16S ADN ribosomal	30
II.2.4.2.1. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	30
II.2.4.2.1.1. Ingrédients utilisés pour la PCR de la souche LBRE-LSAS	30
II.2.4.2.1.2. Ingrédients utilisés pour la PCR de la souche LbM2a	31
II.2.4.2.2. Electrophorèse des acides nucléiques	32
II.2.4.2.2.1. Purification des produits PCR sur cellule microcon-Y 100	32
II.2.4.2.2.2. Réaction de séquençage	33
II.2.4.2.2.3. Programme d'amplification	33
II.2.4.2.2.4. Criblage de gènes de bactériocines par PCR	34
II.2.4.2.2.5. Programme d'amplification	35
II.2.4.2.2.6. Séquençage des produits PCR	36
II.2.4. Evaluation du pouvoir antagoniste des deux souches LbM2a et LBRE-LSAS	36
II.3.1. Méthodes des zones d'inhibition Agar well Diffusion Test, Stab On Agar Test et Spot On Agar Test	36
II.1.1. Méthodes des piqûres SOAT (StabOn Agar Test)	36
II.1.2. Méthode des puits ADT (Agar well Diffusion Test)	37
II.1.3. Méthode SPAT (Spot On Agar Test) (Cintas et al., 1995)	37
II.2. Sensibilité des surnageant bactériens à acidité neutralisée (SBAN) à la température, le pH et différentes enzymes	37
II.2.1. Stabilité de l'activité au cours du stockage des SBAN	37
II.2.2. Effet de la mitomycine C sur l'activité des SBAN	38
II.2.3. Effet de la lumière UV sur l'activité antimicrobienne des SBAN	38
II.2.4. Résistance des SBAN à la chaleur	54

II.2.5. Sensibilité des SBAN au pH	38
II.3. Mise en évidence du pouvoir antimicrobien des souches <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS et <i>Lactobacillus plantarum</i> LbM2a par coculture avec les pathogènes	39
II.4. Chromatographie en phase inverse RP-HPLC	39
II.5. Ultrafiltration	40
II.6. Analyse statistiques des résultats	42
 <u>Chapitre III : Résultats et discussion.</u>	
III.1. Identité phénotypique des souches isolées	43
III.2. Identité génétique des souches	45
III.2.1. Numéros d'accèsion des séquences nucléotidiques	45
III.2.1. Identification de gènes codant pour la production de bactériocines	45
III.3. Spectre d'inhibition des deux souches LbM2a et LBRE-LSAS	49
III.4. Sensibilité des surnageant bactériens à acidité neutralisée (SBAN) à la température, le pH et différentes Enzymes	51
III.5. Cinétique d'inhibition des pathogènes en coculture avec les souches LbM2a, LBRE-LSAS et Bb12	65
III.5.1. Cinétique d'inhibition de <i>Shigella sonnei</i> CECT 584	65
III.5.2. Cinétique d'inhibition de <i>Shigella dysenteriae</i> CECT 457	68
III.5.3. Cinétique d'inhibition de <i>Listeria innocua</i> CECT 457	80
III.5.4. Cinétique d'inhibition de <i>Micrococcus luteus</i> CECT 241	87
III.5.5. Cinétique d'inhibition de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	93
III.6. Chromatographie en phase inverse RP-HPLC	100
Conclusion	101
Références bibliographiques	
Publication	

INTRODUCTION

Introduction

Les conservateurs chimiques utilisés pour contrôler la prolifération des germes pathogènes dans les aliments peuvent entraîner des effets carcinogènes, tératogènes et allergogènes ainsi qu'une forte toxicité résiduelle chez les consommateurs. La recherche et l'emploi de bioconservateurs dans les industries agro-alimentaires est une alternative qui suscite de plus en plus d'intérêt chez les chercheurs et les acteurs du secteur.

Généralement, ces bioconservateurs sont représentés par des microorganismes bénéfiques ou par les métabolites qu'ils produisent. Ces bioconservateurs bloquent le développement de flore d'altération des aliments dont la durée de conservation se trouve prolongée.

La bioconservation préserve naturellement les aliments tout en préservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles, souvent perdues sous l'effet des agents chimiques ou de la chaleur (Gálvez *et al.*, 2007 ; Settanni et Corsetti, 2008). C'est grâce aux propriétés antimicrobiennes des métabolites qu'ils synthétisent tels que l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl (Atrih et Foster, 2001), les composés antifongiques (Corsetti *et al.*, 1998), les acides phényllactiques (Lavermicocca *et al.*, 2000), les antibiotiques comme la reutéricycline (Höltzel *et al.*, 2000) et les bactériocines, que les bactéries lactiques sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires (Abee *et al.*, 1995 ; Klaenhammer, 1988). Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique, Elles sont actives vis-à-vis d'autres bactéries notamment contre des pathogènes majeurs tels que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pneumoniae*. Aussi, les bactériocines produites par les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène de peptides antimicrobiens qui se distinguent par leur structure et leur mode d'action.

Il y a très peu de bactériocines qui ont été autorisées à être utilisées comme additif dans la préservation des aliments, car seule la nisine possède ce statut à ce jour. Ce constat est lié au fait que l'acquisition de ce statut d'additif microbien autorisé comme bioconservateur alimentaire nécessite un travail de longue haleine comportant des conditions de performance et de stabilité génétique de la souche sécrétrice, ainsi que de l'innocuité absolue d'un métabolite microbien protéique telles que les bactériocines.

Par ailleurs, dans le secteur de la santé publique, l'antibiorésistance affichée par des germes pathogènes connus représente un autre défi que le monde des microorganismes pose à l'homme. Ainsi, relever ce défi reviendrait à rechercher systématiquement et de façon permanente de nouvelles molécules capables de venir à bout de ce phénomène d'antibiorésistance. Parmi ces nouvelles molécules figurent les bactériocines dont la production passe d'abord par des opérations de screening de nouveaux génomes microbiens à haut potentiel producteur de telles molécules.

Grâce à leur mode d'action différent des antibiotiques conventionnels, les bactériocines pourraient être considérées comme une alternative au contrôle de la prolifération et à l'inhibition des souches bactériennes pathogènes devenues résistantes aux traitements usuels.

Les perspectives d'avenir concernant l'application des bactériocines ne se limitent pas aux aliments. Les industries cosmétiques et pharmaceutiques pourraient éventuellement offrir des produits contenant des bactériocines (Dicks *et al.*, 2011).

Parmi les bactéries lactiques connues, la majorité des espèces appartient au genre *Lactobacillus*. Elle inclut des espèces homofermentaires : *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri*, *Lb. helveticus*, *Lb. kefiranofaciens* ; et des espèces hétérofermentaires facultatives ou obligatoires : *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. fermentum*, *Lb. kefiri*, *Lb. paracasei*, *Lb. parakefiri*, *Lb. plantarum* et *Lb. rhamnosus*. Les autres bactéries lactiques, représentées dans une moindre diversité d'espèces autres que les lactobacilles, appartiennent aux genres homofermentaires *Lactococcus* (*L. lactis*), *Pediococcus* et *Streptococcus* (*St. thermophilus*) ainsi qu'aux genres hétérofermentaires *Leuconostoc* (*Ln. mesenteroides* et *Ln. lactis*) et *Weissella* (*W. viridescens*) (Dridier *et prevost*, 2009).

C'est pour ces propriétés d'intérêt qui caractérisent les bactéries lactiques que nous nous sommes intéressés à isoler et sélectionner des souches dotées d'un fort pouvoir antibactérien vis-à-vis de quelques pathogènes tels que : *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteria*, *E. coli* et *Bacillus cereus*.

Cette thèse est structurée en trois chapitres dont le premier est consacré à des rappels bibliographiques sur les propriétés antagonistes des bactéries lactiques et de leurs sécrétions. Le second chapitre décrit la méthodologie utilisée dans ce travail ; alors que le troisième et dernier chapitre présente les résultats obtenus et les confronte à ce qui a été rapporté dans d'autres expériences similaires.

CHAPITRE I

BACTERIES LACTIQUES, ACTIVITE ANTAGONISTE ET PATHOGENES

Chapitre I: Pouvoir antagoniste des Bactéries lactiques

I.1. Les substances antimicrobiennes non protéiques

I.1.1. Les acides organiques

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques. Les acides organiques sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire.

Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires et à un mélange d'acides lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaires (Liu, 2003).

Grâce à cette production d'acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe. Leur compétitivité est améliorée étant donné leur grande tolérance aux pH bas extra et intra-cellulaires.

Outre la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération de protons H⁺, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (Klaenhammer, 1993 ; Janssen et al., 2007).

Les acides organiques sont un des groupes d'agents classiques de préservation des aliments ; ils sont reconnus comme des additifs alimentaires. Les acides couramment utilisés sont les acides : benzoïque, sorbique, acétique, fumarique, propionique et lactique. Ils sont utilisés pour prévenir ou retarder la croissance des bactéries dégradant la nourriture (Hsiao et al., 1999).

Le principal problème consécutif à leur utilisation est la haute concentration nécessaire pour inhiber les bactéries pathogènes ou indésirables, et qui est parfois inacceptable pour le consommateur (Kobilinsky et al., 2007).

Les bactéries pathogènes peuvent développer certains mécanismes de résistance appelés « acid tolerance response » vis-à-vis de l'exposition à des pH bas. Ceux-ci leur sont également utiles pour survivre au transit intestinal. *L. monocytogenes* par exemple peut survivre à une exposition de 60 min à un pH de 3 (Cotter et al., 2003).

I.1.2. Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Le peroxyde d'hydrogène peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Zalan et al., 2005).

Certaines bactéries lactiques peuvent néanmoins se protéger contre le peroxyde d'hydrogène qu'elles produisent par la synthèse de catalase hexamérique ou tétramérique contenant du manganèse et qui sont parfois décrites comme étant des pseudocatalases (Strus et al., 2006).

La concentration de peroxyde d'hydrogène produite par des *Lactobacilli* varie entre 0.001 et 8 mM, en fonction de l'espèce, de la souche et des conditions de cultures (Zalan et al., 2005 ; Strus et al., 2006).

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. D'autre part, son action oxydante peut avoir un effet néfaste sur la santé humaine (Zalan et al., 2005).

I.1.3. Le dioxyde de carbone

Celui-ci est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (Ammor et al., 2006).

I.1.4. Le diacétyl

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp. et *Pediococcus* sp. Le diacétyl (C₄H₆O₂) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif non lactiques ; ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (El-Ziney et al., 1998).

I.1.5. La reutérine

La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par

certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium* (El-Ziney et al., 1998).

La fermentation du glycérol se déroule en deux étapes. Le glycérol sera tout d'abord déshydraté par une « glycérol deshydratase » pour former de la reutérine qui sera ensuite réduite en 1,3- propanediol par une oxydoréductase. Cette deuxième étape est inhibée en l'absence de glucose.

La reutérine s'accumule alors dans le microorganisme producteur. A haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* y sont plus résistantes (Vollenweider et Lacroix, 2004).

La reutérine a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les procaryotes (Gram-positif ou Gram-négatif), les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires. Elle interfère avec la réplication de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (Vollenweider et Lacroix, 2004).

I.2. Les substances antimicrobiennes protéiques ou bactériocines

Les bactéries lactiques sont connues par leur capacité d'inhiber dans les aliments le développement de bactéries pathogènes et de détérioration. Cette capacité d'antagonisme est attribuée à la production de métabolites antimicrobiens tels que les bactériocines. Achemchem et al. (2004) ont purifié et caractérisé une bactériocine anti- *Listeria* produite par *Enterococcus faecium* F-420 isolé à partir de lait cru de chèvre.

I.2.1. Définition des bactériocines

Le premier pas dans la reconnaissance des vertus des bactériocines date à 1925, quand André Gratia démontre que la substance inhibitrice, nommée aujourd'hui Colicine, produite par *E. coli* avait un effet antagoniste contre une autre souche de *E. coli* (De lima et Filho, 2005). En 1953, Jacob et al. proposèrent le terme général « bactériocine ». Elles furent définies comme des antibiotiques protéiques, caractérisés par une activité bactéricide intra-espèce et une internalisation via des récepteurs spécifiques sur la surface des cellules cibles (Jack et al., 1996 ; Cheikh Youssef et al., 2008).

En 1976, Tagg et al. définirent les bactériocines comme des composés protéiques ayant les caractéristiques suivantes : un spectre d'action inhibitrice faible, la présence

essentielle de la fraction protéinique biologiquement active, un mode d'action bactéricide, la fixation sur les récepteurs spécifiques des cellules (Tagg *et al.*, 1976 ; Jack *et al.*, 1995).

En 1988, Klaenhammer proposa une définition des bactériocines qui reste la plus largement acceptée. Il définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, synthétisées par les ribosomes avec une sécrétion extracellulaire et un faible poids moléculaires (30 à 60 acides aminés) avec une activité bactéricide contre les espèces proches de la souche productrice.

Montville et kaiser (1993) avaient suggéré que la définition des bactériocines doit se baser sur sa nature protéique et l'absence de létalité pour la cellule productrice.

I.2.2. Structure chimique des bactériocines

Plusieurs bactériocines produites par différentes bactéries lactiques ont été étudiées, mais les travaux portant sur leur nature chimique sont plus rares.

Les bactériocines diffèrent les unes des autres par leur sensibilité aux variations de pH et de température. Plusieurs bactériocines produites par les bactéries lactiques sont stables à pH acide et à pH neutre ; elles sont inactivées à pH supérieur à 8. La résistance à la chaleur, qui est une caractéristique majeure de plusieurs bactériocines des bactéries lactiques, peut varier considérablement dans une marge de 60°C ou 100°C pour plus de 30 min à une température de 121°C pendant 15 à 20 min (De Vuyst et Leroy, 2007).

I.2.3. Classification des bactériocines

Les bactériocines sont réparties en quatre classes, selon la classification de Klaenhammer (1993).

I.2.3.1. Classe I : Les lantibiotiques

Ce sont des peptides de taille inférieure à 5 KDa contenant des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement c'est à dire la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine.

Ces peptides sont stables à la chaleur. Ils peuvent être divisés en deux types : la classe Ia qui contient des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui contient les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (Mc Auliffe *et al.*, 2001). Les séquences et structures de quelques lantibiotiques sont reportées sur la figure 1.

I.2.3.2. Classe II

Ce sont des peptides de taille inférieure à 10kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés et chargés positivement à un pH neutre. Cette classe est divisée en trois sous classes (Guyonnet *et al.*, 2000 ; Drider *et al.*, 2006).

Les bactériocines de la sous classe IIa contiennent entre 27 et 48 acides aminés qui ont tous une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, de nature hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Fimland *et al.*, 2000 ; Richard *et al.*, 2006). Leur point isoélectrique varie entre 8 et 10. Elles ont toutes une activité contre *L. 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.

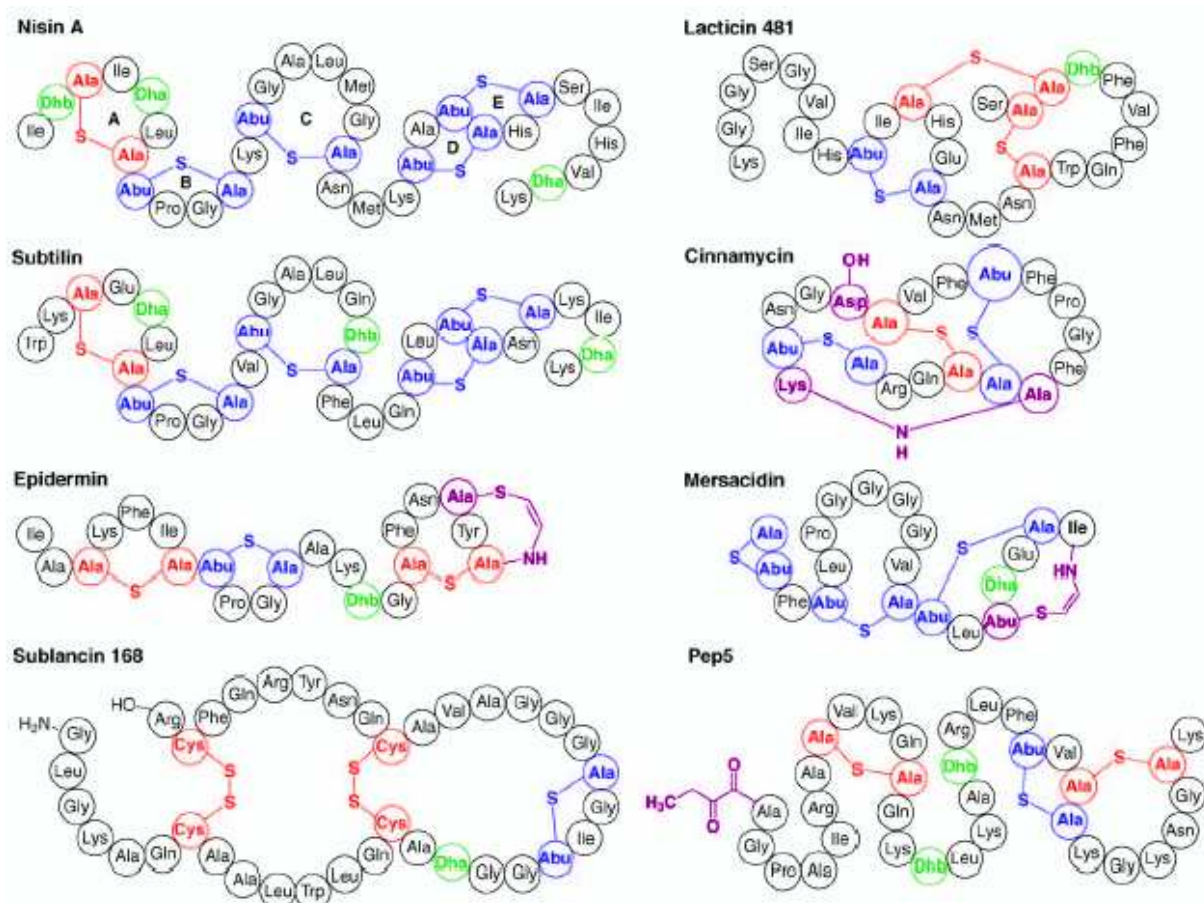


Figure 1 : Structure représentative de variétés de Lantibiotiques (Patton *et al.*, 2005).

Ces bactériocines semblent, avoir une meilleure activité antimicrobienne avec une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (Eijsink et al., 1998 ; Fimland et al., 2000 ; Drider et al., 2006 ; Richard et al., 2006).

Cependant, d'autres études ont suggéré que la séquence en acides aminés de ce domaine C-terminal était le facteur prédominant (Fimland et al., 2000 ; Johnsen et al., 2005).

La sous classe IIb contient les bactériocines nécessitant 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 et doivent être présents pour avoir une activité.

La sous classe IIc contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous classes.

I.2.3.3. Classe III

Elle contient des protéines thermosensibles de taille supérieure à 30kDa. 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'helvéticine J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysine A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocine A produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la millericine B produite par *Streptococcus milleri* (Papagianni, 2003 ; De Jong et al., 2006).

I.2.3.4. Classe IV

Elle contient les peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour que l'action inhibitrice soit exercée. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite (Klaenhammer, 1993).

I.2.4. Mécanisme de production des bactériocines et sa régulation

Différentes protéines sont impliquées dans la production et la régulation des bactériocines. Ces dernières sont produites sous forme d'un pré-peptide non-biologiquement actif, qui va subir des modifications post-traductionnelles, pour donner un peptide actif. Cette production est souvent régulée par un système de Quorum Sensing, qui est un mécanisme

permettant à certains gènes dont l'expression est en fonction de la densité de la population bactérienne (De Vuyst et Leroy, 2007).

I.2.5. Mécanismes d'action des bactériocines

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram-négatif. Cependant, les modes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés.

I.2.5.1. Les lantibiotiques

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques, ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II ou un précurseur de peptidoglycane dont la structure se trouve à la figure 2.

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 de petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP...

Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, c'est à dire le potentiel transmembranaire et le gradient de pH, ayant comme conséquence la cessation rapide des activités cellulaires et la mort de la cellule.

L'interaction avec le lipide II va permettre l'augmentation de la stabilité des pores formés et de réduire la concentration du lantibiotique nécessaire pour former un pore (Patton *et al.*, 2005).

La liaison des lantibiotiques avec le lipide II peut également inhiber la synthèse de la paroi cellulaire. D'autre part, certains lantibiotiques peuvent bloquer la sporulation (Mc Auliffe *et al.*, 2001 ; Bauer et Dicks, 2005 ; Patton *et al.*, 2005).

Les lantibiotiques de type A dissipent la force proton-motrice par formation de pores ce qui interfère avec la synthèse des peptidoglycane, alors que la plupart des lantibiotiques de type B agissent par inhibition de la synthèse des peptidoglycane. Néanmoins, certains lantibiotiques forment également des pores dans la membrane des cellules cibles (Bauer et Dicks, 2005 ; Patton *et al.*, 2005). La nisine, qui est un lantibiotique de type A synthétisé par *Lactococcus lactis*, interagit avec le lipide II au niveau du MurNAc tandis que la mersacidine,

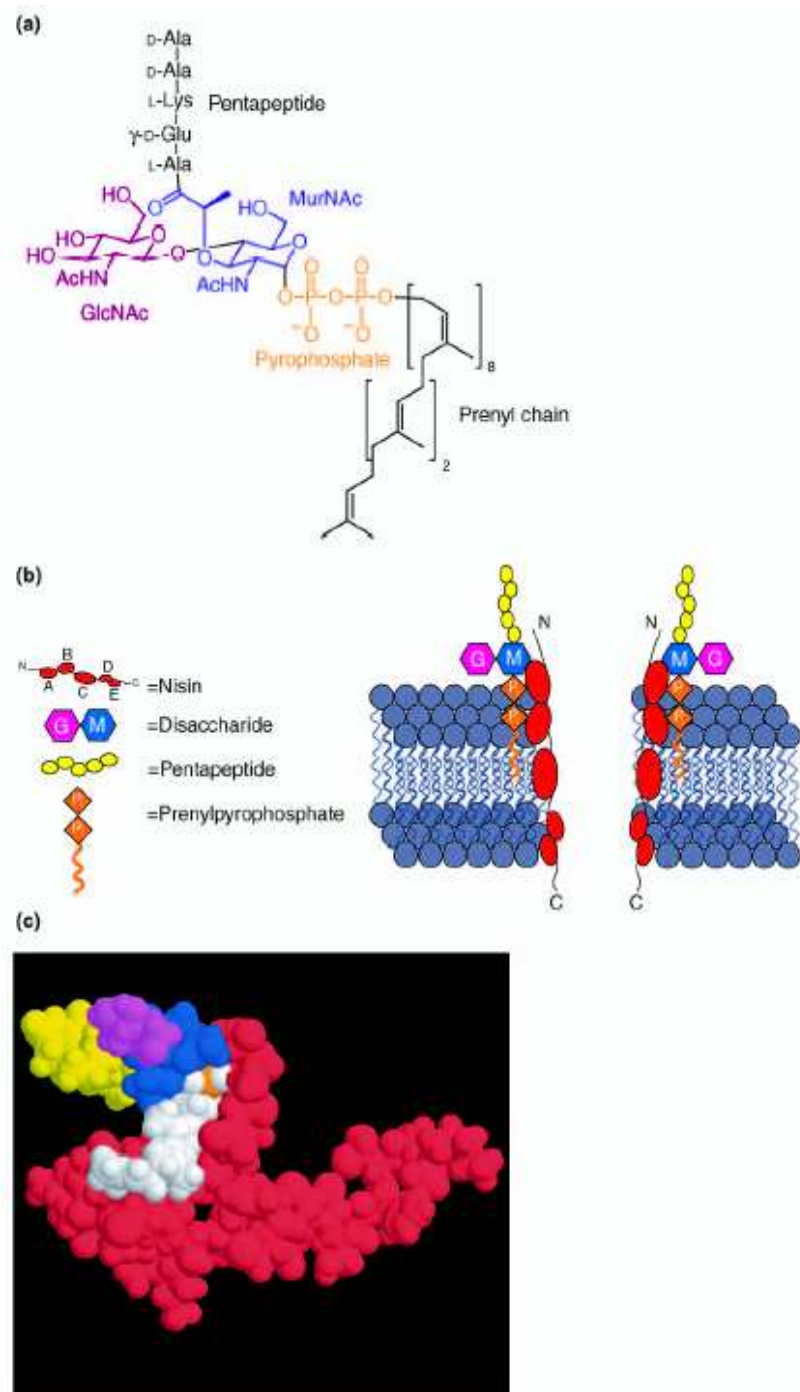


Figure 2: Détournement des lipides II pour la formation des pores. (a) La structure des lipides II est composée d'un acide N-acetylglucosamine-b-1,4-N-acetylmuramic disaccharide (GlcNAc–MurNAc), lequel est attaché par un pyrophosphate à une ancre membranaire de 11 unités isoprène (un decaprenylpyrophosphate). (b) l'amino-terminus d'adhésion de la nisine aux lipides II alors que le carboxy-terminus s'insère à la membrane bactérienne. (c) La Nisine est illustrée en rouge, la chaîne prenyl des lipides II est marqué en blanc, les atomes phosphate du groupe pyrophosphate sont montré en orange, et l'acide muramique en bleu. Le N-acetylglucosamine (GlcNAc) est montré en magenta et la chaîne pentapeptide est présentée en jaune (Patton *et al.*, 2005).

un lantibiotique de type B, interagit avec le GlcNAc du lipide II (Wiedemann *et al.*, 2006). Certains lantibiotiques ont besoin de deux peptides qui agissent ensemble pour avoir une activité.

Ces lantibiotiques sont aussi produits comme des pré-peptides qui seront ensuite modifiés comme les lantibiotiques simples afin d'avoir tous les deux des acides aminés modifiés. La lacticine 3147, un « two-peptide lantibiotic » dont la séquence se trouve à la figure 2, agit également par formation de pores dans la membrane des cellules cibles (Mc Auliffe *et al.*, 2001). Elle a un spectre d'action large.

Un des deux peptides, la lacticine A1, se caractérise par une activité qui est plus élevée en présence du deuxième peptide, la lacticine A2. Il a été récemment proposé que la lacticine A1 agit en se liant au lipide II ; ce qui inhibe la synthèse des peptidoglycanes et permet à la lacticine A2 de former un pore dans la membrane de la cellule cible (Morgan *et al.*, 2005; Wiedemann *et al.*, 2006).

I.2.5.2. Les bactériocines de classe II

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur, 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 (Hécharde *et al.*, 2001; Gravesen *et al.*, 2002).

Le mécanisme de formation des pores n'est pas connu même si l'hypothèse la plus courante est l'assemblage de différentes molécules de la bactériocine (Ennahar *et al.*, 2000 ; Fimland *et al.*, 2000 ; Diep *et al.*, 2007).

La formation de ces pores au niveau de la membrane plasmique par les bactériocines de classe IIa induit la perte d'ions potassium ainsi que d'acides aminés et d'autres molécules de faible poids moléculaire ; ce qui dissipe les deux composantes de la force proton motrice (Bauer et Dicks, 2005).

Les bactériocines de classe IIb ont, en général, un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram-positif. Elles rendent la membrane perméable à différentes petites molécules, des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la force proton motrice. Les ions transportés sont spécifiques de la bactériocine (Oppegard *et al.*, 2007).

Le rapport optimal d'activité de la plupart de ces bactériocines est 1:1 (Oppegard et al., 2007). Pour la lactocine 705, il est de 4:1 (Castellano et al., 2007).

Néanmoins, les mécanismes d'interaction des deux bactériocines entre elles et avec la membrane cellulaire ne sont que très peu connus. Il a été montré qu'il n'y avait pas de liaison au même récepteur que pour les bactériocines de classe IIa (la mannose transférase) (Diep et al., 2007).

Castellano et al. (2007) ont montré que les deux peptides composant la lactocine 705 ont des activités bien spécifiques. La lactocine 705 α interagit avec la surface de la membrane cellulaire et la déshydrate ; alors que la lactocine 705 β interagit avec cette partie déshydratée pour former des pores.

I.2.5.3. Les bactériocines de classe III

Le mode d'action de ce type de bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'enterolysine A, la zoocine A et la millericine B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycane des cellules sensibles. La zoocine A a un spectre d'action étroit alors que l'enterolysine A et la millericine B ont un spectre d'action large. L'helveticine J a un mode d'action bactéricide (Nilsen et al., 2003).

I.2.6. Mécanisme de résistance des cellules cibles aux bactériocines

Etant donné qu'une des utilisations principales des bactériocines est leur application dans l'industrie alimentaire pour prévenir des contaminations par des bactéries pathogènes telles que *L. monocytogenes*, le développement de souches résistantes peut être un problème.

I.2.6.1. Résistance aux lantibiotiques

Le mécanisme de résistance des lantibiotiques le plus étudié est celui de la résistance à la nisine. La fréquence d'apparition des résistances varie en fonction de la souche cible et des conditions environnementales (pH, concentration en chlorure de sodium et température). L'apparition d'une résistance est souvent associée à une diminution du taux de croissance maximale de la cellule (Gravesen et al., 2002).

Il a été montré que les mutants résistants n'avaient pas de modification au niveau du lipide II (Kramer et al., 2006).

La résistance à la nisine a été attribuée à une différence de la composition en acide gras dans la membrane ainsi qu'à des modifications au niveau de la paroi cellulaire (Kramer et al., 2006 ; Naghmouchi et al., 2007).

Kramer et al. (2006) ont montré que des souches de *Lactococcus lactis*, résistantes à la nisine exprimaient différemment 93 gènes par rapport à la souche sauvage non résistante, 62 étant plus exprimés et 31 étant sous exprimés. Cette étude a permis de montrer que le mécanisme principal de résistance semblait être d'empêcher la bactériocine d'atteindre le lipide II par différents modes et qui sont les suivants :

- Changer la paroi cellulaire en l'épaississant, la faisant plus dense ou en changeant sa charge.
- Elever le pH local à l'extérieur de la membrane cytoplasmique.
- Changer l'expression de l'opéron *fab* qui est impliqué dans l'élongation et la saturation des phospholipides, ce qui augmente la fluidité de la membrane et empêche la nisine de former des pores.
- Changer les transporteurs **ATP Binding Cassette** présents. Ils peuvent être impliqués dans l'excrétion de la nisine hors de la membrane cytoplasmique, l'empêchant d'atteindre le lipide II.

D'autre part, il a été montré que l'adsorption de la lacticine 3147 sur la membrane des cellules cibles était diminuée chez les mutants résistants (Guinane et al., 2007).

L'apparition d'une résistance vis-à-vis d'un antibiotique peut induire une résistance contre un autre. Par exemple, l'apparition d'une résistance contre la lacticine 3147 induit une résistance à la nisine (Guinane et al., 2007).

I.2.6.2. Résistance aux bactériocines de classe IIa

Les résistances aux bactériocines de classe IIa sont souvent très élevées (Gravesen et al., 2002). Les mutations spontanées apparaissent après exposition à la bactériocine. *L. monocytogenes* développe des résistances aux bactériocines de classe IIa à la fréquence de 10^{-3} à 10^{-6} (Gravesen et al., 2002).

Cette fréquence d'apparition des résistances varie en fonction de la souche, de la bactériocine et de facteurs environnementaux tels que le pH, la concentration en chlorure de sodium et la température (Gravesen et al., 2002).

Différents mécanismes sont à l'origine de cette résistance :

- L'augmentation du pourcentage d'acides gras insaturés dans la membrane et du nombre de chaînes courtes. Ces modifications augmentent la fluidité de la membrane en diminuant les potentialités d'insertion de la bactériocine et la formation des pores (Vadyvaloo et al., 2002).
- L'absence de la mannose phosphoenolpyruvate-dépendant phosphotransférase (PSTS), la molécule transmembranaire qui est une mannose perméase, réceptrice de la bactériocine (Vadyvaloo et al., 2004).

Il a été montré que, chez *L. monocytogenes*, l'inactivation du gène *rpoN* et de l'opéron *mpt* codant pour la mannose perméase induit la résistance de *L. monocytogenes*.

La mannose perméase est une protéine transmembranaire qui assure le transport du sucre (mannose, glucose et 2-deoxyglucose chez *L. monocytogenes*) et sa phosphorylation de part et d'autre de la membrane cellulaire chez *L. monocytogenes*, cette molécule contient trois sous-unités.

Le gène *rpoN* code pour la sous-unité σ_{54} de la RNA polymérase bactérienne qui dirige l'activation de la transcription de l'opéron *mpt*. Dans les mutants résistants, une diminution de l'expression du gène codant pour la mannose perméase et une augmentation de l'expression du gène codant pour la phosphotransférase spécifique des β -glucosides ont été remarquées (Gravesen et al., 2002 ; Vadyvaloo et al., 2002).

Par ailleurs, il a été montré que des mutants résistants avaient un taux de croissance maximal réduit (Gravesen et al., 2002). Cette réduction peut être la cause de la diminution de la capacité à transporter des nutriments, comme le glucose, de part et d'autre de la membrane cellulaire (Naghmouchi et al., 2007).

I.2.6.3. Les cross-résistances ou résistances croisées

Les mécanismes de résistances aux lantibiotiques et aux bactériocines de la classe IIa ne sont pas les mêmes. Cependant, la résistance aux lantibiotiques peut parfois entraîner une résistance aux bactériocines de classe IIa ou inversement.

Par exemple, Naghmouchi et al. (2007), ont montré que la résistance de *L. monocytogenes* acquise à la nisine A ou Z augmente la résistance à la pediocine PA-1 et à la divergicine M35, deux bactériocines de classe IIa.

D'autre part, les mutants résistant à la divergicine M35 montrent une résistance accrue à la nisine Z, mais réduite à la nisine A. Les mutants résistants à la pediocine PA-1, quant à eux, ont une résistance plus élevée à la nisine Z et la divergicine, mais diminuée à la nisine A.

1.2.7. Les facteurs influençant 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 lactique productrice ou être adsorbées à sa surface ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture (Yang *et al.*, 1992).

Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH et la composition du milieu.

Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux optimaux pour la croissance. C'est, par exemple, le cas de la production de la sakacine P par *Lb. sake* CCUG42687 (Moretro *et al.*, 2000).

La composition du milieu, tout particulièrement les sources et concentrations de carbone et azote, affectent fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques productrices 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 (Mataragas *et al.*, 2004 ; Todorov *et al.*, 2005).

1.2.8. Mécanismes d'autoprotection de la cellule microbienne vis-à-vis de sa propre sécrétion de bactériocines

Les bactériocines sont codées par des opérons qui régulent leur synthèse, en plus de cette fonction et ces mêmes opérons codent pour une autoprotection de la cellule sécrétrice vis-à-vis de ses propres bactériocines.

1.2.8.1. Autoprotection vis-à-vis de la nisine

Le support génétique de la nisine a été très étudié et la production de cette bactériocine serait liée à la présence d'un plasmide de 17,5 MDa. Tsai et Sandine (1987, cités par Frey, 1993) ont observé une corrélation positive entre l'apparition de souches Nip⁻ (ne

produisant pas de nisine) et Suc⁻ (ne fermentant pas le sucrose) d'une part et la perte d'un plasmide de 17,5 MDa d'autre part.

Ce plasmide de 17,5 MDa de *Streptococcus lactis* portant les gènes Nip⁺ et Suc⁺ a été transféré par conjugaison à *Leuconostoc dextranicum*, et a permis d'obtenir une souche super-productrice de nisine.

Les déterminants géniques de la nisine se trouvent localisés sur un grand bloc génomique comprenant en plus du gène de production de la nisine (Nip⁺), le gène de l'autoprotection vis-à-vis de la nisine (Nisⁱ), le gène de fermentation du saccharose (Suc⁺), de résistance aux bactériophages et de l'ornithine synthase (Klaenhammer et al., 1994).

La présence d'une séquence d'insertion (1S904) en amont du gène précurseur de la nisine suggère un système de cassette fonctionnant de manière similaire à un transposon conjugatif. Ceci devrait donner lieu à des transconjugants parmi d'autres bactéries lactiques mais le transfert n'a pas été observé sauf pour *Leuconostoc dextranicum* (Tsai et Sandine, 1987, cités par Frey, 1993).

1.2.8.2. Autoprotection vis-à-vis de la lactacine F

Une sonde oligonucléotidique de 63 résidus, dérivée de la séquence N-terminale de cette bactériocine, a été mise à profit pour identifier et cloner un fragment chromosomique de 2,2 Kb de *Lactobacillus acidophilus* NCK 88 qui porte les déterminants géniques de la production et de l'autoprotection vis à vis de la lactacine F (Muriana et Klaenhammer, 1991).

1.2.8.3. Autoprotection vis-à-vis de la sacacine A

La sacacine est produite par *Lactobacillus sakei*. L'étude du profil plasmidique de la souche productrice de cette bactériocine et celui de deux mutants bactériocine a montré une corrélation positive entre la production de cette bactériocine (et l'autoprotection vis à vis d'elle-même), et la présence d'un plasmide de 18 MDa (Schellinger et Lucke, 1989, cités par Frey, 1993).

1.2.8.4. Autoprotection vis-à-vis de la mesentéricine Y105

Elle est produite par une souche de *Leuconostoc mesenteroides*. La déduction de deux sondes oligonucléotidiques des extrémités de la protéine a permis de cloner le gène de structure de cette bactériocine. Ce gène ainsi que celui codant pour la protéine de

l'autoprotection vis-à-vis de la bactériocine sont portés par un plasmide d'environ 16 Kb (Nieto-Lazano et al., 1992, cités par Klaenhammer et al., 1994).

I.2.9. Utilisations des bactériocines

I.2.9.1. Lutte et prévention contre les infections

La production de bactériocines suscite un grand intérêt en pharmacologie car ces substances protéiques sont des petites molécules à faible poids moléculaire, et par conséquent, peuvent pénétrer facilement à l'intérieur des entérocytes. Ceci constitue un moyen direct d'inhiber les germes pathogènes qui pénètrent dans ces cellules et en particulier les entéro-pathogènes (Klaenhammer et al., 1994).

I.2.9.2. Biopréservation des aliments

Il est essentiel de donner de l'importance à la détermination de l'organisation génétique, de la régulation, et des relations structure-activité des bactériocines sécrétées par les bactéries lactiques et les bifidobactéries.

Ce type d'information devrait permettre une approche génétique directe, pour l'élaboration de systèmes antimicrobiens plus efficaces et plus compétitifs, et pour la préparation de ferments antagonistes et de conservation alimentaire. Comme exemple de bactériocine utilisée comme conservateur, il y a la nisine qui est produite par *Lactococcus lactis*, et dont l'effet antagoniste s'étend à la majorité des bactéries à Gram positif.

L'emploi de ferments hétérolactiques résistants à la nisine et associés à un apport de nisine, ou à des souches productrices de nisine, pourrait être à l'avenir d'un grand intérêt technologique permettant d'améliorer le pouvoir compétitif des ferments utilisés dans les productions traditionnelles.

En tant que marqueurs génétiques, les déterminants de production de bactériocines et d'autoprotection du microorganisme qui les synthétise constituent d'excellents candidats pour l'élaboration de vecteurs de clonage et d'expression de qualité alimentaire (Klaenhammer et al., 1994).

La bioconservation des aliments fait l'objet depuis 40 ans de nombreuses études. Elle consiste en une augmentation de la durée de vie et une amélioration de la sécurité sanitaire des produits alimentaires, en utilisant des microorganismes et/ou leurs métabolites (Ross et al., 2002 ; Stiles, 1997).

L'HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points) est une méthode de gestion qui identifie, évalue et maîtrise les dangers significatifs au regard de la sécurité des aliments. Malgré la mise en œuvre de technologies modernes et de concepts de sécurité sanitaires, l'HACCP n'est toujours pas arrivée à contrôler l'émergence de nouveaux pathogènes colonisant les denrées. Dans ce contexte, les bactéries lactiques et/ou leurs métabolites utilisés depuis des millénaires d'une façon empirique par de nombreuses populations, peuvent contribuer à la conservation des aliments (Ross et al., 2005).

Ainsi, c'est grâce aux propriétés antimicrobiennes des métabolites qu'ils synthétisent, tels que l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle (Atrih et Foster, 2001), les composés antifongiques (Corsetti et al., 1998), les acides phényl-lactiques (Lavermicocca et al., 2000), les antibiotiques comme la reutéricycline (Höltzel et al., 2000) et les bactériocines, que les bactéries lactiques sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires (Abee et al., 1995, Klaenhammer, 1988).

Afin de diminuer l'utilisation des additifs chimiques dans l'alimentation et d'obtenir des aliments prêts à la consommation et respectant les règles de la sécurité sanitaire, l'industrie agroalimentaire en Europe s'intéresse à l'utilisation des bactériocines comme bioconservateurs (Robertson et al., 2004).

L'absence de toxicité pour les cellules eucaryotes et la perte d'activité en présence des protéases présentes dans le tube digestif présentent des propriétés qui pourraient placer les bactériocines parmi les substances sans danger pour l'Homme. Elles doivent cependant, pour le moment, être considérées comme un moyen de conservation complémentaire à ceux déjà existants (Deegan et al., 2006). Pour améliorer leur conservation, les aliments sont soit supplémentés en bactéries productrices, la bactériocine étant produite *in situ*, soit en bactériocine *ex situ*.

I.2.9.3. Utilisation à des fins médicales

L'émergence de la résistance aux antibiotiques conventionnels ces dernières années a orienté la recherche vers l'étude de nouveaux agents antimicrobiens. Le mode d'action des bactériocines qui diffèrent de ceux des antibiotiques conventionnels et l'innocuité des bactériocines permettraient leur utilisation comme alternative aux antibiotiques dans la prévention et/ ou le traitement des infections dues à des bactéries devenues résistantes aux traitements conventionnels (Dicks *et al.*, 2011).

Contrairement aux applications alimentaires des bactériocines, aucune bactériocine n'est à ce jour commercialisée comme médicament. Cependant, quelques-unes d'entre elles sont en cours d'essais cliniques pour le traitement d'infections cutanées, respiratoires, systémiques et/ ou urogénitales ainsi qu'en tant qu'agents contraceptifs. Parmi elles, il y a la rBPI21 en phase clinique III pour le traitement de la méningite (Hancock, 2000).

- Traitements d'infections cutanées

L'émergence de souches de *Staphylococcus aureus* multi-résistantes incluant une résistance à la méthicilline (SARM) pose, depuis longtemps, un réel problème dans les traitements d'infections nosocomiales cutanées (Taylor *et al.*, 1992).

La vancomycine est un antibiotique à usage strictement hospitalier considéré comme le seul traitement pour les infections aux SARM. La mersacidine est un antibiotique produit par *Bacillus sp.* HIL Y-85,54728 et qui est actif contre de nombreuses bactéries pathogènes telles *Listeria*, *Staphylococcus* ou *Streptococcus* dont les SARM (Sass *et al.*, 2008). Injectée par voie intra-nasale chez des souris infectées par des SARM et traitées à l'hydrocortisone, la mersacidine est active à des concentrations de 1, 5 et 10 mg/l contre les SARM, la CMI étant égale à 1 mg/l (Kruszewska *et al.*, 2004).

Comme la vancomycine, la mersacidine agit en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne chez les bactéries à Gram positif mais elle vise une cible différente, ce qui permettrait d'associer les deux agents antimicrobiens dans un même traitement et de contourner ainsi la résistance bactérienne (Chatterjee *et al.*, 1992). De plus, la mersacidine est active contre *Propionibacterium acnes*, une espèce bactérienne rencontrée dans certains problèmes cutanés responsables d'acné, ce qui pourrait lui conférer une utilisation potentielle dans le traitement de ce type d'infection (Niu *et Neu*, 1991).

La lacticine 3147, un autre lantibiotique, inhibe la prolifération de *Staphylococcus aureus* et des SARM à différents pH ce qui permettrait d'envisager son utilisation contre ces infections (Galvin et al., 1999).

D'autres bactériocines du groupe des lantibiotiques comme l'épidermine et la gallidermine produites respectivement par *Staphylococcus epidermis* et *Staphylococcus gallinarum* sont actives contre *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermis* à des CMI de 4 et 8 mg/l (Kellner et al., 1988).

- **Traitements de la gingivite**

La gingivite est une inflammation des gencives associée à la plaque dentaire. La plaque dentaire est générée par un biofilm principalement formé de bactéries du genre *Staphylococcus* ou *Streptococcus* (Farge, 1998). Des tests *in vivo* réalisés chez les chiens ont montré l'efficacité des lantibiotiques, comme la nisine, dans la prévention de la formation de plaques dentaires et d'apparition de gingivites (Howell et al., 1993). Depuis lors, la nisine a été introduite dans des bains de bouche.

BLIS K12TM (Bacteriocin Like Inhibitory Substances K12TM), est un produit commercial contenant des souches de *Streptococcus salivarius* qui produisent deux bactériocines, la salivaricine A2 et B actives vis-à-vis des bactéries responsables de la mauvaise haleine (Tagg, 2004).

- **Traitements de la mastite**

La mastite est une infection bactérienne des glandes mammaires causée par des bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus uberis* et survenant pendant la période d'allaitement. Elle provoque une importante perte économique dans l'industrie laitière (Bradley, 2002, Riffon et al., 2001). Administrée par voie intra-mammaire chez les vaches, la nisine A inhibe la prolifération des souches de *Staphylococcus* et *Streptococcus* responsables de cette infection (Broadbent et al., 1989, Cotter et al., 2005).

- **Traitements de l'otite**

L'otite est l'infection la plus répandue chez les enfants âgés de moins de 2 ans (Segal et al., 2005). Elle est causée par des bactéries à Gram positif comme *Haemophilus influenzae* (productrices de β -lactamases), *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus pneumoniae* multi-résistants, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyrogenes* et des bactéries à Gram négatif

comme *P. aeruginosa* (Segal et al., 2005). La forme la plus grave de la maladie peut entraîner une surdité chronique (Roland et Stroman, 2002).

La nisine présente un effet bactéricide rapide vis-à-vis de *Staphylococcus pneumoniae* à l'origine d'otite chez la souris à des concentrations inférieures à 1 mg/l. Elle pourrait remplacer l'utilisation de la vancomycine pour le traitement de ce type d'infection afin d'éviter l'apparition de résistance (Goldstein et al., 1998, Mota-Meira et al., 2000).

La bactériocine ST4SA, une bactériocine de classe IIa, produite par *Enterococcus mundtii* est active contre les bactéries à Gram positif responsables d'infections dans l'oreille moyenne (Knoetze et al., 2008). La ST4SA est plus active que d'autres agents antimicrobiens tels que les aminoglycosides, céphalosporines, quinolones, fluoroquinolones, lincosamides, macrolides, nitroimidazole, pénicilline et vancomycine vis-à-vis des pathogènes responsables d'infections de l'oreille moyenne. Ceci suggère que la ST4SA pourrait faire l'objet d'un nouveau traitement de l'otite (Knoetze et al., 2008).

- Traitements d'infections systémiques

Les bactériocines de classe II sont généralement actives contre des bactéries pathogènes à l'origine d'infections systémiques par *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* (Czuprynski et al., 2002, Harbarth et al., 1998). L'activité anti-*Listeria* des bactériocines de classe II suggère une utilisation potentielle de ces bactériocines pour prévenir la listériose.

La listériose est une infection causée par *Listeria monocytogenes* particulièrement grave lorsqu'elle survient chez la femme enceinte, les enfants, les personnes âgées ou immuno-déprimées. Malgré les nombreux tests réalisés *In vitro* avec les bactériocines de classe II contre les bactéries du genre *Listeria*, très peu ont fait l'objet de tests *in vivo*. Lorsqu'elles sont injectées chez des souris infectées par *Listeria monocytogenes*, la piscicoline 126 et l'abp-118, deux bactériocines respectivement des classes IIa et IIc, inhibent la prolifération du pathogène (Corr et al., 2007 ; Ingham et al., 2003). La divercine V41, une autre bactériocine de classe IIa, a récemment présenté une activité antimicrobienne dirigée vis-à-vis *Listeria monocytogenes* EGDe *in vivo* chez la souris (Rihakova et al., 2010).

Helicobacter pylori est une bactérie exclusivement retrouvée dans l'estomac humain impliquée dans l'apparition d'ulcères, de gastrites chroniques et/ ou de cancers gastriques lors d'infections graves. D'autres espèces d'*Helicobacter* ont, cependant, été identifiées chez d'autres mammifères, ainsi que chez certains oiseaux.

La nisine produite par les laboratoires AMBI (Purchase, New York) a passé avec succès les tests cliniques de phase I et peut dès lors être considérée comme un futur traitement contre des infections dues à ce pathogène. Par ailleurs, deux laboratoires pharmaceutiques, Astra et Merck ont déjà commercialisé la nisine pour traiter des infections gastriques et des ulcères causés par *Helicobacter pylori* (Dicks et al., 2011).

La flore vaginale est composée d'un grand nombre d'espèces bactériennes parmi lesquelles *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Staphylococcus epidermis*, *Micrococcus luteus*. *Lactobacillus* sp. constitue le genre bactérien le plus important dans la flore vaginale chez la femme saine et assure une protection contre les infections vaginales et urinaires par acidification du milieu et en produisant des bactériocines (Nomoto, 2005).

Différents *Lactobacillus* sp. ont depuis longtemps été utilisés pour développer des traitements préventifs et curatifs contre des infections vaginales (Barbés et Boris, 1999, Maggi et al., 2000). Administrés par voie vaginale et orale chez la femme, *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 et *Lactobacillus fermentum* inhibent la prolifération d'*E. coli* à l'origine d'infections urinaires et de champignons responsables de vaginose (Reid et Bruce, 2001). D'autres études similaires ont été entreprises mais aucune n'a encore abouti à un traitement.

La subtilosine A est un antibiotique produit par *B. subtilis* (Babasaki et al., 1985) actif vis-à-vis des pathogènes parmi lesquels *Listeria monocytogenes*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae* et *Micrococcus luteus* (Sutyak et al., 2008a). Son activité restreinte à *G. vaginalis* permet un maintien de la flore commensale intacte (Sutyak et al., 2008a).

Des tests de cytotoxicité de la subtilosine A réalisés *in vitro* en utilisant un modèle de tissu cervical humain (Mat, Ashland, MA) ont montré qu'elle détruisait seulement 5% des cellules après 24 h d'exposition (Sutyak et al., 2008a). L'innocuité de la subtilosine A à la flore commensale vaginale ainsi qu'aux tissus humains la place parmi les meilleurs candidats à un futur traitement aux infections vaginales. En plus d'inhiber la prolifération des pathogènes à l'origine d'infections vaginales, la subtilosine A se caractérise par un effet spermicide. Testée *in vitro* sur des spermatozoïdes humains, la subtilosine A inhibe leur motilité à une IC50 de 64,5 µg/mL (Sutyak et al., 2008b).

I.2.10. Conditionnements des bactériocines

Malgré les résultats prometteurs des bactériocines quant aux applications potentielles dans le domaine médical, leur nature peptidique engendre une instabilité une fois dans les milieux biologiques. Plusieurs formes ont été proposées afin de contourner ce problème parmi lesquelles la forme de distribution des bactériocines entourée d'un film polymérique sous forme de nanoparticules.

Le film polymérique d'acide lactique (PolyLactic Acide, PLA) est l'un des seuls polymères utilisables pour l'administration de bactériocines chez l'Homme qui soit accepté par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (Nair et Laurencin, 2007).

L'encapsulation de la nisine dans du PLA pour former des nanoparticules (Salmaso et al., 2004) permet la libération de la bactériocine active en fonction de la concentration en sels et le pH du milieu, permettant ainsi de cibler le site d'action, pendant plus de 1000 heures. D'autres formes d'administrations plus récentes comme les nanofibres (Heunis et Dicks, 2010) présentent des résultats prometteurs et pourraient être également utilisées comme futures formes de conditionnements.

I.2.11. Limites d'utilisation des bactériocines

L'application des bactériocines constitue certes une méthode « naturelle » de conservation des aliments, mais sa mise en œuvre n'est pas facile. En effet, les nombreuses propriétés des bactériocines favorisant leur utilisation dans le domaine agroalimentaire et/ ou médical n'empêchent pas l'existence de contraintes relatives à leur utilisation.

Le coût élevé de préparations de bactériocines pures prêtes à l'emploi entraîne de loin la limite la plus importante. D'où l'utilisation plus commune des souches productrices plutôt que des bactériocines isolées. La composition de l'aliment représente le premier facteur pouvant réduire ou totalement dissiper l'activité inhibitrice de la bactériocine en raison de son adsorption sur des composants du produit, la limitation de sa solubilité et de sa diffusion, sa dégradation par des protéases, l'interaction avec des additifs alimentaires ou des ingrédients et/ ou un pH inapproprié.

Les traitements appliqués aux produits constituent un deuxième facteur pouvant limiter l'activité antimicrobienne de la bactériocine dans un produit alimentaire. En effet, des

traitements thermiques trop élevés peuvent dégrader les bactériocines bien que la majorité d'entre elles soient résistantes à la chaleur (Dortu et Thonart, 2009 ; Gálvez et al., 2007).

Le dernier facteur limitant l'activité des bactériocines est la présence de bactéries résistantes et de microorganismes qui dégradent les bactériocines par l'effet de protéases qu'elles produisent à l'état physiologique. De plus, dans les produits solides, les bactéries forment des biofilms dont la résistance aux bactériocines peut être plus élevée (Schöbitz et al., 2003).

D'autre part, il sera également important de considérer l'impact de la bactériocine sur la flore résidente. La sensibilité de la flore à la bactériocine entraîne un déséquilibre qui peut conduire à la croissance et la prolifération de microorganismes pathogènes résistants aux bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

CHAPITRE II

MATERIELS

ET

METHODES

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Nature des souches retenues dans cette expérience.

II.1.1. Les souches lactiques expérimentales

Les échantillons utilisés dans ce travail proviennent de selles de des nourrissons sains âgés de 2 mois, allaités exclusivement au sein et ne recevant aucune antibiothérapie (tableau 1).

Tableau 1: Les différentes souches lactiques expérimentales isolées.

Souches	N° d'échantillonnage des selles
LBRE-LSAS	Echantillon N°1
LbM2a	Echantillon N°1
EMX1	Echantillon N°2
EMX2	Echantillon N°2

II.1.2. Les souches pathogènes et lactiques indicatrices

Les souches indicatrices utilisées, qu'elles soient pathogènes ou lactiques, sont toutes de référence et proviennent de nos différents laboratoires partenaires étrangers (tableau 2).

II.2. Protocole d'isolement et d'identification des souches lactiques expérimentales.

II.2.1. Prélèvements des échantillons de selles

Avant d'effectuer l'isolement, nous avons réalisé une coloration de Gram pour chaque échantillon prélevé pour la détection de bactéries à Gram positif. L'isolement des *Lactobacillus. sp* se fait par pesée (aseptique) de 1 gramme de selles à partir duquel on effectue une série de dilutions décimales dans de l'eau peptonée. Des volumes de 100µl sont prélevés des dilutions 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} etensemencés par étalement sur le milieu le MRS gélosé et les boites sont incubées pendant 5 jours à 37°C en anaérobiose.

Tableau 2 : Différentes souches pathogènes et lactiques indicatrices utilisées.

Microorganismes indicateurs	Référence des souches ^a	Milieux-incubation, Température
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CECT 4695	MRS, 37°C
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 748	MRS, 37°C
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT 4529	MRS, 37°C
<i>Lactobacillus sakei</i>	LTH673 Notre Collection	MRS, 37°C
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 7469	MRS, 37°C
<i>Lactobacillus sakei</i>	K23 INRA	MRS, 37°C
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 9884	BHI, 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862	BHI, 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	BHI, 37°C
<i>E. coli</i>	ATCC 25122	BHI, 37°C
<i>E. coli</i>	DH10B INRA	BHI, 37°C
<i>Shigella dysenteria</i>	CECT 457	BHI, 37°C
<i>Shigella sonnei</i>	CECT 584	BHI, 37°C
<i>Carnobacterium maltoaromaticum</i>	DSM 20730 INRA	BHI, 37°C
<i>Carnobacterium maltoaromaticum</i>	DSM 20722 INRA	BHI, 37°C
<i>Enterococcus faecalis</i> (X2)	Notre collection	BHI, 37°C
<i>Micrococcus luteus</i>	CECT 241	BHI, 37°C
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10420	BHI, 37°C
<i>Listeria innocua</i>	BUG498 Institut Pasteur	BHI, 37°C
<i>Listeria innocua</i>	BUG499 Institut Pasteur	BHI, 37°C
<i>Listeria innocua</i>	CECT 910	BHI, 37°C
<i>Carnobacterium maltoaromaticum</i>	CECT 5808	BHI, 37°C

^a ATCC, American Type Culture collection; CECT: Colección Española de Cultivos Tipos; DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen ; Institut Pasteur, Paris.

II.2.2. Milieux de culture MRS et conditions de croissance

Le milieu MRS à pH 6.5 (De Man *et al.*, 1960) a été utilisé pour la culture des bactéries lactiques sous forme de bouillon ou sous forme solide (gélifié).

II.2.3. Caractérisation phénotypique des souches

II.2.3.1. Examens macroscopique et microscopique des cultures

Ils consistent à observer les aspects macroscopiques et microscopiques des colonies apparues sur le milieu d'isolement. C'est à partir des colonies blanchâtres caractéristiques aux *Lactobacillus* que l'on réalise une coloration de Gram (Larpent & Larpent-Gourgaud, 1997) pour s'assurer de la présence de cellules à Gram positif et également pour noter leur morphologie et leur mode d'agencement.

Ces examens nous permettent de repiquer et purifier seulement les colonies Gram positif et catalase négative sur le milieu MRS.

II.2.3.2. Coloration de Gram

Sur les frottis fixés et préparés précédemment, nous avons ajouté quelques gouttes de gentiane qu'on laisse agir 1 min. Le colorant est éliminé et la préparation est recouverte de lugol (solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium) pendant 30 secondes.

Cette préparation est répétée une deuxième fois avant d'être décolorée à l'alcool 90° pour, ensuite, être lavée à l'eau distillée. Enfin, quelques gouttes de fuchsine de Ziehl sont versées sur la lame qu'on laisse agir 1 min. La lame est de nouveau lavée à l'eau distillée et séchée. L'observation microscopique est faite à l'immersion.

II.2.3.3. Recherche de la catalase

Le test consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée diluée 10 fois, et à dissocier directement un peu de la culture prélevée sur milieu solide (Kandler and Weiss, 1986 ; Sharpe, 1979). Lecture : si la souche examinée possède une catalase, un dégagement de

bulles gazeuses est observé et le contraire indique l'absence de l'enzyme, seuls les isolats à catalase négative sont sélectionnés.

II.2.3.4. Détermination du profil fermentaire

La galerie Api 50 CH (BioMérieux, France) est utilisée pour déterminer le profil de fermentation de souches de bactéries lactiques (McLeod *et al.*, 2008). Cette galerie combinée est constituée de 50 microtubes qui contiennent différents substrats carbonés et un indicateur de pH, le bromocrésol pourpre. Les microtubes présentent deux parties, un tube et une cupule. Les tubes sont remplis avec le milieu API 50 CHL Medium de BioMérieux (France) inoculé par la souche à tester. La cupule est remplie d'huile de paraffine stérile.

Après avoir vérifié la pureté des souches sélectionnées sur gélose MRS, les colonies sont mises en suspension dans le milieu API 50 CHL avec une opacité de McFarland 2 (BioMérieux) (densité des cellules équivalente à 6.10^8 UFC.mL⁻¹), puis inoculées dans les cupules de la galerie API 50 CH. Durant l'incubation à 37°C pendant 48h, en aérobiose, le catabolisme des glucides conduit à la production d'acides organiques qui provoquent le virage de l'indicateur de pH. Les résultats de fermentation des 49 sucres de la galerie sont traités avec le système d'identification (BioMérieux SA) sur APIWEB (<https://apiweb.biomerieux.com>), en utilisant des données phénotypiques pour prédire l'identité de l'espèce de la souche testée (Lengkey *et al.*, 2009).

Cette méthode est pratique et ses résultats sont obtenus rapidement. Cependant, pour l'identification de nouveaux isolats naturels, les résultats obtenus par cette méthode peuvent être trompeurs, car il y a une forte probabilité de détection d'une nouvelle espèce non incluse dans la base de ces systèmes, mais possédant un profil d'utilisation de substrat similaire à celui utilisé par une souche au sein de la base de données (Busse *et al.*, 1996).

II.2.4. Caractérisation génétique des souches

II.2.4.1. Extraction de l'ADN génomique des souches

L'ADN total des bactéries lactiques est purifié à l'aide du kit d'extraction d'ADN génomique Wizard Genomic DNA purification kit (Promega). Cette méthode rapide permet l'obtention d'acide nucléique de bonne qualité directement utilisable pour différentes applications de biologie moléculaire. Les différentes étapes de cette extraction sont indiquées sur le protocole ci-dessous (fig. 3).

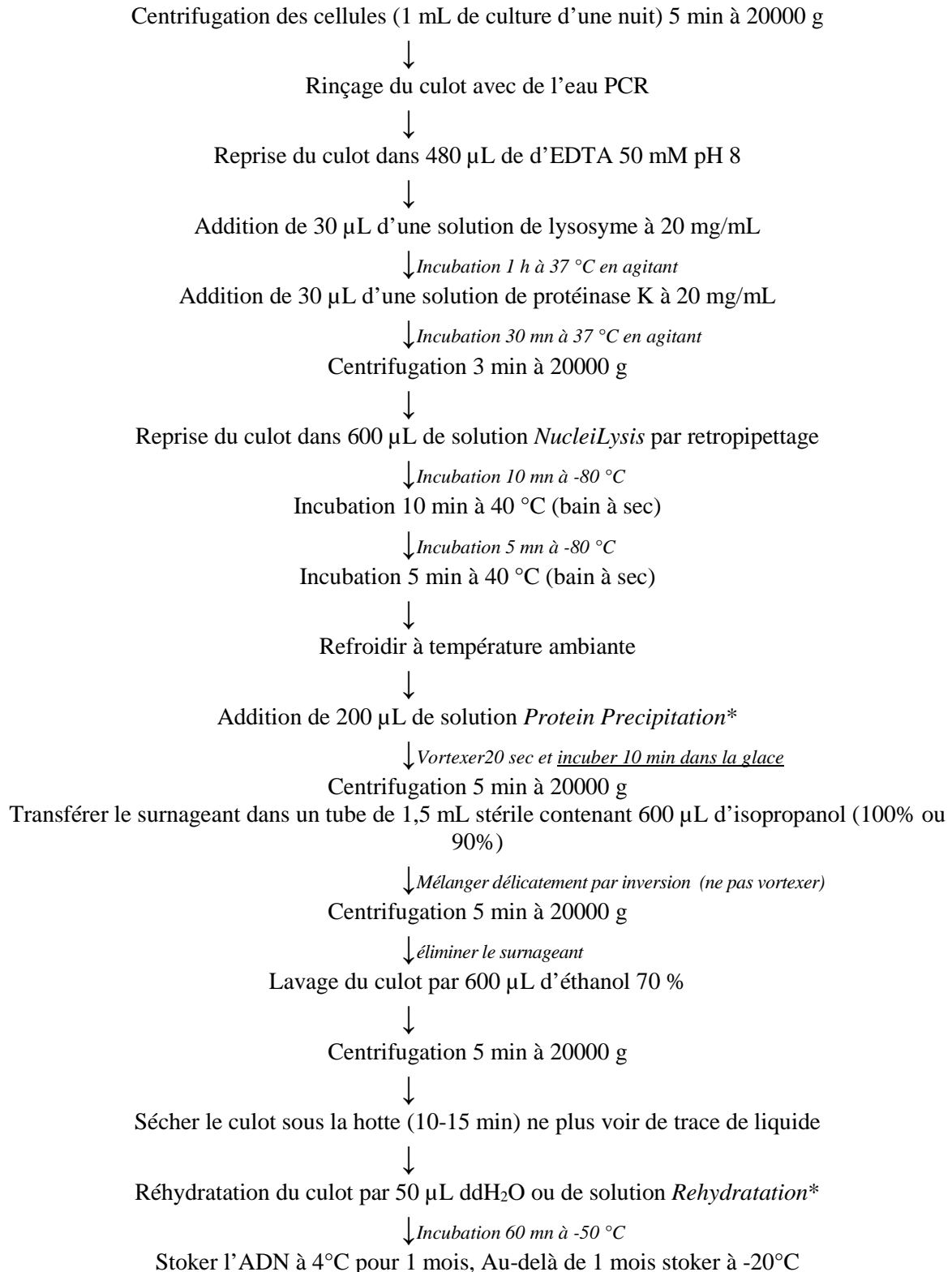


Figure 3: Extraction de l'ADN génomique Avec le Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega).

II.2.4.2. Identification des souches par séquençage 16S ADN ribosomal

Pour amplifier de l'ADN via la technique PCR il est nécessaire que l'intégrité de l'ADN soit comme suit : $1.7 < \text{l'intégrité de l'ADN} < 2$, cette intégrité reflète la pureté de l'ADN, elle est définie par le rapport 260/280 nm.

II.2.4.2.1. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne ou " PCR " (Polymerase Chain Reaction) est une méthode permettant d'amplifier *in vitro* et de manière exponentielle un fragment d'ADN spécifique. Elle repose sur l'hybridation de deux courtes séquences oligonucléotidiques, appelées " amorces ", sur chacun des deux brins d'ADN du fragment cible, suivie d'une étape d'élongation des amorces par une ADN polymérase, générant ainsi une nouvelle matrice.

La PCR se déroule donc généralement en 3 étapes répétées 30 à 40 fois : dénaturation de l'ADN double brin, hybridation des amorces avec leur séquence complémentaire et élongation par l'ADN polymérase (tableau 3).

La liste des amorces utilisées au cours de l'étude est présentée dans le tableau 4. Dans la suite du document, les couples d'amorces utilisés pour chaque PCR sont indiqués dans le texte.

II.2.4.2.1.1. Ingrédients utilisés pour la PCR de la souche LBRE-LSAS

- Buffer 10X (KCl-MgCl₂) : 5 µL
- d NTPS à 2 mM : 1µL
- Primer plb 16s : (FW) à 20 mM : 1 µL
- Primer mlb 16s : (RW) à 20 mM : 1 µL
- MgCl₂ à 25 mM : 2 µL
- Taq Polymérase (**Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen**) à 5 µg/µL : 0.25 µL.
- ADN à analyser.
- H₂O (QSP) : à calculer selon le volume final 25 ou 50 µL.

Tableau 3: Programme du thermocycleur pour la réaction PCR de la souche LBRE-LSAS.

Etape	Temps & température	Nombre de cycles
Dénaturation préliminaire	5 min. à 95°C	1
Dénaturation	30 sec. à 94°C	25
Hybridation	30 sec. à 48°C	
Extension	45 sec. à 72°C	
Extension finale	4 min. à 72°C,	
Refroidissement	5 min. à 16°C	1

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées.

Technique	Amorces	Séquence	Sens	Source
PCR	16SPO	5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Forward	Ventura et al. (2001)
	16SP6	5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'	Reverse	Ventura et al. (2001)
	plb 16s	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Forward	Kullen et al., 2000
	mlb 16s	5'-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG -3'	Reverse	Kullen et al., 2000
Séquençage	F1	5'-CTGGCTCAGGAYGAACG-3'	Forward	(Sigma-Proligo)
	F2	5'-GAGGCAGCAGTRGGGAAT-3'	Forward	(Sigma-Proligo)
	F3	5'-ACACCARTGGCGAAGGC-3'	Forward	(Sigma-Proligo)
	F4	5'-GCACAAGCGGYGGAGCAT-3'	Forward	(Sigma-Proligo)
	R1	5'-CTGCTGGCACGTAGTTAG-3'	Reverse	(Sigma-Proligo)
	R2	5'-AATCCTGTTYGCTMCCCA-3'	Reverse	(Sigma-Proligo)
	R3	5'-CCAACATCTCACGACACG-3'	Reverse	(Sigma-Proligo)
	R4	5'-TGTGTAGCCCWGGTCRTAAG-3'	Reverse	(Sigma-Proligo)

II.2.4.2.1.2. Ingrédients utilisés pour la PCR de la souche LbM2a

- Buffer 10X (KCl-MgCl₂) : 5 µL
- d NTPS à 2 mM : 1µL
- Primer 16 S P0 5 : (FW) à 20 mM : 1 µL
- Primer 16S P6 : (RW) à 20 mM : 1 µL
- MgCl₂ à 25 mM : 2 µL
- Taq Polymérase (Ladder plus, Fermentas) à 5 µg/µL : 0.25 µL.
- ADN à analyser.
- H₂O (QSP) : à calculer selon le volume final 25 ou 50 µL.

Après préparation des échantillons dans des eppendorfs de 0.2 mL, ils sont introduits dans le thermocycleur (BIO RAD My cycler, thermal cycler) pour amplifier les séquences correspondantes aux primers utilisés avec une température comprise entre 50 et 60°C selon nos primers 16S, dans le programme 16S préalablement existant (tableau 5).

Les produits PCR ainsi obtenus sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0.8%. On dépose dans chaque puit 2 µL du révélateur : Loading Dye orange + 10 µL de l'ADN de chaque souche, et enfin 5µL de marqueur de poids moléculaire d'ADN : O'GeneRuler 100 pb DNA Ladder, Fermentas (au milieu).

II.2.4.2.2. Electrophorèse des acides nucléiques

L'électrophorèse classique sur gel d'agarose permet de séparer les acides nucléiques selon leur taille et leur charge grâce à un courant électrique. Les ADN chargés négativement migrent alors vers l'anode. L'agarose (1.2% p/v) est dissoute à chaud dans du tampon TAE 1X (TAE 50X : Tris 2M, Acétate 1M, EDTA 0,05M pH 8). Un agent intercalant de l'ADN, le bromure d'éthidium (BET) fluorescent sous lumière UV, est ensuite ajouté à 0,2 µg/ mL.

Après polymérisation, le gel est déposé dans un cuve de migration contenant du tampon TAE 1X puis les échantillons d'ADN additionnés de 10% (v/v) de bleu de charge (glycérol 50%, TE 50%, bleu de bromophénol 0,25%) sont déposés dans les puits. La migration se déroule généralement à 90 V pendant 45 min. Les ADN sont révélés par exposition à la lumière UV.

II.2.4.2.2.1. Purification des produits PCR sur cellule microcon-Y 100

Cette procédure est indispensable dans le but d'éliminer les d'NTPS (Desoxyribonucleotides triphosphates) la Taq Polymérase et les débris d'ADN (fragments incomplets).

Procédure :

- Transférer dans la cellule le volume de produits PCR qui reste (25, 30 ou 40 µL).
- Addition de 400 µL d'eau PCR : dd H₂O.
- Centrifuge à 2400 rpm pendant 15 min.
- Refaire le lavage une 2eme fois.
- Refaire le lavage une 3eme fois.

- Récupération de l'ADN en inversant la cellule dans de nouveaux eppendorfs et en déposant une quantité d'eau PCR à 60 °C, par centrifugation à 2400 rpm pendant 15 min.

Après cette purification, on a procédé à une quantification de l'ADN obtenu par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0.8%, en comparant avec (5µL) de marqueur de poids moléculaire d'ADN : O'GeneRuler 100 pb DNA Ladder, Fermentas.

II.2.4.2.2.2. Réaction de séquençage

Préalablement au séquençage, le produit de la réaction PCR est purifié sur membrane Microcon Y-100 (Millipore) puis quantifié sur gel d'agarose en référence à un marqueur de poids moléculaire, le mélange réactionnel est détaillé dans le tableau 6.

II.2.4.2.2.3. Programme d'amplification

Les conditions PCR utilisées sont détaillées au tableau 7.

Tableau 5 : Programme du thermocycleur pour la réaction PCR de la souche LbM2a.

Etape	Temps & température	Nombre de cycles
Dénaturation préliminaire	5 min. à 95°C	1
Dénaturation	30 sec. à 95°C	25
Hybridation	30 sec. à 50°C	
Extension	2 min. à 72°C	
Extension finale	10 min. à 72°C,	
Refroidissement	5 min. à 16°C	1

Tableau 6 : Mélange réactionnel pour le séquençage d'ADN.

	Vol - (solution mère)	Quantité
Ready mix reaction*	1 µL	
Big Dye sequencing buffer*	2 µL	
Amorce	3,2 µL - (1µM)	3,2 pmol
ADN	X	5-15 ng
ddH ₂ O	Y	q.s.p 10 µL
Volume final	10 µL	

*ABI Prism® Big Dye® terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems)

Tableau 7 : Programme du thermocycleur pour la réaction de séquençage.

Etape	Temps & température	Nombre de cycles
Dénaturation préliminaire	1 min. à 96°C	1
Dénaturation	10 sec. à 96°C	25
Hybridation	5 sec. à 50°C	
Elongation	4 min. à 60°C	
Refroidissement	5 min. à 16°C	1

Les produits de la réaction de séquençages sont purifiés par précipitation éthanolique cette procédure est nécessaire pour assurer l'obtention de séquences pures en éliminant les différents débris (fig. 4).

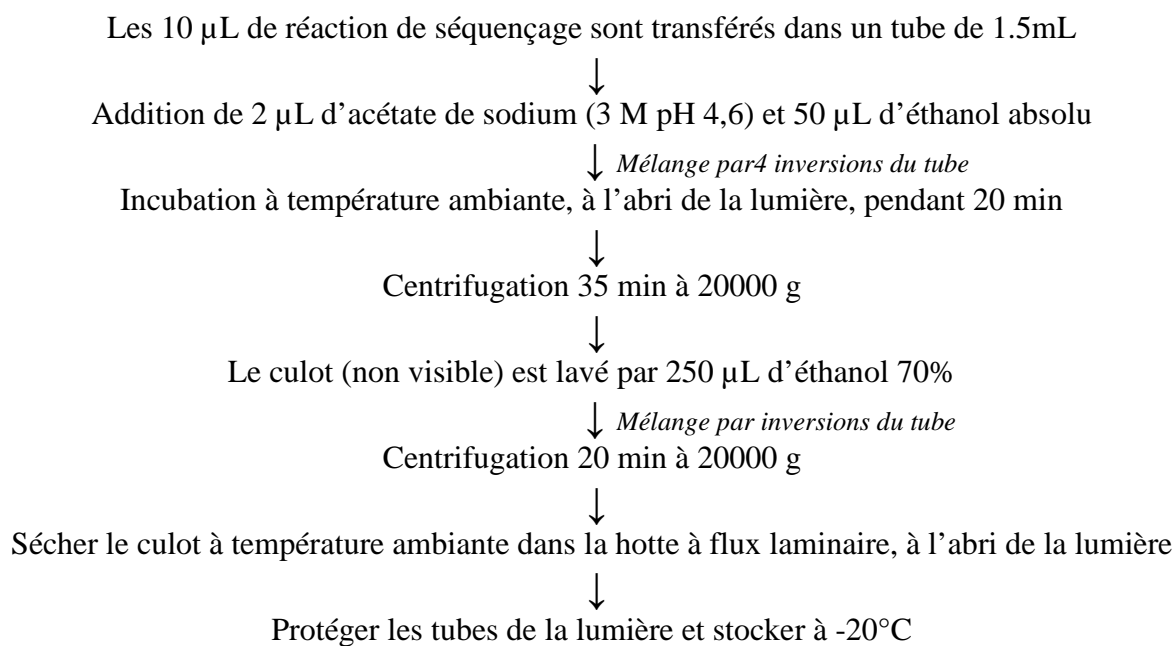


Figure 4 : Protocole de purification des produits de séquençage.

II.2.4.2.2.4. Criblage de gènes de bactériocines par PCR

Nous avons recherché 3 types de bactériocines : *Lb. plantarum*, *Lb sakei* et *Enterococcus*, les amorces utilisées sont détaillées au tableau 8.

Le calcul pour la PCR a été fait sur la base des 5 primers, c'est à dire 5 réactions avec un volume final de 25 µL.

- Buffer 10X (KCl-MgCl₂) : 5 µL
- d NTPS à 2 mM : 1µL
- Primer (FW) à 20 mM : 1 µL
- Primer (RW) à 20 mM : 1 µL
- MgCl₂ à 25 mM : 2 µL
- Taq Polymérase (Fermentas) à 5 µg/µL : 0.25 µL.
- ADN à analyser.
- H₂O (QSP) : à calculer selon le volume final 25 ou 50 µL.

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour les réactions d'amplification et de séquençage de fragments de gènes des bactériocines.

Cible	Amorces PCR	Taille attendue (bp)	Temp./°C Hybridation	Reference
<i>plnEF</i>	F: 5' GGC ATA GTT AAA ATT CCC CCC 3' R: 5' CAG GTT GCC GCA AAA AAA G 3'	428	53	Rojo-Bezares, et al., 2007
<i>plnJ</i>	F: 5' TAA CGA CGG ATT GCT CTG 3' R: 5' AAT CAA GGA ATT ATC ACA TTA GTC 3'	475	51	Rojo-Bezares, et al., 2007
<i>plnK</i>	F: 5' CTG TAA GCA TTG CTA ACC AAT C 3' R: 5' ACT GCT GAC GCT GAA AAG 3'	469	53	Rojo-Bezares, et al., 2007
<i>sakP</i>	F: 5' GAAWTRMMANCAATTAYMGGTGG 3' R: 5' GGC CCA GTT TGCAGC TGC AT 3'	120	51	Kouakou et al., 2010
<i>entP</i>	F: 5' TGAGAAAAAATTATTTAGTTTAGCTCTTATTGG3' R: 5' TTAATGTCCCATACCTGCCAAACCAG 3'	488	60	Gutierrez et al., 2005

F = forward primer, R = reverse prime.

II.2.4.2.2.5. Programme d'amplification

Les conditions PCR utilisées sont détaillées au tableau 9.

Tableau 9 : Programme du thermocycleur pour la réaction PCR.

Etape	Temps & température	Nombre de cycles
Dénaturation préliminaire	5 min. à 95°C	1
Dénaturation	30 sec. à 95°C	25
Hybridation	30 sec. à 50°C	
Elongation	1 min. 30 à 72°C	
Refroidissement	5 min. à 16°C	1

Les produits PCR ainsi obtenus sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0.8%. On dépose dans chaque puit 2 µL du révélateur : Loading Dye orange + 10 µL de l'ADN de chaque souche, et sans oublier 5 µL de marqueur de poids moléculaire d'ADN : O'GeneRuler 100 Pb DNA Ladder, Fermentas.

Après préparation des échantillons dans les petits eppendorfs, ils sont introduits dans le thermocycleurs (BIO RAD My cycler, thermal cycler) pour reproduire des produits PCR correspondants aux 5 primers avec une température de 51°C (moyenne) et ce programme a été préalablement programmé sur le thermocycleur.

Les produits PCR ainsi obtenus sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0.8%. On dépose dans chaque puit 2 µL du révélateur : Loading Dye orange + 10 µL de l'ADN de chaque souche, et sans oublier 5 µL de marqueur de poids moléculaire d'ADN : O'GeneRuler 100 Pb DNA Ladder, Fermentas.

II.2.4.2.2.6. Séquençage des produits PCR

Même protocoles cités précédemment, les produits issus du séquençage sont ensuite purifiés par précipitation éthanolique sont ensuite envoyés au laboratoire Progenus (Gembloux, Belgique) pour lecture.

II.2.4. Evaluation du pouvoir antagoniste des deux souches LBRE-LSAS et LBRE-LSAS

II.3.1. Méthodes des zones d'inhibition Agar well Diffusion Test, Stab On Agar Test et Spot On Agar Test

Ces méthodes sont décrites pour la détection d'activité inhibitrice exercée par les bactériocines, elles sont basées sur le principe que ces substances peuvent diffuser dans un milieu solide ou semi solide, qu'on incluse préalablement avec une souche cible.

II.1.1. Méthodes des piqûres SOAT (Stab On Agar Test)

A partir de boites de Pétri contenant une culture jeune de la bactérie étudiée, avec la pointe d'un cure dent stérile on touche une colonie, puis on effectue des piqûres dans une

boite de Pétri stérile contenant du MRS gélosé à 1.5%, l'incubation se fait en anaérobiose à 37°C pendant 16 à 18 h.

A partir d'une culture jeune de l'indicateur ou du pathogène en milieu liquide approprié, on ensemence une gélose mole à 0.8% de ce même milieu maintenue à 45°C, en ajustant le nombre final à 10⁵ UFC/mL, ce mélange est versé doucement sur les colonies obtenues dans la première étape par piqûre. Après solidification, les boîtes sont incubées en anaérobiose à 37°C pendant 24 h (Cintas et al., 1995).

La lecture se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenus après incubation.

II.1.2. Méthode des puits ADT (Agar well Diffusion Test)

Les surnageants préalablement préparés, sont ensuite ajustés à pH 7, puis chauffés à 70°C pendant 25 min pour éliminer tout effet éventuel des enzymes protéolytiques.

A partir d'une culture jeune de l'indicateur ou du pathogène sur milieu liquide approprié, on ensemence une gélose mole à 0.8% de ce même milieu, maintenue à 45°C, en ajustant le nombre final de cellules à 10⁵ UFC/mL.

Ce mélange est versé dans une boîte de Pétrie stérile, après solidification on prépare des puits de 6mm de diamètre, dans chaque puit, on dépose 50 µl de surnageant. Les boîtes sont déposées à 4°C pendant 2 h pour avoir une bonne diffusion des substances antagonistes, puis incubées en anaérobiose à 37°C pendant 24 h (Cintas et al., 1995).

II.1.3. Méthode SPAT (Spot On Agar Test)

Sur des boîtes de Pétri stériles, on coule du milieu MRS gélosé à 1.5%, après solidification, on dépose 3 µl de suspension de culture jeune de chaque bactérie investiguée pour l'antagonisme. Après séchage des suspensions déposées, on verse une deuxième couche contenant une culture jeune de l'indicateur ou du pathogène préalablement ensemencé sur milieu approprié semi gélosé à 0.8%, maintenue à 45°C. Après solidification, les boîtes sont incubées en anaérobiose à 37°C pendant 24 h (Cintas et al., 1995).

II.2. Sensibilité des surnageant bactériens à acidité neutralisée (SBAN) à la température, le pH et différentes enzymes

II.2.1. Stabilité de l'activité au cours du stockage des SBAN

Les surnageants actifs des deux souches LBRE-LSAS et LbM2a ont été stockés à -80, -20, +4 et +37°C. À différents intervalles de temps entre 0 et 120 jours, des échantillons ont été prélevés à partir des échantillons stockés pour déterminer l'activité antimicrobienne en utilisant la méthode des puits (AWDT) vis-à-vis de *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme microorganisme indicateur (Ten Brink et al. 1994).

II.2.2. Effet de la mitomycine C sur l'activité des SBAN

La mitomycine C a été ajoutée à une concentration finale de 1 µg / mL aux surnageants actifs puis on incube à 37 °C. Des échantillons ont été prélevés à 20, 60, 90, 100, 120 et 140 min. et analysé par la méthode de diffusion en puits (AWDT) vis-à-vis de *Micrococcus luteus* ATCC 10420.

II.2.3. Effet de la lumière UV sur l'activité antimicrobienne des SBAN

Un aliquote de 10 mL des surnageants bactériens à acidité neutralisée (SBAN) issues des deux souches LBRE-LSAS et LbM2a ont été placés dans une boîte de Pétri stérile et exposé aux rayons UV à partir d'une ampoule germicide 15 - W (General Electric) à une distance de 30 cm (temps d'exposition variait de 0 à 60 min). Après chaque intervalle de temps, l'activité de ces surnageants a été analysée par la méthode de diffusion en puits (AWDT) vis-à-vis de *Micrococcus luteus* ATCC 10420.

II.2.4. Résistance des SBAN à la chaleur

Les surnageants bactériens à acidité neutralisée ont été exposés à divers traitements thermiques: 40, 60, 80, 100 et 121°C. Le volume des aliquotes de chaque fraction ont été ensuite retirés après 10, 30, 60 et 90 min et testées par AWDT vis-à-vis de *Micrococcus luteus* ATCC10420.

II.2.5. Sensibilité des SBAN au pH

400 µL des surnageants bactériens à acidité neutralisée (SBAN) issues des deux souches LBRE-LSAS et LbM2a ont été ajustées à pH 2, 3, 4, 6, 8, 10 et 12 avec du HCl 5 N et du NaOH 5 N, puis incubées pendant 4 h à température ambiante puis testées par la méthode AWDT vis-à-vis de *Micrococcus luteus* ATCC 10420.

II.3. Mise en évidence du pouvoir antimicrobien des souches *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Lactobacillus plantarum* LbM2a par coculture avec les pathogènes

Cette méthode consiste à cultiver les souches testées en même temps les souches pathogènes, et l'incubation se fait à des intervalles de temps 0 h, 2, 4, 6, 8, 10 et 24 h, à 37°C (Cocconier *et al.*, 1998).

Les souches testées sont cultivées sur MRS liquide cystéiné pendant 16 h pour avoir des cellules jeunes en anaérobiose, et les pathogènes sont cultivés sur bouillon BHI pendant 3 h en aérobiose. Le nombre des cellules des souches étudiées est ajusté de manière à obtenir le nombre de cellules égal à $1. 10^8$ UFC/mL à la fois pour les deux souches pathogènes et ces souches testées (avec un rapport de 1 /1), les deux cultures sont mises en contact à raison de 200 µL puis incubées en anaérobiose à 37°C.

A chacun des temps précités, on prélève les cultures correspondantes, et on effectue des dilutions décimales de 3 et 4, on étale 100 µL de chacune d'elle sur une boîte de milieu spécifique. L'incubation se fait en aérobiose à 37 °C pendant 24 à 48 h.

II.4. Chromatographie en phase inverse RP-HPLC

La Chromatographie Liquide Haute Pression en Phase Inverse (RP-HPLC) est une chromatographie solide- liquide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire. La phase stationnaire est composée de silice greffée par des chaînes de 18 atomes de carbones (C18).

Cette phase apolaire nécessite un solvant polaire, ici l'acétonitrile (ACN). Les composés polaires sont donc élués prioritairement. La phase mobile polaire correspond à un mélange d'acétonitrile avec de l'eau selon un gradient linéaire. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention des composés. Les gradients d'élu

diminuent la polarité de l'éluant au cours de la séparation (mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va croissant).

Une colonne analytique de dimensions 250 x 4,6 mm (NUCLEOSIL 300-5 C18 HPLC) avec une porosité de 120 Å, pour une phase stationnaire de granulométrie de 5 µm. La phase mobile est composée de 2 solvants : un solvant A polaire (Eau-0,1% TFA) et un solvant B apolaire (ACN-0,07% TFA). Le dégazage est effectué au moment de la filtration sous vide ou par ultra-sons; il assure une bonne reproductibilité et évite l'apparition d'une oscillation sur la ligne de base. Malgré la haute qualité des solvants, la filtration sur filtre spécial (0,4 µm) est recommandée pour empêcher l'obstruction éventuelle des orifices par les particules.

Avant injection dans la colonne RP-HPLC C18, les échantillons sont centrifugés (10 000xg, 10 min à 4°C). L'éluion des molécules est assurée à un débit constant de 0,8 mL.min⁻¹ par un gradient linéaire de 20 à 80% d'ACN. Les densités optiques (DO) à 220 et 280 nm sont mesurées, correspondant aux longueurs d'ondes des liaisons peptidiques et des acides aminés aromatiques (figure 5).

Les fractions éluées sont collectées toutes les minutes, suivie de l'élimination de l'acétonitrile à l'aide de speed-vac Savant SPD1 SPD2010-220 puis solubilisées dans de l'eau Milli-Q pour être stockée à -20°C (figure 6).

II.5. Ultrafiltration

Nous avons effectué une ultrafiltration à travers des filtres Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices, MILLIPORE, qui sont des membranes de cellulose régénérée avec des poids moléculaires d'exclusion de 10 et 3 kDa (figure 7).

Procédure :

1. Ajouter dans le tube jusqu'à 15 mL de l'échantillon (12 mL en cas d'utilisation d'un rotor à angle fixe).
2. Placer le dispositif (tube) dans le rotor de la centrifugeuse; contrebalancer avec un tube similaire.
3. Lors de l'utilisation d'un rotor à godet oscillant, tourner l'appareil à 4000 × g maximum pendant environ 15 à 60 minutes. Lors de l'utilisation d'un rotor à angle fixe, centrifuger à 5000 x g pendant environ 15 à 60 minutes.
4. Pour récupérer le soluté concentré, insérer une pipette dans le fond du dispositif de filtre et retirer environ 200 µL du soluté.

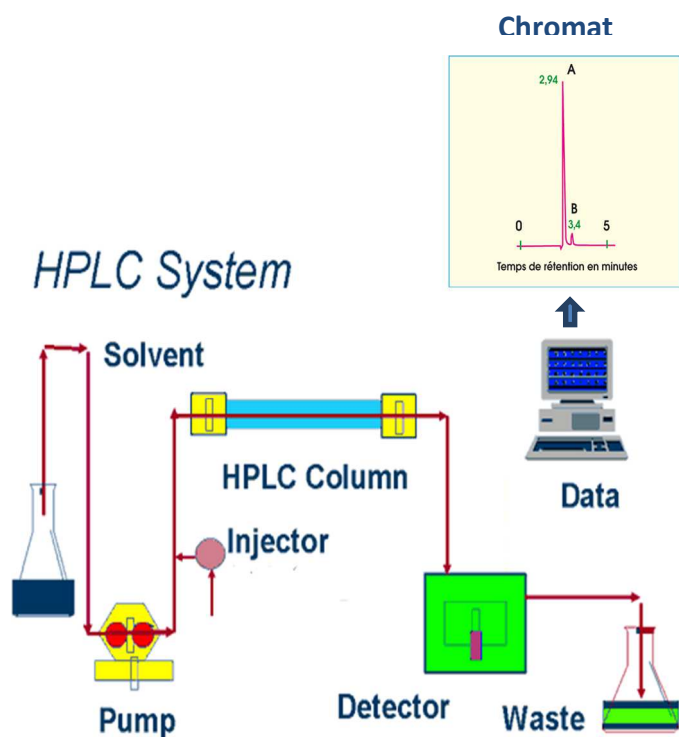


Figure 5 : Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).



Figure 6: Speed vacuum concentrator SPD2010-220, savant.



Figure 7 : Filtre Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices, MILLIPORE.

II.6. Analyse statistique des résultats

Les résultats de chaque échantillon conduit en 3 exemplaires et répété 3 fois ont subi une analyse de la variance (test ANOVA) par utilisation du logiciel statistique statbox version 6.4 copyright Grimmer logiciels 1997-2002, Paris.

CHAPITRE III

RESULTATS

ET

DISCUSSION

Chapitre III : Résultats et discussion

Le tractus gastro-intestinal humain (TGI) contient un microbiote complexe et dynamique. Le TGI de chaque individu possède un microbiote unique qui varie selon l'âge, la santé et le style de vie (Tiisonen et al., 2010). L'équilibre de la flore intestinale constitue une barrière contre les agents pathogènes et les substances alimentaires nocives ; il joue un important rôle de protection en assurant la promotion des effets bénéfiques chez l'hôte (Jankovic et al ; 2010).

Les résultats de l'identification phénotypique des souches révèlent que les isolats LbM2a et LBRE-LSAS à partir des fèces de nourrissons sains appartiennent aux espèces *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus* respectivement. Kiliç et al. (2013) ont isolé vingt souches de *Lactobacillus plantarum* à partir d'échantillons humains de matières fécales; chez lesquelles ils ont recherché des caractéristiques probiotiques.

Une identification claire des espèces, en particulier dans le genre *Lactobacillus*, en fonction des modèles de fermentation, peut parfois être difficile, en raison d'un nombre croissant d'espèces de bactéries lactiques qui varient sur un petit nombre de caractères biochimiques (Marroki et al., 2011). Si l'identité phénotypique et biochimique d'une souche donnée constitue une vérité relative ; l'identité génétique, quant à elle, est une vérité absolue. C'est pour cette raison que la détermination du profil fermentaire doit être combinée avec des techniques génotypiques.

III.1. Identité phénotypique des souches isolées

Nous avons effectué la coloration de Gram, après l'élimination des souches qui présentent un test positif vis-à-vis de la catalase, les souches en forme bâtonnet et catalase négative ont été sélectionnées et purifiées par la méthode des stries (fig. 8 et 9).



Figure 8 : Purification des souches isolées par la méthode des stries.

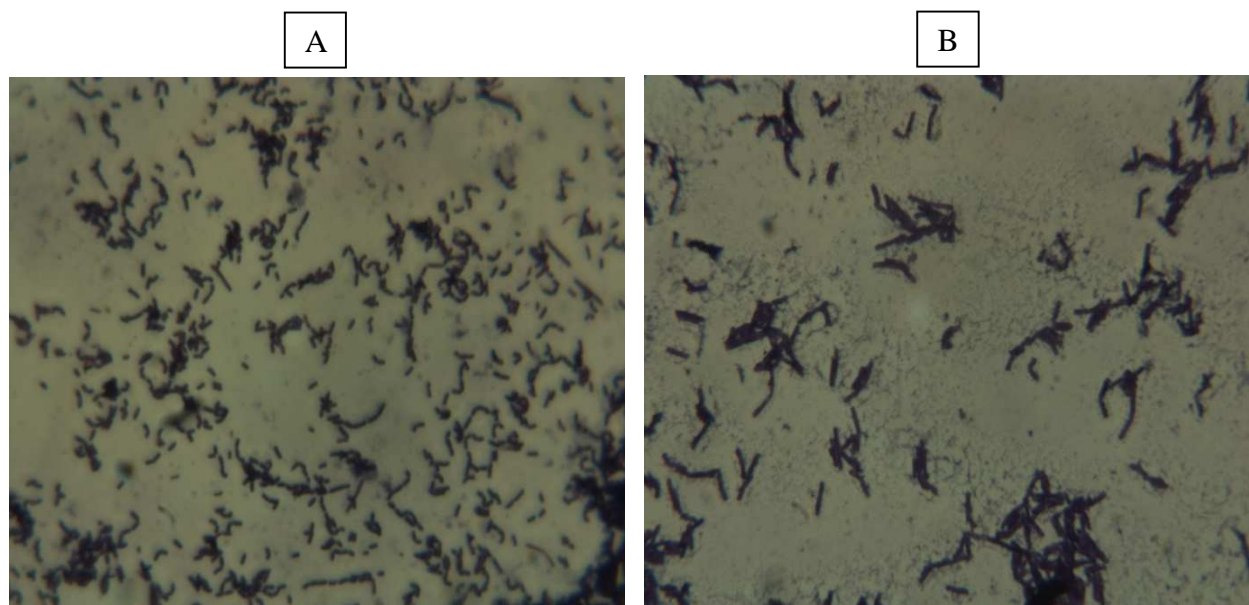


Figure 9 : Observation au microscope optique après la coloration de Gram : **A** : LbM2a, **B** : LBRE-LSAS (grossissement 10).

Les résultats montrent des pourcentages de similarité de l'ordre 98,9% à la souche *L. plantarum* et 99,9% la souche *L. rhamnosus* respectivement pour les deux souches LbM2a et LBRE-LSAS (tableau 10).

III.2. Identité génétique des souches

Après l'extraction de l'ADN à partir des souches isolées et son amplification par PCR en utilisant des amorces adéquates, un séquençage nucléotidique de l'ADNr 16S a été effectué. La séquence de l'ADNr 16S déterminée a été comparée directement avec celles de la base de données GenBank. Un haut niveau de similitude des séquences nucléotidiques d'ADN ribosomal 16S (99%) des deux souches bacilles LbM2a et LBRE-LSAS a été observée avec les séquences de *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus*, respectivement (tableau 10), répertoriées dans la base de données GenBank. La séquence de l'ADNr 16S des souches LbM2a a été officiellement déposée à la GenBank sous le numéro d'adhésion KF682392. En revanche, celui de la souche LBRE-LSAS n'a pas encore été déposé à la GenBank. Sur la base de la séquence du gène de l'ARNr 16S des isolats et de leurs plus proches voisins phylogénétiques, un arbre phylogénétique a été réalisé (fig. 10 et 11).

III.2.1. Numéros d'accèsion des séquences nucléotidiques

Les séquences nucléotidiques des souches isolées ainsi que celles des plantaricines EF et K ont été référenciés par des numéros d'accèsion spécifiques à GenBank et qui sont mentionnées sur le tableau 11.

III.2.2. Identification de gènes codant pour la production de bactériocines

Dans une tentative de vérifier si *L. plantarum* LbM2a porte les gènes pour la production de certaines bactériocines connues produites par la même espèce, une analyse PCR utilisant cinq couples d'amorces spécifiques des gènes individuels de bactériocine a été réalisée.

Les résultats de la PCR ont montré qu'environ 435 et un produit de 460bp a été obtenu par les amorces spécifiques pour la Plantaricine EF et K respectivement, et aucun fragment d'ADN n'a été amplifié avec trois autres couples d'amorces (fig.12).

L'analyse des séquences de la souche LbM2a après amplification a révélé 99% d'homologie avec les gènes de structure de la plantaricine EF et K présents dans la GenBank et confirme donc l'implication de la plantaricine dans l'action antagoniste de cette souche.

Tableau 10: Profil Fermentaire des deux souches LbM2a et LBRE-LSAS.

Sucre	LbM2a	LBRE-LSAS	<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 748
Arabitol	+	-	+
Galactose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Cellobiose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Ribose	+	+	+
D-Xylose	-	-	-
Sucrose	+	+	+
Melibiose	+	-	+
Mannitol	+	+	+
Glucose	+	+	+
Glycerol	-	-	-
Sorbitol	+	+	+
Dulcitol	-	-	-
Rhamnose	-	+	-
Esculin	+	+	+
L-Arabinose	+	-	+
Melibiose	+	-	+
Salicin	+	+	+
Melezitose	+	+	+
Gentiobiose	+	+	+
D-Turanose	-	-	-
Gluconate	+	+	+
2-keto-Gluconate	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-
D-arabitol	-	-	-
L-arabitol	-	-	-
D-raffinose	+	-	+

Toutes les souches fermentent :

N-acetyl-glucosamine, amygdalin, arbutin, D-fructose, D-glucose, lactose, maltose, D-mannose, melibiose, raffinose, ribose, saccharose and trehalose.

Aucune souche ne fermente:

Adonitol, D-arabinose, dulcitol, erythritol, D-fucose, L-fucose, glycogen, inositol, inulin, 5-keto-gluconate, D-lyxose, α -methyl-D-glucoside, α -methyl-D-mannoside, β -methyl-D-xyloside, L-sorbose, starch, D-tagatose, xylitol and L-xylose

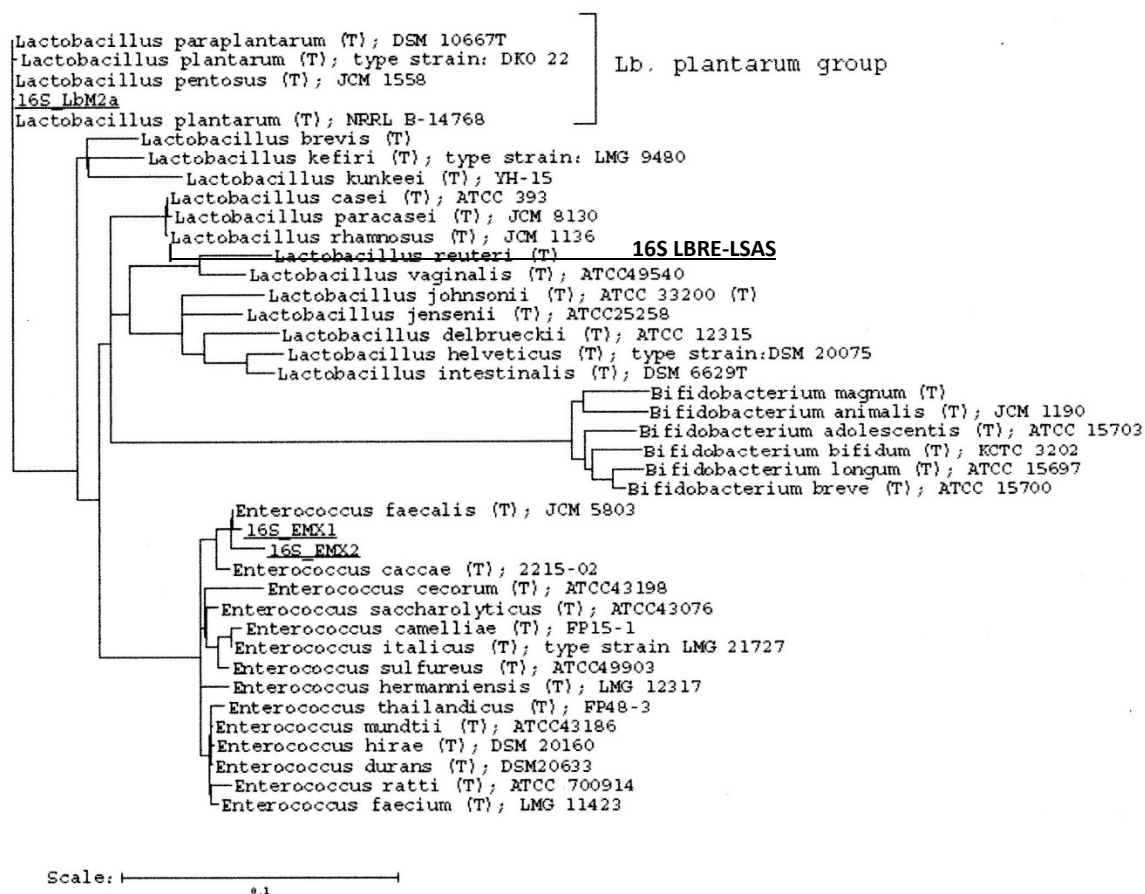


Figure 10: Arbre phylogénétique basé sur la séquence du gène de l'ARNr 16S des isolats LbM2a et LBRE-LSAS et de leurs plus proches voisins phylogénétiques.

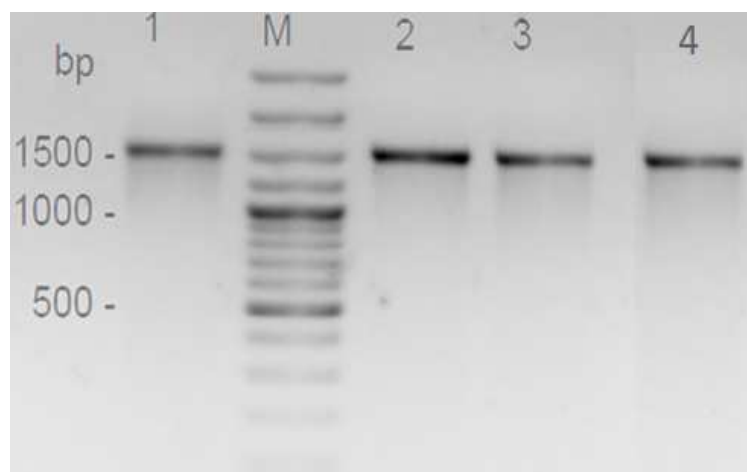


Figure 11: Amplification ADNr 16S réalisée avec l'ADN génomique à partir de (1) *Enterococcus* EMX1, (2) *Enterococcus* EMX2, (3) LbM2a et (4) LBRE-LSAS, en utilisant les paires d'amorces SP0 / SP6 et plb 16s / mLb 16s, un GeneRuler 100 pb d'ADN ladder plus (Fermentas) a été utilisé comme acide nucléique moléculaire marqueur de taille (colonne M).

Tableau 11 : Numéros d'accession des isolats et des plantaricines.

Séquence	GenBank accession numbers	Référence à partir de la base d'NCBI	Pourcentage de Similarité (%)
16S_LBRE-LSAS	/	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99%
16S_LbM2a	KF682392	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%
16S_EMX1	KF682393	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%
LbM2a_plnK	KF802197	Plantaricin K	99%
LbM2a_plnE	KF802198	Plantaricin E	99%



Figure 12: Amplification PCR de l'ADN génomique de la souche LbM2a en utilisant des paires de primers spécifiques de la sakacine P (Ligne 1), plantaricine EF (Ligne 2), plantaricine K (Ligne 3), plantaricine J (Ligne 4) et l'entéroicine P comme témoin négatif (Ligne 5). Un GeneRuler 100-bp DNA ladder (Fermentas) a été utilisé comme acide nucléique marqueur de poids moléculaire (Ligne M).

Ces résultats suggèrent que les bactériocines produites par la souche LbM2a étaient identiques à plantaricine EF et K.

III.3. Spectre d'inhibition des deux souches LbM2a et LBRE-LSAS

Les deux souches sélectionnées LbM2a et LBRE-LSAS exerçaient une activité inhibitrice importante vis-à-vis d'une ou de plusieurs souches testées à Gram positives et négatives (tableaux 12 à 15 ; fig. 13 et 14).

Les activités antagonistes exercées par les bactériocines-like sécrétées par les deux souches LbM2a et LBRE-LSAS vis-à-vis des germes pathogènes testés sont très comparables elles ne sont pas limitées par un spectre antibactérien extrêmement étroit comme il a été rapporté pour des bactériocines de certaines bactéries lactiques.

Dans une étude similaire, [Sankar et al. \(2012\)](#) ont rapporté que la bactériocine produite par une souche de *Lactobacillus plantarum*, isolée à partir d'échantillons de lait cru de vache, avait un large spectre d'activité antibactérienne vis-à-vis de plusieurs agents pathogènes d'origine alimentaire.

L'activité antimicrobienne des bactériocines exercées par les deux souches LbM2a et LBRE-LSAS dans cette étude n'était pas due au peroxyde d'hydrogène ou à l'acidité, étant donné que l'activité n'a pas été perdue après le traitement par la catalase ou par l'ajustement du pH à 6,2.

Les bactéries lactiques synthétisent des agents bactéricides qui varient dans leur spectre d'activité. Beaucoup de ces agents sont des bactériocines de structure protéiques ([Zacharof et Lovitt., 2012](#)).

La souche LbM2a a inhibé 18 des 22 souches indicatrices à savoir *Carnobacterium maltaromaticum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella sonnei*, *E. coli*, *Bacillus cereus* et *Lactobacillus sake*. Cependant, aucune activité n'a été détectée vis-à-vis de *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus rhamnosus*.

[Mills et al. \(2011\)](#) ont démontré que *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358, isolé à partir d'un fromage artisanal français doux, produisait une puissante bactériocine de la classe IIa avec 100% d'homologie avec la plantaricine 423 et exerçant une activité bactéricide vis-à-vis de *Listeria innocua* et *Listeria monocytogenes*.

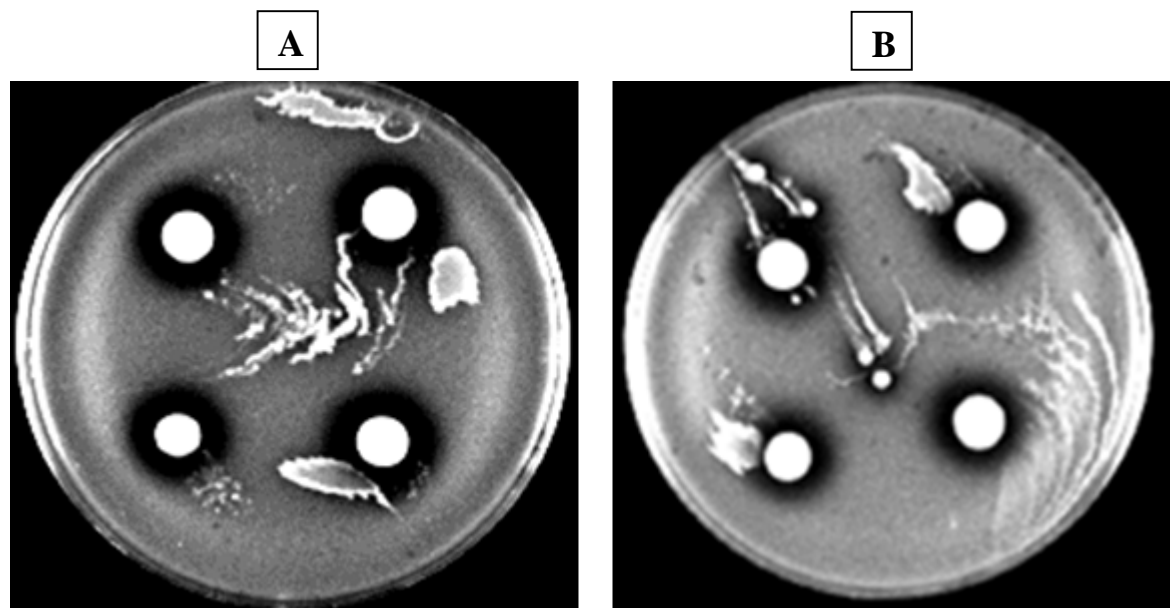


Figure 13: Zones d'inhibition obtenues par la technique SPAT de la souche LbM2a (A) et de la souche LBRE-LSAS (B) vis-à-vis de *Micrococcus luteus* ATCC 10420.

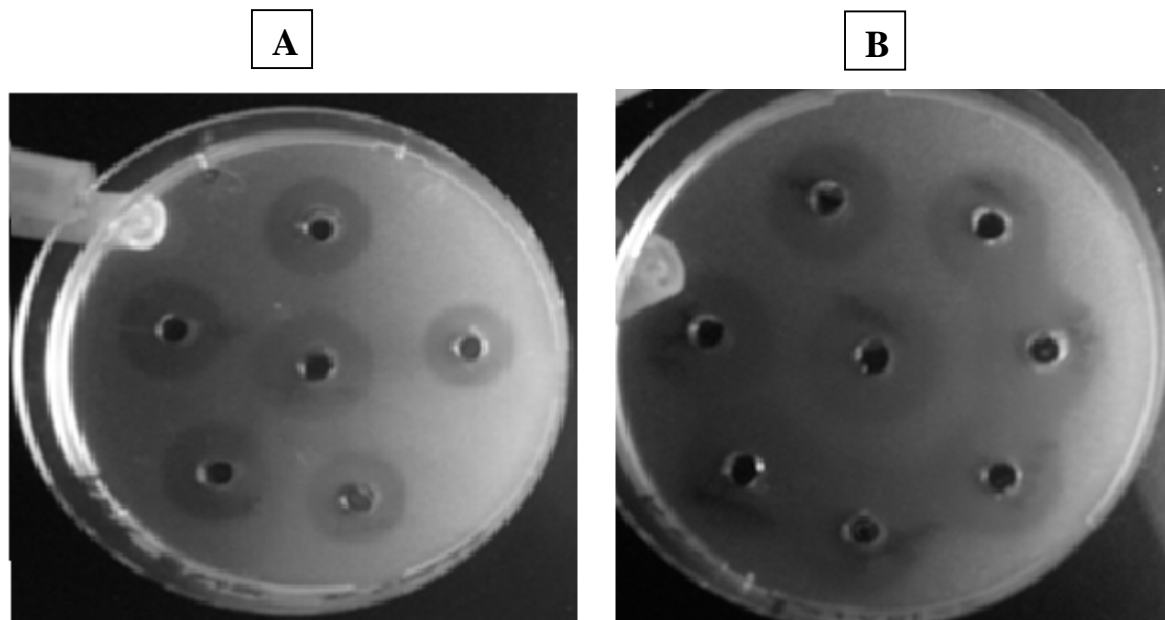


Figure 14: Zones d'inhibition obtenues par la technique AWDIT de la souche LbM2a (A) et de la souche LBRE-LSAS (B) vis-à-vis de *Micrococcus luteus* ATCC 10420.

Gong et al. (2010) ont observé que la plantaricine MG produite par *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391, isolé à partir de " Jiaoke ", une crème traditionnelle fermentée naturellement en Mongolie intérieure en Chine, a manifesté un large spectre d'activité inhibitrice contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, y compris *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* et *Salmonella typhimurium*, mais ont montré une faible activité contre la plupart des *Lactobacillus*. spp.

Dans une autre étude, Hu et al. (2013) ont démontré que la plantaricine 163, une nouvelle bactériocine produite par *L. plantarum* 163 isolé à partir de légumes fermentés traditionnellement en chine, exerçait une activité inhibitrice à large spectre, non seulement vis-à-vis des bactéries lactiques mais aussi vis-à-vis d'autres bactéries à Gram-positives et à Gram-négatives comme *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *M. luteus*, *L. thermophilus*, *L. rhamnosus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, et *P. fluorescens*. Tous ces résultats sont tout à fait comparables à nos observations.

III.4. Sensibilité des surnageant bactériens à acidité neutralisée (SBAN) à la température, au pH et à différentes enzymes

Les effets de la chaleur, du temps de stockage, du pH et des enzymes protéolytiques sur l'activité des SBAN des deux souches LbM2a et LBRE-LSAS ont été déterminés en utilisant *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme organisme indicateur.

Les bactériocines produites par les deux souches *L. plantarum* LbM2a et *L. rhamnosus* LBRE-LSAS ont montré une activité constante après chauffage à 100 °C pendant 30 min, la prolongation de ce traitement au-delà de 30 min se traduit par une diminution de leur activité.

Une activité constante a été notée après le traitement à 121 °C pendant 10 min, suivie par le déclin subséquent. Après 90 min, il n'y avait aucune activité détectable pour les deux souches (fig. 15 et 16).

Tableau 12 : Niveaux d'inhibition exprimés en intensité de sensibilité (se référer à la légende ci-dessous pour une expression en mm) obtenus avec la souche LbM2a vis-à-vis de *Micrococcus luteus* ATCC 10420 en utilisant la technique SPAT.

Organismes Indicateurs	^a Souches	Milieu-T° d'incubation	^b Sensibilité
<i>Listeria innocua</i>	BUG499	BHI, 37°C	++++
<i>Listeria innocua</i>	CECT 910	BHI, 37°C	++++
<i>Shigella sonnei</i>	CECT 584	BHI, 37°C	++++
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	BHI, 37°C	++++
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862	BHI, 37°C	++++
<i>Micrococcus luteus</i>	CECT 241	BHI, 37°C	++++
<i>Shigella dysenteria</i>	CECT 457	BHI, 37°C	++++
<i>Listeria innocua</i>	BUG498	BHI, 37°C	++++
<i>C. maltaromaticum</i>	DSM20722	BHI, 37°C	++++
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10420	BHI, 37°C	++++
<i>C. maltaromaticum</i>	DSM20730	BHI, 37°C	++++
<i>C. maltaromaticum</i>	CECT5808	BHI, 37°C	++++
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 9884	BHI, 37°C	++++
<i>E. coli</i>	ATCC 25122	BHI, 37°C	++++
<i>E. coli</i>	DH10B	BHI, 37°C	++++
<i>Enterococcus faecalis</i>	(X2)	BHI, 37°C	++++
<i>Lactobacillus sake</i>	LTH 673	MRS, 37°C	++++
<i>Lactobacillus sakei</i>	K23	MRS, 37°C	++++
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 7469	MRS, 37°C	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4529	MRS, 37°C	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 748	MRS, 37°C	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CECT 4695	MRS, 37°C	-

Légende :

^a ATCC, American Type Culture collection; CECT: Colección Española de Cultivos Tipos. DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

^b Zones d'inhibition (mm):++++, ≥17mm; +++, 14-17 mm; ++, 11-14 mm; +, 7-10 mm; -, no inhibition.

Tableau 13 : Niveaux d'inhibition exprimés en intensité de sensibilité (se référer à la légende ci-dessous pour une expression en mm) obtenus avec la souche LBRE-LSAS vis-à-vis de *Micrococcus luteus* ATCC 10420 en utilisant la technique SPAT.

Organismes Indicateurs	^a Souches	Milieu-T° d'incubation	^b Sensibilité
<i>Listeria innocua</i>	BUG499	BHI, 37°C	++++
<i>Listeria innocua</i>	CECT 910	BHI, 37°C	++++
<i>Shigella sonnei</i>	CECT 584	BHI, 37°C	++++
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	BHI, 37°C	++++
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862	BHI, 37°C	++++
<i>Micrococcus luteus</i>	CECT 241	BHI, 37°C	++++
<i>Shigella dysenteria</i>	CECT 457	BHI, 37°C	++++
<i>Listeria innocua</i>	BUG498	BHI, 37°C	++++
<i>C. maltaromaticum</i>	DSM20722	BHI, 37°C	++++
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10420	BHI, 37°C	++++
<i>C. maltaromaticum</i>	DSM20730	BHI, 37°C	++++
<i>C. maltaromaticum</i>	CECT5808	BHI, 37°C	++++
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 9884	BHI, 37°C	++++
<i>E. coli</i>	ATCC 25122	BHI, 37°C	++++
<i>E. coli</i>	DH10B	BHI, 37°C	++++
<i>Enterococcus faecalis</i>	(X2)	BHI, 37°C	++++
<i>Lactobacillus sakei</i>	K23	MRS, 37°C	+++
<i>Lactobacillus sakei</i>	LTH 673	MRS, 37°C	++
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 7469	MRS, 37°C	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4529	MRS, 37°C	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 748	MRS, 37°C	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CECT 4695	MRS, 37°C	-

Légende :

^a ATCC, American Type Culture collection; CECT: Colección Española de Cultivos Tipos. DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

^b Zones d'inhibition (mm):++++, ≥17mm; +++, 14-17 mm; ++, 11-14 mm; +, 7-10 mm; -, no inhibition.

Tableau 14: Niveaux d'inhibition exprimés en intensité de sensibilité (se référer à la légende ci-dessous pour une expression en mm) obtenu avec la souche LbM2a vis-à-vis de *Micrococcus luteus* ATCC 10420 en utilisant la technique AWDT.

Organismes Indicateurs	^a Souches	Milieu-T° d'incubation	^b Sensibilité
<i>C. maltaromaticum</i>	DSM 20722	BHI, 37°C	++++
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	BHI, 37°C	++++
<i>Listeria innocua</i>	BUG 498	BHI, 37°C	++++
<i>C. maltaromaticum</i>	DSM 20730	BHI, 37°C	++++
<i>Micrococcus luteus</i>	CECT 241	BHI, 37°C	++++
<i>Shigella sonnei</i>	CECT 584	BHI, 37°C	++++
<i>Listeria innocua</i>	BUG 499	BHI, 37°C	++++
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862	BHI, 37°C	++++
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10420	BHI, 37°C	+++
<i>Shigella dysenteria</i>	CECT 457	BHI, 37°C	+++
<i>Listeria innocua</i>	CECT 910	BHI, 37°C	+++
<i>E. coli</i>	ATCC 25122	BHI, 37°C	+++
<i>C. maltaromaticum</i>	CECT 5808	BHI, 37°C	+++
<i>Enterococcus faecalis</i>	(X2)	BHI, 37°C	+++
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 9884	BHI, 37°C	+++
<i>Lactobacillus sakei</i>	LTH 673	MRS, 37°C	++
<i>Lactobacillus sakei</i>	K23	MRS, 37°C	++
<i>E. coli</i>	DH10B	BHI, 37°C	++
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 7469	MRS, 37°C	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4529	MRS, 37°C	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 748	MRS, 37°C	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CECT 4695	MRS, 37°C	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LbM2a	MRS, 37°C	-
^c MRS	/	/	-

Légende :

^a ATCC, American Type Culture collection; CECT: Colección Española de Cultivos Tipos. DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

^b Zones d'inhibition (mm):++++, ≥17mm; +++, 14-17 mm; ++, 11-14 mm; +, 7-10 mm; -, no inhibition.

Tableau 15: Niveaux d'inhibition exprimés en intensité de sensibilité (se référer à la légende ci-dessous pour une expression en mm) obtenu avec la souche LBRE-LSAS vis-à-vis de *Micrococcus luteus* ATCC 10420 en utilisant la technique AWDT.

Organismes Indicateurs	^a Souches	Milieu-T° d'incubation	^b Sensibilité
<i>C. maltaromaticum</i>	DSM 20722	BHI, 37°C	++++
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	BHI, 37°C	++++
<i>Listeria innocua</i>	BUG 498	BHI, 37°C	++++
<i>C. maltaromaticum</i>	DSM 20730	BHI, 37°C	++++
<i>C. maltaromaticum</i>	CECT 5808	BHI, 37°C	++++
<i>Micrococcus luteus</i>	CECT 241	BHI, 37°C	++++
<i>Shigella sonnei</i>	CECT 584	BHI, 37°C	++++
<i>Listeria innocua</i>	BUG 499	BHI, 37°C	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862	BHI, 37°C	+++
<i>Shigella dysenteria</i>	CECT 457	BHI, 37°C	+++
<i>Listeria innocua</i>	CECT 910	BHI, 37°C	+++
<i>E. coli</i>	ATCC 25122	BHI, 37°C	+++
<i>E. coli</i>	DH10B	BHI, 37°C	+++
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10420	BHI, 37°C	+++
<i>Enterococcus faecalis</i>	(X2)	BHI, 37°C	+++
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 9884	BHI, 37°C	+++
<i>Lactobacillus sake</i>	LTH 673	MRS, 37°C	+++
<i>Lactobacillus sakei</i>	K23	MRS, 37°C	++
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 7469	MRS, 37°C	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4529	MRS, 37°C	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 748	MRS, 37°C	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CECT 4695	MRS, 37°C	-

Légende :

^a ATCC, American Type Culture collection; CECT: Colección Española de Cultivos Tipos. DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen. ^b Zones d'inhibition (mm):++++, ≥17mm; +++, 14-17 mm; ++, 11-14 mm; +, 7-10 mm; -, no inhibition. ^c MRS : De man Rogosa and Sharpe, pH: 6.2.

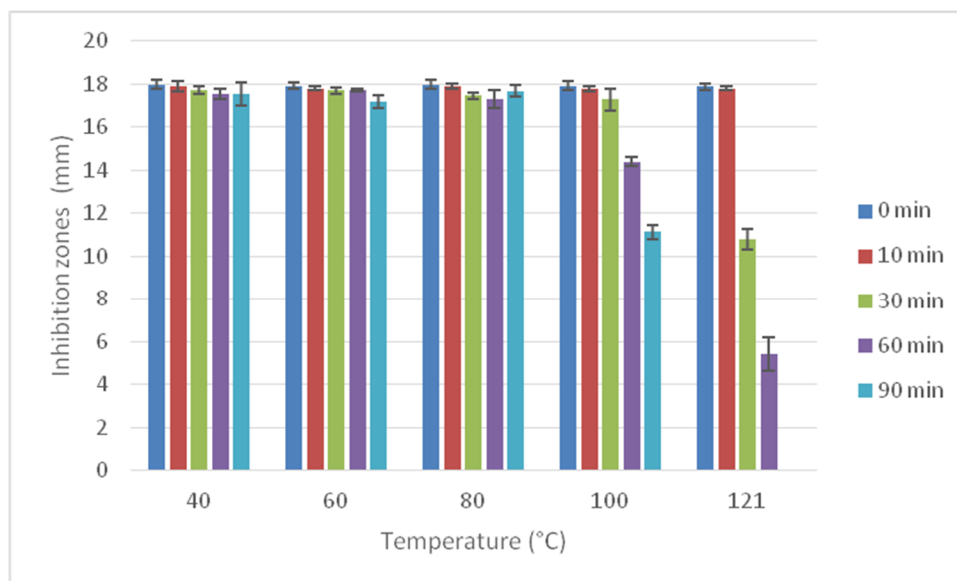


Figure 15: Effet du traitement thermique (40, 60, 80, 100 et 120°C pendant 10 à 90 min) sur l'activité du SBAN de la souche LbM2a en utilisant *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme souche indicatrice.

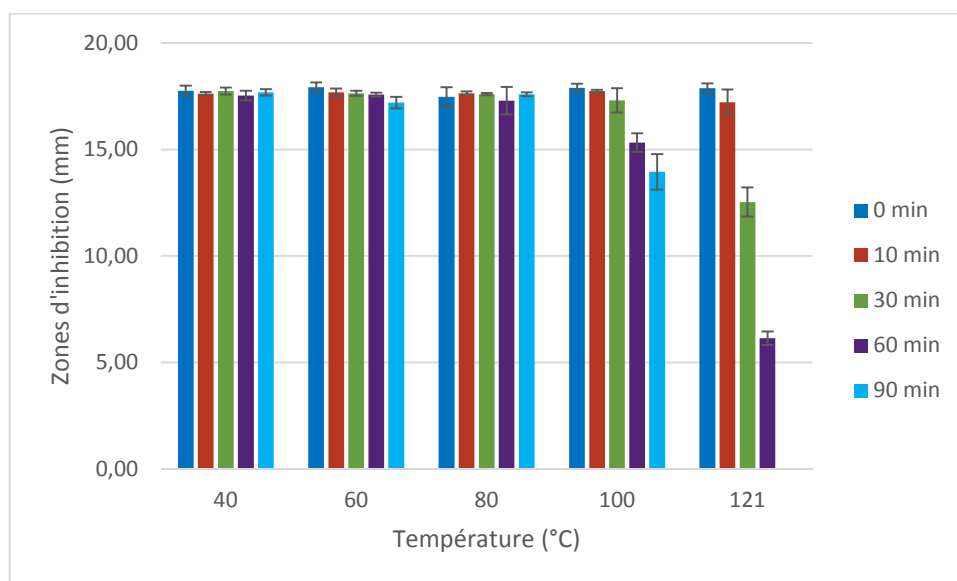


Figure 16: Effet du traitement thermique (40, 60, 80, 100 et 120°C pendant 10 à 90 min) sur l'activité du SBAN de la souche LBRE-LSAS en utilisant *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme souche indicatrice.

Il y a presque 30 ans, [Andersson \(1986\)](#) avait rapporté une perte d'activité de facteurs protéiques de surnageants bactériens après traitement thermique à 121 °C pour 15 min. En revanche, [Nettles et Barefoot \(1993\)](#) ont observé que des substances antibactériennes produites par *Lactobacillus* spp. étaient thermostables. C'est aussi le cas contradictoire des résultats rapportés par [Ogunbanwo et al. \(2003\)](#) qui montrent une thermostabilité (121°C pendant 60 min) des substances antagonistes sécrétées par la souche *L. brevis* OG1.

La stabilité thermique de *L. brevis* OG1 à 121 °C pendant 60 min a été confirmée par [Ogunbanwo et al. \(2003\)](#). Actuellement, la plupart des spécialistes son d'accord sur cette question de thermorésistance des bactériocines en général et particulièrement de celles des classes I et II ([Dortu et Thonart, 2009](#)).

La stabilité thermique des substances antibactériennes produites par *Lactobacillus* spp. a été bien établi ([Barbosa et al., 2014](#)). Cette propriété est importante surtout si elles sont utilisés comme conservateur alimentaire, car le traitement des aliments par la chaleur est une opération unitaire largement répandue dans les industries agro-alimentaires.

L'effet du temps, de la température de stockage sur l'activité des bactériocines ont également été explorés. Nous n'avons observé aucun changement dans l'activité biologique des bactériocines à la température de stockage de -80 °C pendant 120 jours pour les deux souches LbM2a et LBRE-LSAS ce qui confirme que cette température est idéale pour la conservation de ces surnageants actifs.

Il a été noté que la stabilité à -20°C pendant 2 mois des substances actives produites par les souches isolées était maintenue; alors qu'elle était partielle à 4°C pendant 120 jours, et inexistante à 37°C pendant 2 mois (fig. 17 et 18).

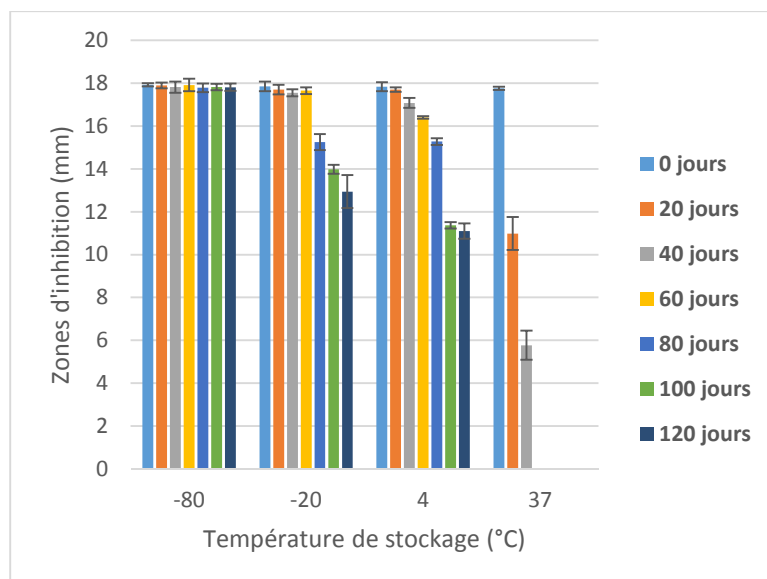


Figure 17: Effet de la durée (20 à 120 jours) et de la température (-80, -20, 4 et 37°C) de stockage sur l'activité du SBAN de la souche LbM2a en utilisant *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme souche indicatrice.

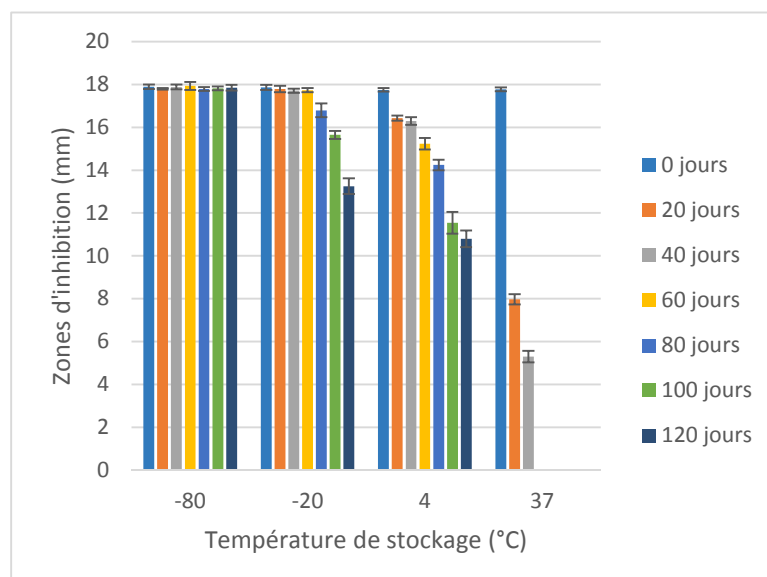


Figure 18: Effet de la durée (20 à 120 jours) et de la température (-80, -20, 4 et 37°C) de stockage sur l'activité du SBAN de la souche LBRE-LSAS en utilisant *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme souche indicatrice.

Les résultats obtenus pour les deux souches sont similaires ; ce qui laisse penser que les substances actives contenues dans les deux surnageants sont de même nature.

Ces résultats sont en accord avec ceux de [Ogunbanwo et al. \(2003\)](#) qui ont démontré que la stabilité des bactériocines produites par *Lactobacillus plantarum* F1 et *Lactobacillus brevis* OG1 reste inchangée après 60 jours à - 20 °C; partielle après 120 jours à 4°C; et s'avère complètement perdue (activité nulle) après 80 à 120 jours à 37 °C.

L'effet du pH sur l'activité des surnageants bactériens à acidité neutralisée (SBAN) a été évalué pour les deux souches isolées. Cependant, on a observé que l'activité antagoniste exercée par *Lactobacillus plantarum* LbM2a et *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS est stable entre pH 2 à 6, avec un maximum d'activité à un pH de 6 correspondant à des zones d'inhibitions de l'ordre de 17.85 et 18 mm, respectivement (fig. 19 et 20).

[Ogunbanwo et al. \(2003\)](#) ont obtenus des résultats similaires avec *L. plantarum* F1 qui présentait une activité stable à un pH compris entre 2 et 6, tandis que celle produite par *L. brevis* OG1 a été stable à une gamme de pH de 2 à 8.

Deux bactériocines, nommées bulgarican et lactobulgarican, isolées à partir de surnageant de culture de *L. bulgaricus*, ont exprimé un maximum d'activité stable à des pH acides compris entre 2.2 et 4 vis-à-vis d'une gamme de germes pathogènes ([Reddy et al., 1984](#); [Abdel-Bar et al., 1987](#)). L'activité de la bactériocine MBSa1, isolée à partir de surnageant de culture de *Lactobacillus sakei* MBSa1, était stable à la chaleur et à des pH allant de 2 à 6 ([Barbosa et al., 2014](#)).

Par ailleurs, [Todorov et al. \(1999\)](#), ont rapporté que *L. plantarum* ST31 sécrétait une bactériocine qui présentait un maximum d'activité à un pH de 5.0 à 5.5. La Bovicine HC5, une autre bactériocine produite par *Streptococcus bovis* HC5, était au moins 10 fois plus active à pH 5,5 qu'à pH 7, ce qui indique que sa capacité à former des pores dans la membrane cellulaire est plus forte à des conditions de pH acide ([Houlihan et al., 2003](#)).

Toutes ces caractéristiques de thermorésistance et de stabilité de l'activité antibactérienne des souches où de leurs sécrétions au cours de la conservation dans une large gamme de températures et de pH représentent un intérêt pour le secteur de l'industrie agro-alimentaire. Ces observations sont en accord avec les lignes directrices énoncées par [Tagg et al. \(1976\)](#).

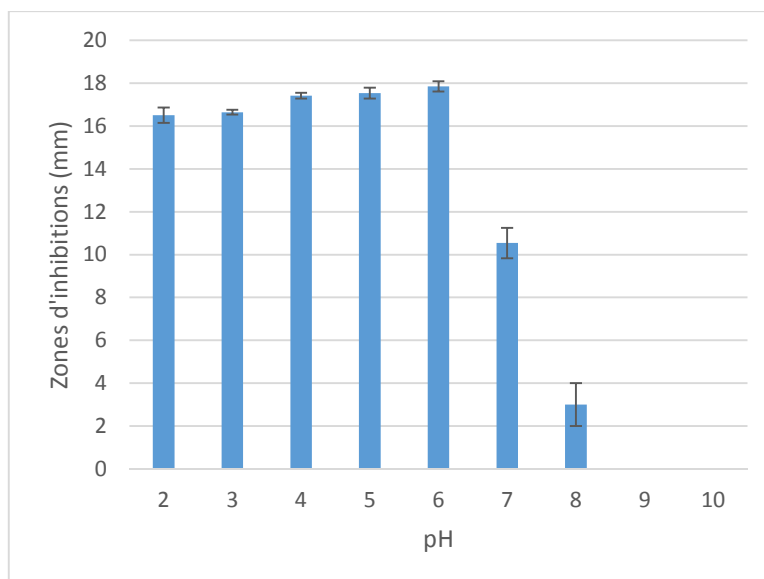


Figure 19: Activité du surnageant SBAN de la souche LbM2a à différents pH en utilisant *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme souche indicatrice.

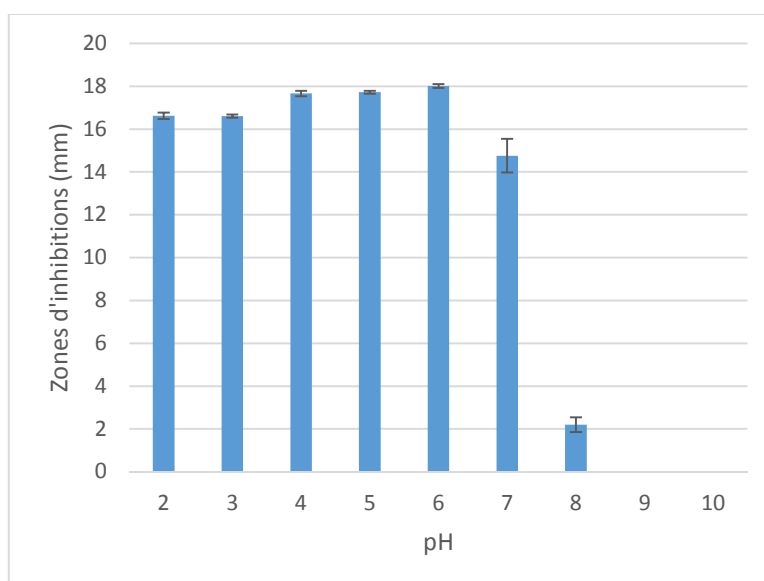


Figure 20: Activité du surnageant SBAN de la souche LBRE-LSAS à différents pH en utilisant *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme souche indicatrice.

Les surnageants bactériens à acidité neutralisée (SBAN) issus des deux souches *Lactobacillus plantarum* LbM2a et *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS ont été examinés pour leur sensibilité vis-à-vis de diverses enzymes.

L'activité antimicrobienne disparaît complètement ou devient instable après traitement avec toutes les enzymes protéolytiques (fig. 21 et 22), tandis que le traitement avec l' α -amylase, la mitomycine et la lumière UV n'a pas affecté l'activité antibactérienne exercée par les deux souches isolées (fig. 23 à 26).

Ces observations sont tout à fait cohérentes avec celles notées par [Ogunbanwo et al. \(2003\)](#), dans lesquelles ils démontrent que le principe actif des bactériocines produites par *Lactobacillus plantarum* F1 et *Lactobacillus brevis* OG1 était de nature protéique étant donné que les bactériocines ont été inactivées par les enzymes protéolytiques, mais pas par d'autres enzymes ou agents non protéolytiques telles que l' α -amylase ou par la mitomycine C et la lumière UV qui n'affectent pas leur activité.

Les surnageants (SBAN) des deux souches LbM2a et LBRE-LSAS ont été soumis à une ultrafiltration en utilisant diverses membranes. Les fractions éluées et retenues ont été recueillies et analysées pour leur activité antagoniste.

L'utilisation d'une membrane de poids moléculaire d'exclusion de 3000 KDa lors de l'ultrafiltration des fractions actives HPLC inverse a permis la rétention des bactériocines et donc la concentration de ces fractions.

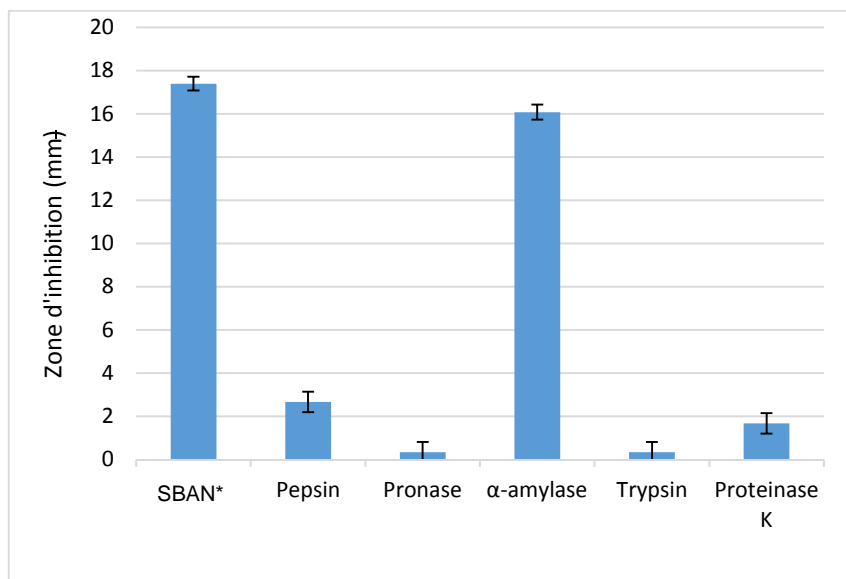


Figure 21: Effet des enzymes sur l'activité du surnageant SBAN (exprimée en mm de zones d'inhibition) de la souche LbM2a en utilisant *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme une souche indicatrice
SBAN *: surnageant non traité par les enzymes.

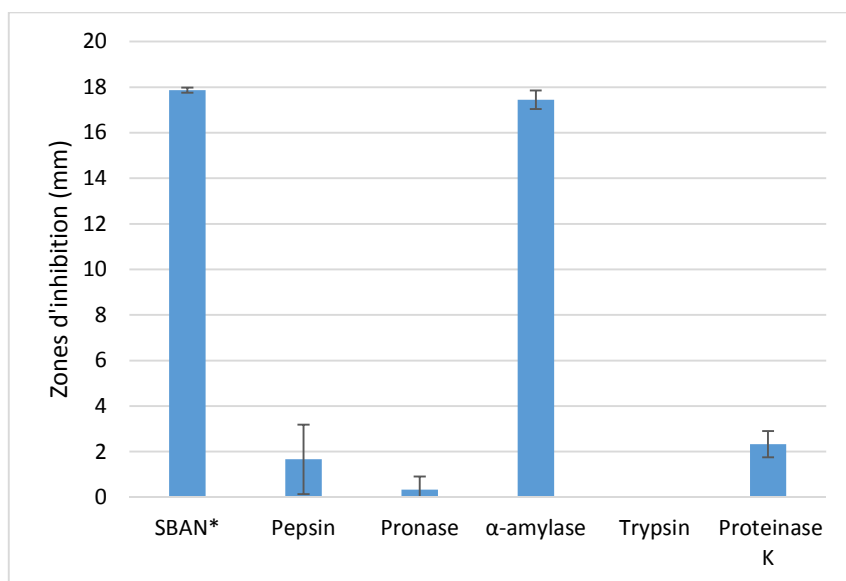


Figure 22: Effet des enzymes sur l'activité du surnageant SBAN (exprimée en mm de zones d'inhibition) de la souche LBRE-LSAS en utilisant *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme une souche indicatrice
SBAN *: surnageant non traité par les enzymes.

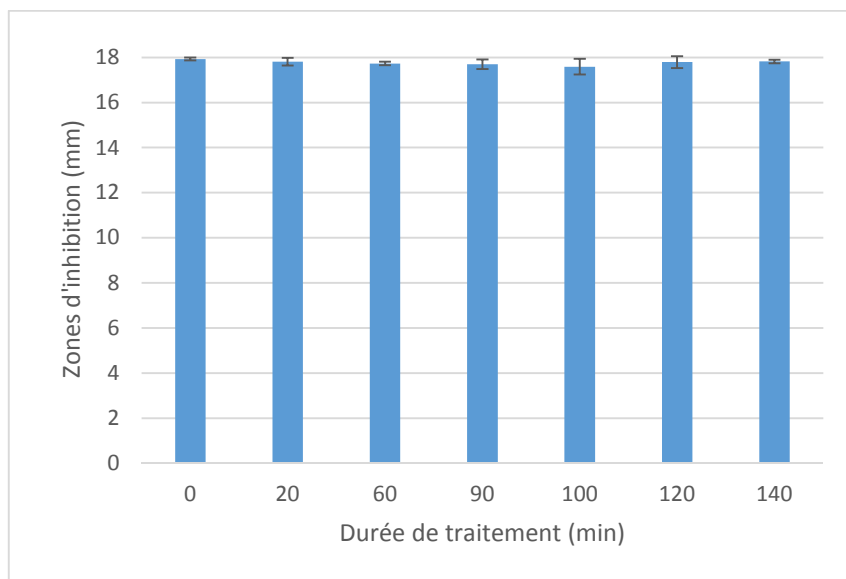


Figure 23: Effet du traitement par les UV sur l'activité du SBAN (exprimée en mm de zones d'inhibition) de la souche LbM2a en utilisant *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme souche indicatrice.

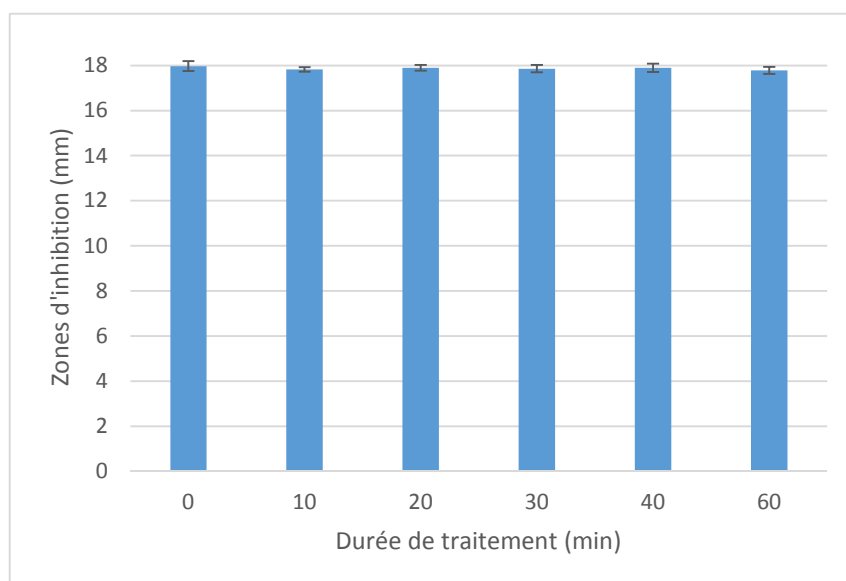


Figure 24: Effet du traitement par les UV sur l'activité du SBAN (exprimée en mm de zones d'inhibition) de la souche LBRE-LSAS en utilisant *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme souche indicatrice.

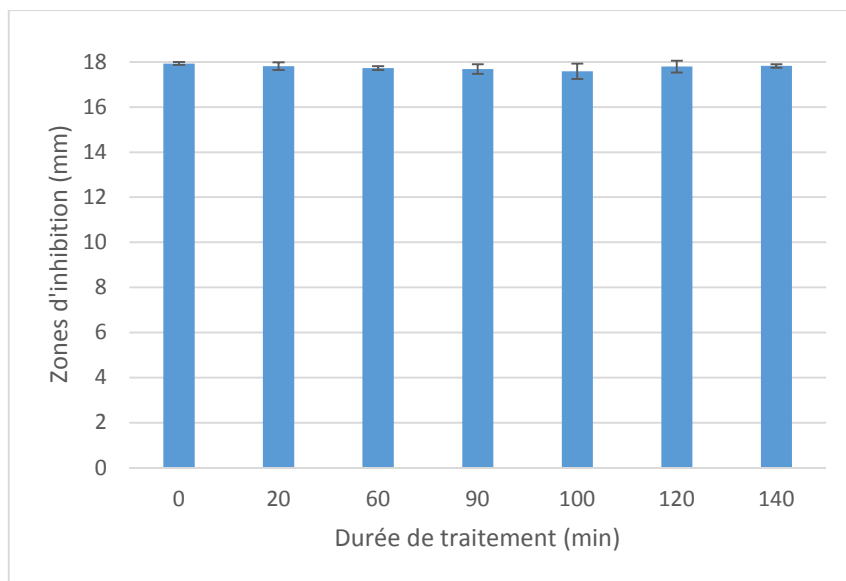


Figure 25: Effet du traitement par la mitomycine sur l'activité du SBAN (exprimée en mm de zones d'inhibition) de la souche LbM2a en utilisant *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme souche indicatrice.

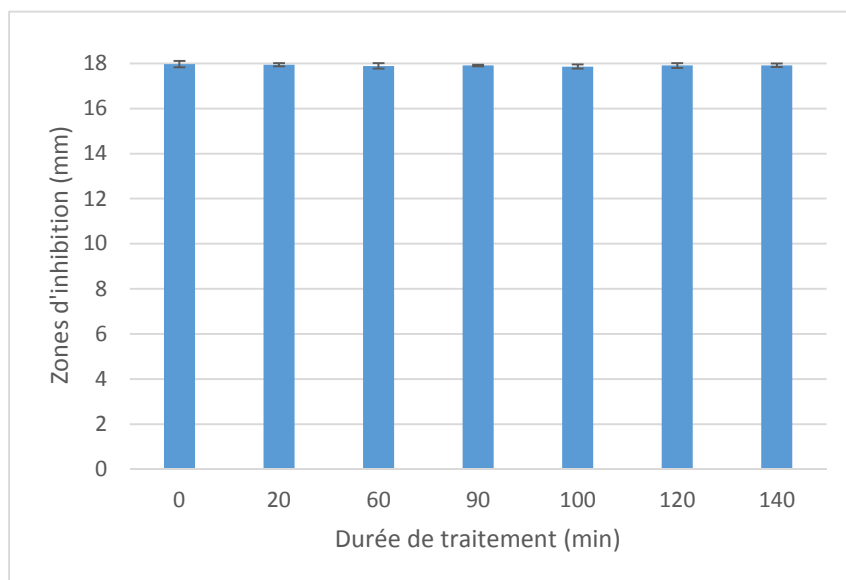


Figure 26: Effet du traitement par la mitomycine sur l'activité du SBAN (exprimée en mm de zones d'inhibition) de la souche LBRE-LSAS en utilisant *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme souche indicatrice.

Ces résultats nous permettent de situer les poids moléculaires des deux principes actifs des deux souches entre 3 et 10 KDa; cette intervalle de poids moléculaire correspond à la gamme de poids moléculaire dans laquelle les plantaricins PlnE, PlnF, PlnJ et PlnK sont incluses (Diep *et al.*, 2009).

Cependant, une perte partielle de l'activité de la bactériocine a été observée au cours de l'ultrafiltration (fig. 27) et qui pourrait être due à son adsorption au niveau de la membrane du dispositif ultrafiltrant. La même observation a été rapportée par Mojgani *et al.* (2009).

III.5. Cinétique d'inhibition des pathogènes en coculture avec les souches LbM2a, LBRE-LSAS et Bb12

Selon les résultats obtenus, l'allure de l'activité antagoniste des deux souches LbM2a et LBRE-LSAS vis-à-vis des bactéries pathogènes et de quelques bactéries lactiques, diffère selon la souche considérée.

III.5.1. Cinétique d'inhibition de *Shigella sonnei* CECT 584

Après 2 h de contact des souches testées avec *Shigella sonnei* nous avons enregistré des pertes de viabilité variant de 0.12 à 1.12 log (fig. 28A), où la souche LbM2a exhibé un taux d'inhibition de l'ordre de 14.69 % (tableau 16).

La prolongation du contact de 4 h (fig. 28B), conduit à un léger changement, avec un maximum de perte de viabilité de *Shigella sonnei* de l'ordre de 1.21 log sous l'action de la souche LBRE-LSAS, correspondant à un taux d'inhibition de 24.70%.

Après 6 h de contact, l'action inhibitrice atteint un maximum de perte de viabilité de l'ordre de 2.54 log correspondant à l'action de la souche LBRE-LSAS (fig. 29A). Après 8 h de contact, nous constatons la prédominance de l'activité antagoniste des deux souches LBRE-LSAS et LbM2a, avec des taux d'inhibition de l'ordre de 41.09% et 37.84% (fig. 29B). Après 10 h de contact, la souche LBRE-LSAS maintient toujours la dominance de son action inhibitrice qui atteint un taux de 59.42 % (fig. 30A).

Des pertes de viabilité importantes enregistrées après 24 h de coculture, et qui sont de l'ordre de: 6.65, 6.28 et 6.83 log respectivement pour les souches Bb12, LBRE-LSAS et LbM2a, ce qui dévoile l'action inhibitrice dominante de la souche LbM2a sur *Shigella sonnei* (tableau 16 ; fig. 30 B et 31).

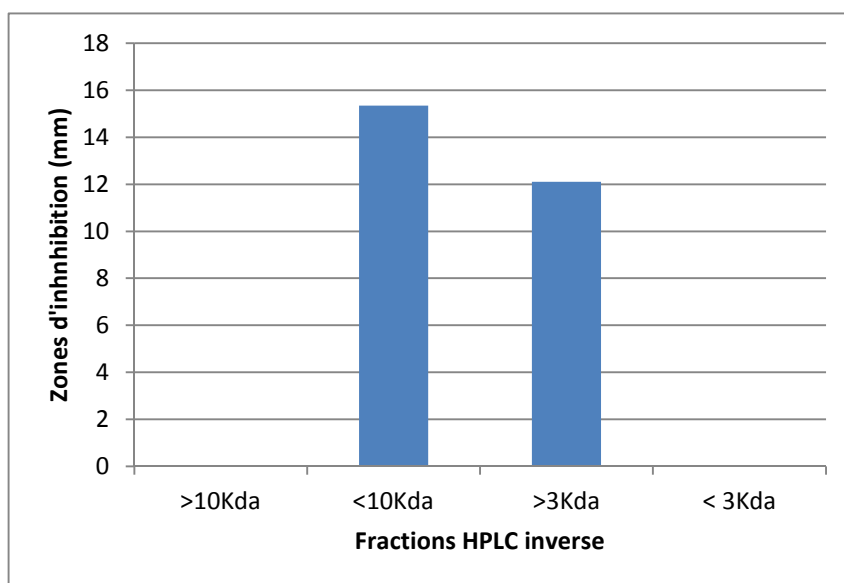


Figure 27: Activité (exprimée en mm de zone d'inhibition) des fractions HPLC inverse ultra-filtrées du SBAN de la souche LbM2a en utilisant *Micrococcus luteus* ATCC 10420 comme souche indicatrice.

Tableau 16 : Pertes de la viabilité (log UFC/mL) et taux d'inhibition (en % des cellules inhibées) de *Shigella sonnei* CECT 584 en coculture à 37°C avec les souches antagonistes dans un rapport cellulaire égal à 1.

Souches antagonistes	Inhibition exprimée en	Temps de coculture					
		T2h	T4h	T6h	T8h	T10h	T24h
LbM2a	Perte de viabilité en log UFC/mL	0.934	1.73	2.458	2.907	3,814	6.838
	% des cellules inhibées	12.22	22.46	31.98	37.84	49.67	88.94
Bb12	Perte de viabilité en log UFC/mL	0.12	0.476	1.269	2.326	3.063	6.28
	% des cellules inhibées	1.56	6.24	16.51	30.29	39.92	81.66
LBRE-LSAS	Perte de viabilité en log UFC/mL	1.121	1.899	2.539	3.158	4.566	6.655
	% des cellules inhibées	14.69	24.70	31.98	41.09	59.42	86.66

Des résultats similaires relatifs à la sensibilité de *Shigella sonnei* ont été rapportés par plusieurs auteurs. Ainsi, [Gomes et al. \(2006\)](#), ont rapporté que 91% de *Bifidobacterium bifidum* et 81% de *Bifidobacterium longum* du total isolé à partir de fèces humaines, exercent une activité antagoniste vis-à-vis de *Shigella sonnei* et *Shigella enterica*.

Par ailleurs, [Moorthy et al. \(2007, 2009\)](#) ont constaté que la consommation d'une combinaison de deux souches lactiques *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus acidophilus*, offrait une bonne protection vis-à-vis des infections à *Shigella*.

[Hutt et al. \(2006\)](#) ont étudié le pouvoir antagoniste de la souche *Lactobacillus rhamnosus* GG avec deux souches bifides : *Bifidobacterium animalis* spp *lactis* Bb12 et *Bifidobacterium longum* 46, vis-à-vis de *Shigella sonnei* ATCC 25931, ces auteurs ont observé une action inhibitrice importante exercée e la part des deux souches bifides, cet antagonisme était plus fort en affichant des pertes de viabilité comprises entre 5.9 et 6.5 log. Par contre la souche *L. rhamnosus* a conduit à des pertes de viabilité de *Shigella sonnei* comprise entre 3.4 et 5.8 log.

Les résultats de la présente étude, qui montrent que la souche de *Lactobacillus plantarum* LbM2a présente une forte activité antagoniste, sont similaires à ceux rapportés par ces auteurs.

III.5.2. Cinétique d'inhibition de *Shigella dysenteriae* CECT 457

Le contact cellulaire de 2 h des souches antagonistes testées avec *Shigella dysenteriae* CECT457, était faible avec pertes de viabilité enregistrées comprises entre 0.87 et 12.22 log. Les taux d'inhibition variaient entre 0.76 à 12.22 % avec un maximum enregistré avec la souche LBRE-LSAS (fig. 32A et tableau 17).

Après 4 h de contact cellulaire (fig. 32B), nous avons enregistré un faible changement avec les pertes de viabilité suivantes : 0.578, 1.146 et 1.206 log, respectivement pour les souches Bb12, LbM2a et LBRE-LSAS (tableau 17).

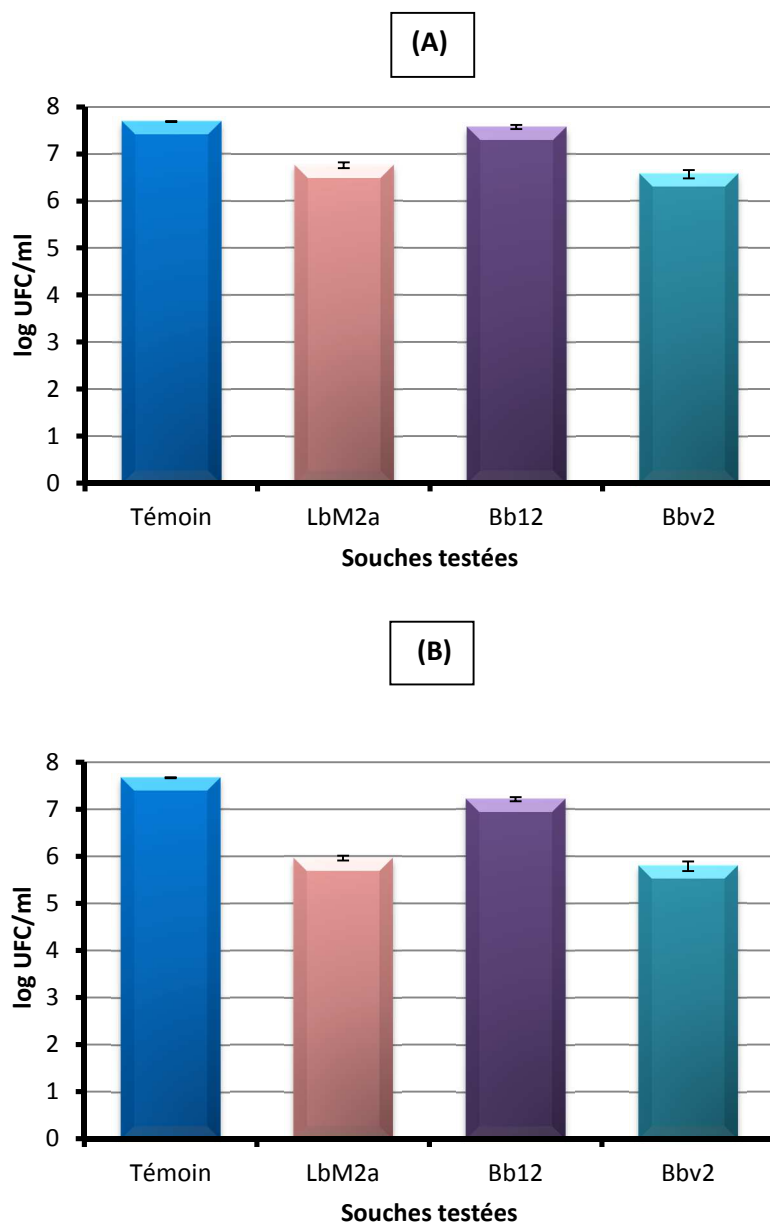


Figure 28: Viabilité des cellules de *Shigella sonnei* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 2 h (A) et 4 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoins = culture pure de *Shigella sonnei* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

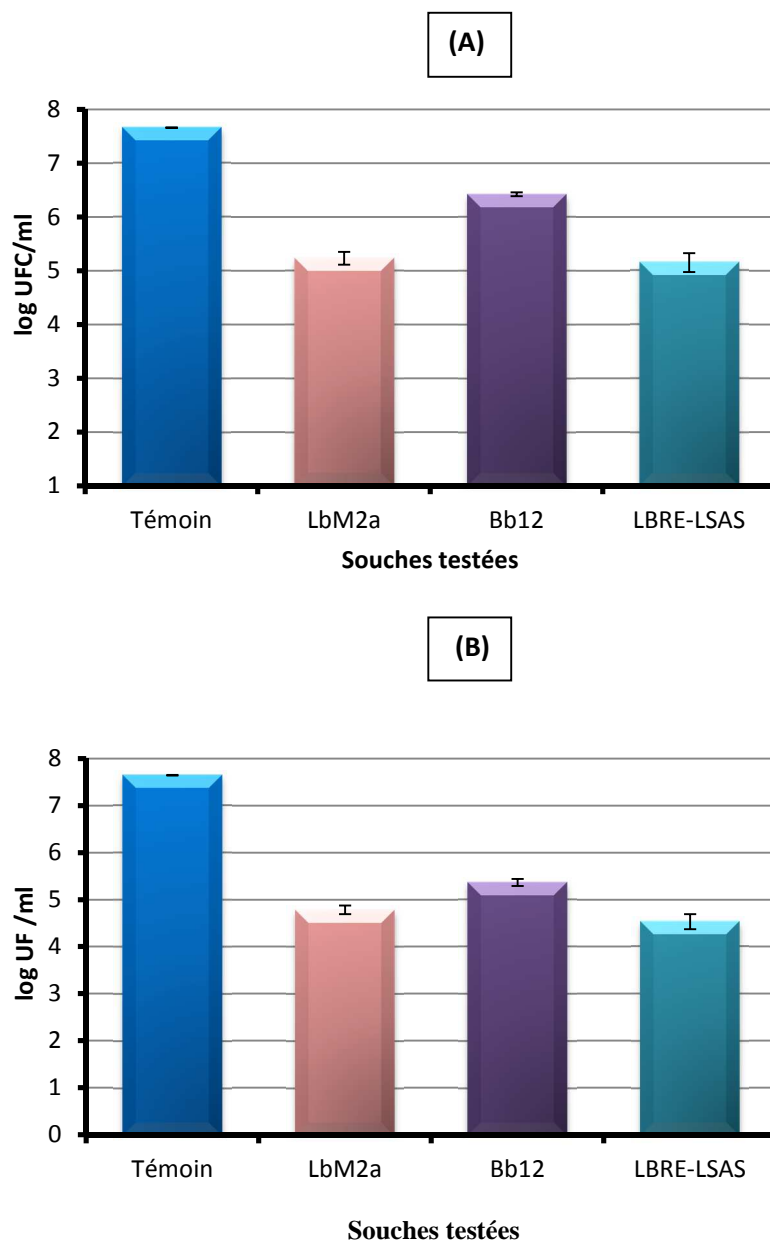


Figure 29: Viabilité des cellules de *Shigella sonnei* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 6 h (A) et 8 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoïn = culture pure de *Shigella sonnei* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

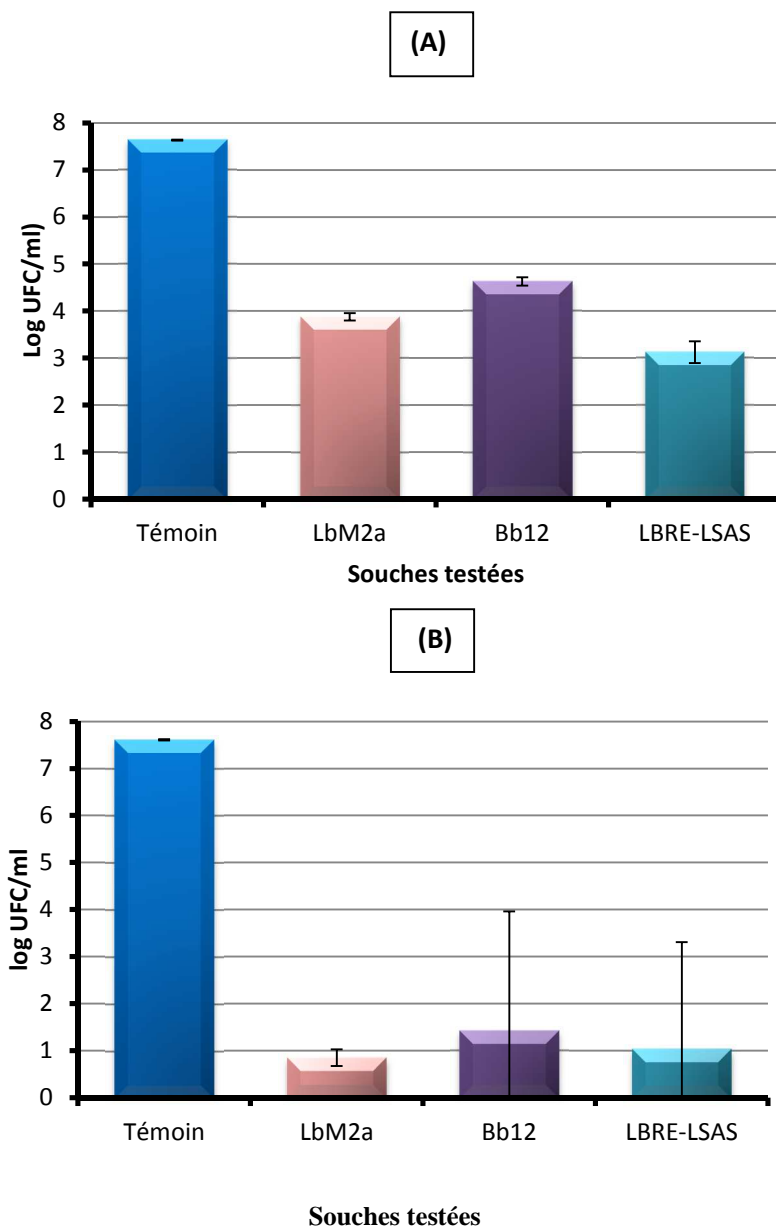


Figure 30: Viabilité des cellules de *Shigella sonnei* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 10 h (A) et 24 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoins = culture pure de *Shigella sonnei* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

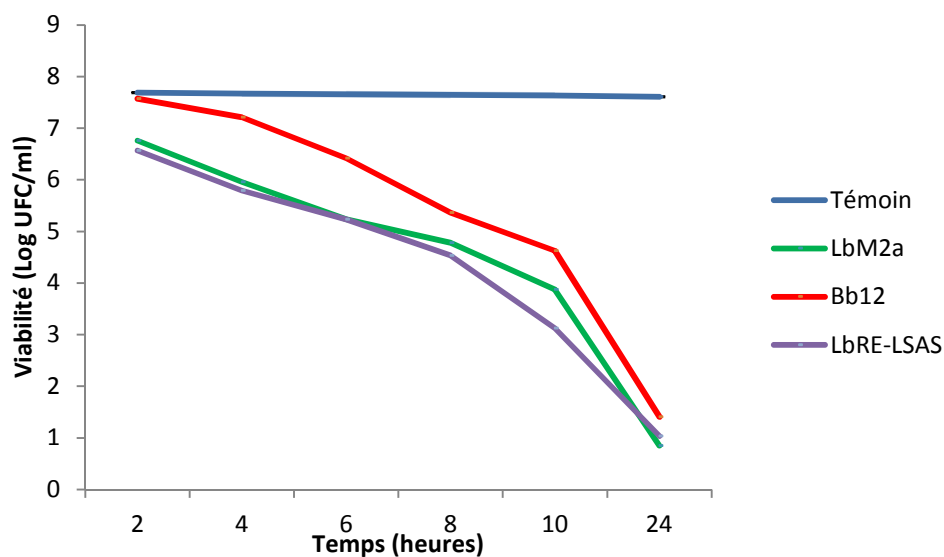


Figure 31 : Cinétique d’inhibition des cellules de *Shigella sonnei* (log UFC /mL) soumise à l’antagonisme des différentes souches testées / souche pathogène=1 /1. Témoin = culture pure de *Shigella sonnei* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

L'activité antagonistes augmente après 6 h de contact cellulaire, en affichant un maximum de perte de viabilité (1.558 log) avec un taux de 20.28 % par la souche LBRE-LSAS, suivi respectivement par les souches LbM2a et Bb12 (fig. 33A).

Après 8 h de contact (fig. 33B), nous avons noté une faible évolution avec une action maximale exercée par la souche LbM2a, reflétée par un taux d'inhibition atteignant plus de 26.52%, correspondant à une perte de viabilité de l'ordre de 2.04 log, suivie par la souche LBRE-LSAS avec un taux de 26.17%, correspondant à une perte de viabilité de l'ordre de 2.013 log; par contre la souche Bb12 été moins active (18.85%).

Après 10 h de contact, le maximum d'inhibition enregistré vis-à-vis de *Shigella dysenteriae* est atteint par la souche LBRE-LSAS (49.68%), et qui correspond à une perte de viabilité de l'ordre de 3.82 log (fig. 34A).

Après 24 h de contact le maximum d'inhibition a été enregistré entre le germe pathogène et les souches testées (fig. 34 B et 35).

D'après la figure 33B, nous constatons que la souche LbM2a est la plus active sur *Shigella dysenteriae* avec un taux d'inhibition de l'ordre de 87.38%, suivi respectivement par les souches LBRE-LSAS et Bb12, correspondant à des taux d'inhibition de l'ordre de 79.71 et 77.63%, respectivement (tableau 17).

Tableau 17 : Pertes de la viabilité (log UFC/mL) et taux d'inhibition (en % des cellules inhibées) de *Shigella sonnei* CECT 584 en coculture à 37°C avec les souches antagonistes dans un rapport cellulaire égal à 1.

Souches antagonistes	Inhibition exprimée en	Temps de coculture en heures					
		T2h	T4h	T6h	T8h	T10h	T24h
LbM2a	Perte de viabilité en log UFC/mL	0.734	1.146	1.333	2.04	3.205	6.719
	% des cellules inhibées	9.62	14.95	17.42	26.52	41.67	87.38
Bb12	Perte de viabilité en log UFC/mL	0.059	0.578	0.840	1.45	2.348	5.968
	% des cellules inhibées	0.76	7.54	10.92	18.85	30.55	77.63
LBRE-LSAS	Perte de viabilité en log UFC/mL	0.939	1.206	1.558	2.013	3.821	6.13
	% des cellules inhibées	12.22	15.73	20.28	26.17	49.68	79.71

Dans une étude effectuée par Moorthy *et al.* (2007, 2009), ils ont constaté que la consommation d'une combinaison de deux souches lactiques *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus acidophilus*, conférait une bonne protection vis-à-vis des infections à *Shigella*.

De même Gomes *et al.* (1998) ont constaté que la consommation de *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium bifidum* conduit à l'augmentation de la résistance de l'hôte contre la colonisation par: *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis* et *Clostridium perfringens*.

Les observations faites par Prema *et al.* (2013) concernant la forte activité antagoniste de la souche *Lactobacillus plantarum* sont en accord avec l'ampleur de l'antagonisme de la souche LbM2a vis-à-vis de *Shigella dysenteria* noté dans la présente étude.

Fooks *et Gibson* (2002) ont démontré la présence d'une forte action inhibitrice exercée par la souche Bb12 vis-à-vis de *Salmonella enteridis*, *E. coli* et *Campylobacter jejuni*. Ces auteurs ont noté que *L. plantarum* 0407 et *B. lactis* Bb12 ont tendance à inhiber la croissance des agents pathogènes en particulier *E. coli*.

Le spectre d'activité antagoniste de *L. rhamnosus* est généralement très large, comprenant *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium* et *Listeria monocytogenes* (Gopal *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2011). Cette propriété antimicrobienne est probablement due à la présence de protéines bactériocine-like, stables aux variations de température et avec un large spectre d'action (Forestier *et al.*, 2001 ; Sarika *et al.*, 2010).

La souche *L. rhamnosus* GG a des propriétés immunomodulatrices avec un impact bénéfique pour le consommateur (Saarela *et al.*, 2000). *L. rhamnosus* GG a également la capacité d'inhiber l'adhérence des bactéries pathogènes aux cellules intestinales par compétition pour leurs récepteurs (Collado *et al.*, 2007).

Dans cette étude, un potentiel antagoniste élevé du surnageant bactérien à acidité neutralisée (SBAN) de la souche *Lactobacillus plantarum* LbM2a vis-à-vis de *Shigella dysenteriae* CECT 457 a été enregistré. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par contact cellulaire entre les deux souches.

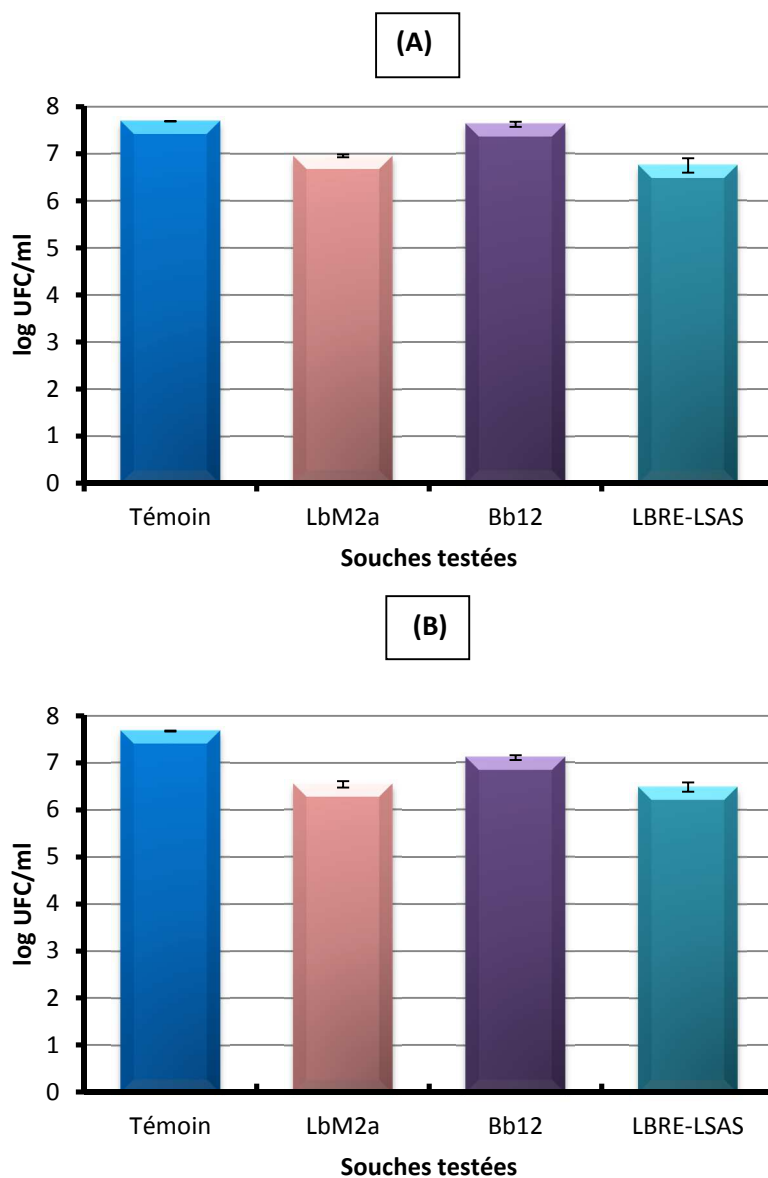


Figure 32: Viabilité des cellules de *Shigella dysenteriae* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 2 h (A) et 4 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Shigella dysenteriae* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

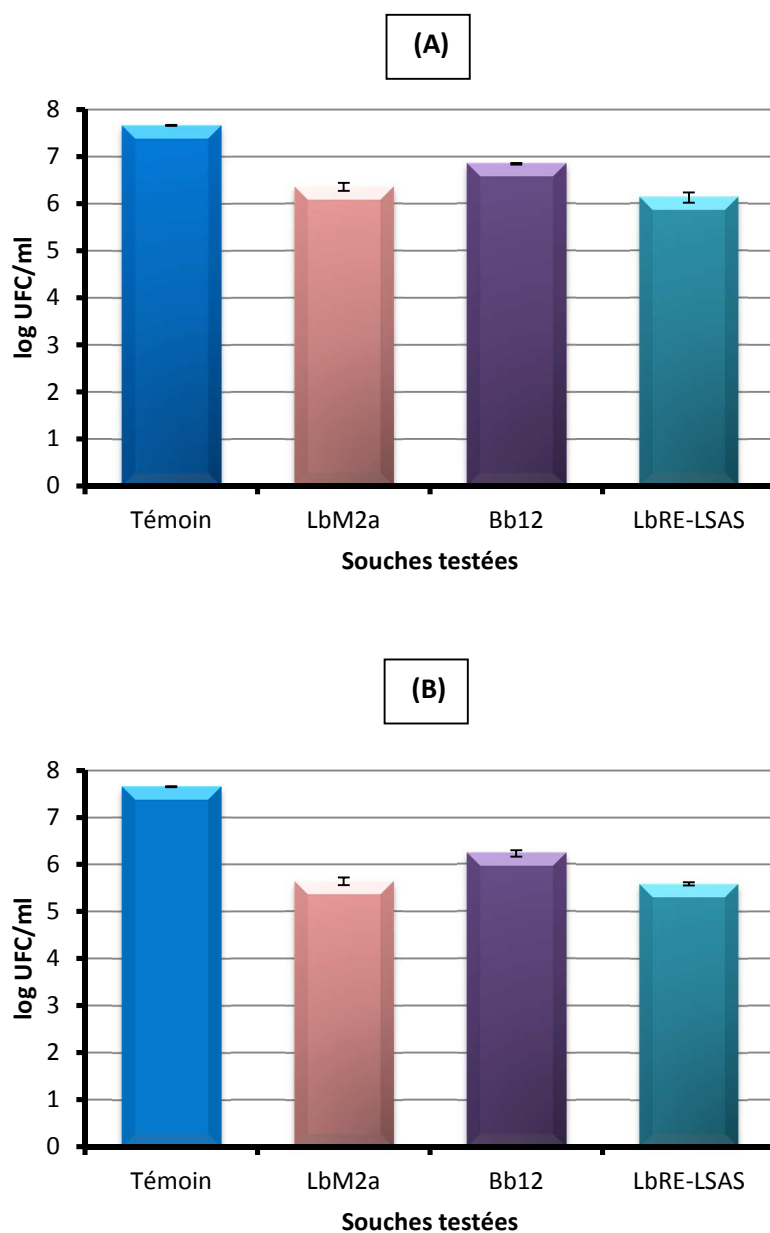


Figure 33: Viabilité des cellules de *Shigella dysenteriae* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 6 h (A) et 8 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoins = culture pure de *Shigella dysenteriae* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

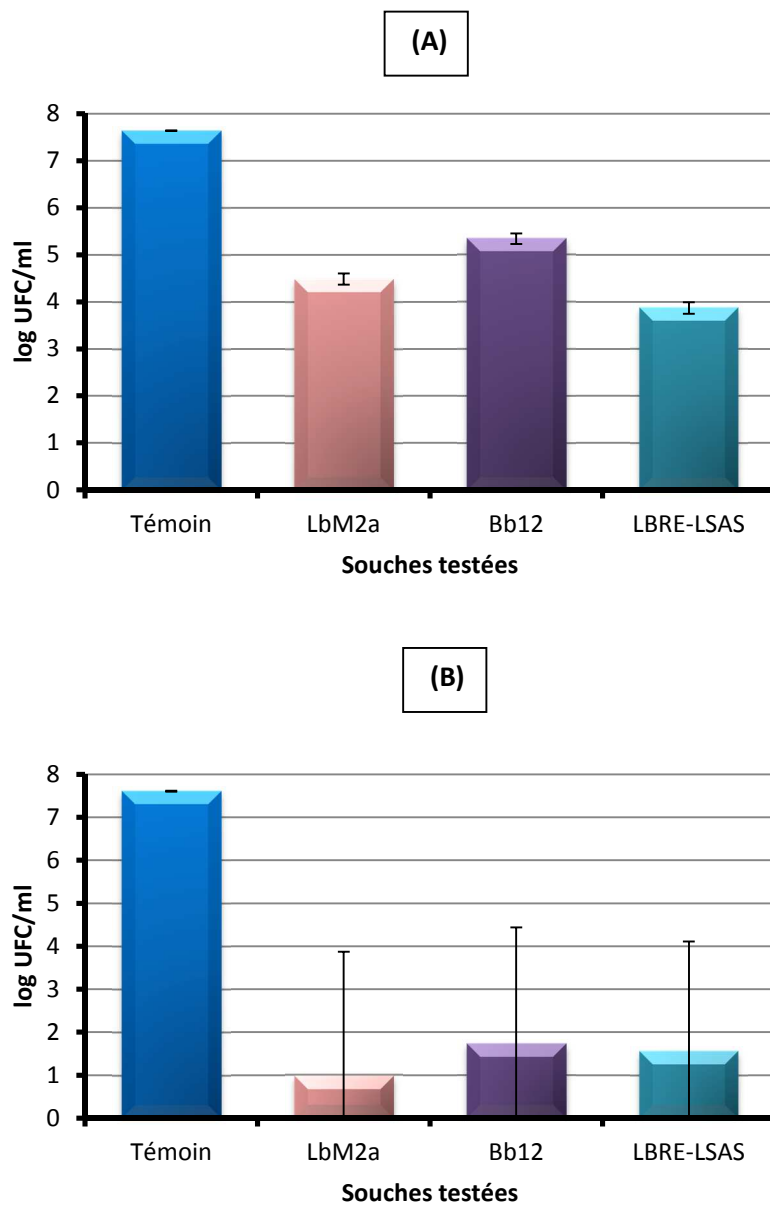


Figure 34: Viabilité des cellules de *Shigella dysenteriae* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 10 h (A) et 24 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Shigella dysenteriae* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

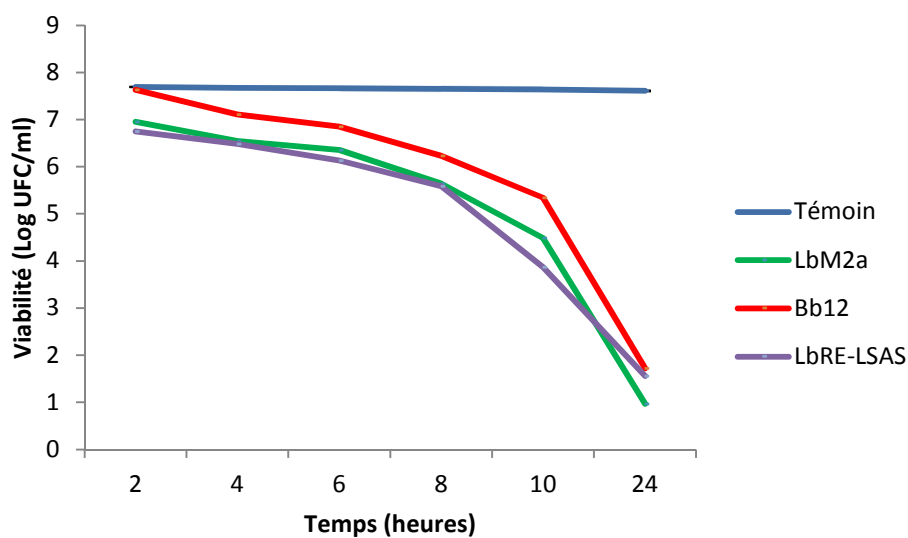


Figure 35 : Cinétique d'inhibition des cellules de *Shigella dysenteriae* (log UFC /mL) soumise à l'antagonisme des différentes souches testées / souche pathogène=1 /1. Témoign = culture pure de *Shigella dysenteriae* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

III.5.3. Cinétique d'inhibition de *Listeria innocua* CECT 457 en coculture avec les souches LbM2a, LBRE-LSAS et Bb12

Le contact cellulaire entre *Listeria innocua* et les souches testées a montré après 2 h de contact des pertes de viabilité variant de 0.157 à 0.367 log (fig. 36A), où la souche LbM2a était la plus active avec un taux d'inhibition de l'ordre de 4.77 %.

Lorsque ce contact est prolongé à 4 h (fig. 36B), le maximum de perte de viabilité notée pour *Listeria innocua* est de l'ordre de 0.90 log sous l'action de la souche LBRE-LSAS, ce qui correspond à un taux d'inhibition de 11.76%.

L'activité antagoniste continue à progresser après 6 h de contact, atteignant un maximum de perte de viabilité de l'ordre de 1.42 log correspondant à un taux de 18.55% d'inhibition exercée par la souche LBRE-LSAS (fig. 37A ; tableau 18).

Après 8 h de contact, nous constatons toujours la prédominance de l'action inhibitrice de la souche LbM2a, dont le taux d'inhibition est de l'ordre de 31.67% (fig. 37B). Après 10 h de contact, la souche LbM2a maintient toujours la dominance de son action inhibitrice qui atteint un taux de 56.29% (fig. 38A ; tableau 18).

Après 24 h de coculture, on observe un maximum d'action antagoniste vis-à-vis de *Listeria innocua*, et qui est reflété par des pertes de viabilité de l'ordre de: 7.037, 6.757 et 6.149 log, correspondant à des taux d'inhibition de 91.50, 87.86 et 79.96 % pour les souches LbM2a, LBRE-LSAS et Bb12, respectivement (fig. 38B et 39 ; tableau 18). Ces résultats prouvent l'efficacité de la souche LbM2a contre *Listeria innocua* CECT 584.

[Ammor et al. \(2006\)](#) ont utilisé *Listeria innocua* au lieu de *Listeria monocytogenes*, du fait que les deux espèces possèdent les mêmes propriétés physiologiques sauf que *L. innocua* ne possède pas le caractère pathogène.

En plus, certains auteurs ont observé une sensibilité plus élevée de *Listeria monocytogenes* par rapport à *Listeria innocua* ([Mataragas et al, 2003](#)).

Dans une étude menée par [Moroni et al. \(2006\)](#) sur l'inactivation de l'adhésion et l'invasion de *Listeria monocytogenes*, par une bactériocine produite par une souche bifide d'origine humaine, *B. thermacidophilium* RBL70, était la plus effective pour le blocage de l'invasion de *Listeria*.

Tableau 18 : Pertes de la viabilité (log UFC/mL) et taux d'inhibition (en % des cellules inhibées) de *Listeria innocua* CECT584 en coculture à 37°C avec *Lactobacillus plantarum* (LbM2a), *Bifidobacterium aimalis* subsp *lactis* (Bb12) et *Lactobacillus rhamosus* (LBRE-LSAS) dans un rapport cellulaire égal à 1.

Souches antagonistes	Inhibition exprimée en	Temps de coculture en heures					
		T2h	T4h	T6h	T8h	T10h	T24h
LbM2a	Perte de viabilité en log UFC/mL	0.367	0.835	1.358	2.436	4.329	7.037
	% des cellules inhibées	4.77	10.85	17.65	31.67	56.29	91.50
Bb12	Perte de viabilité en log UFC/mL	0.157	0.425	0.916	2.018	3.306	6.149
	% des cellules inhibées	2.041	5.52	11.91	26.24	42.99	79.96
LBRE-LSAS	Perte de viabilité en log UFC/mL	0.311	0.905	1.427	2.274	3.455	6.757
	% des cellules inhibées	4.044	11.76	18.55	29.54	44.92	87.86

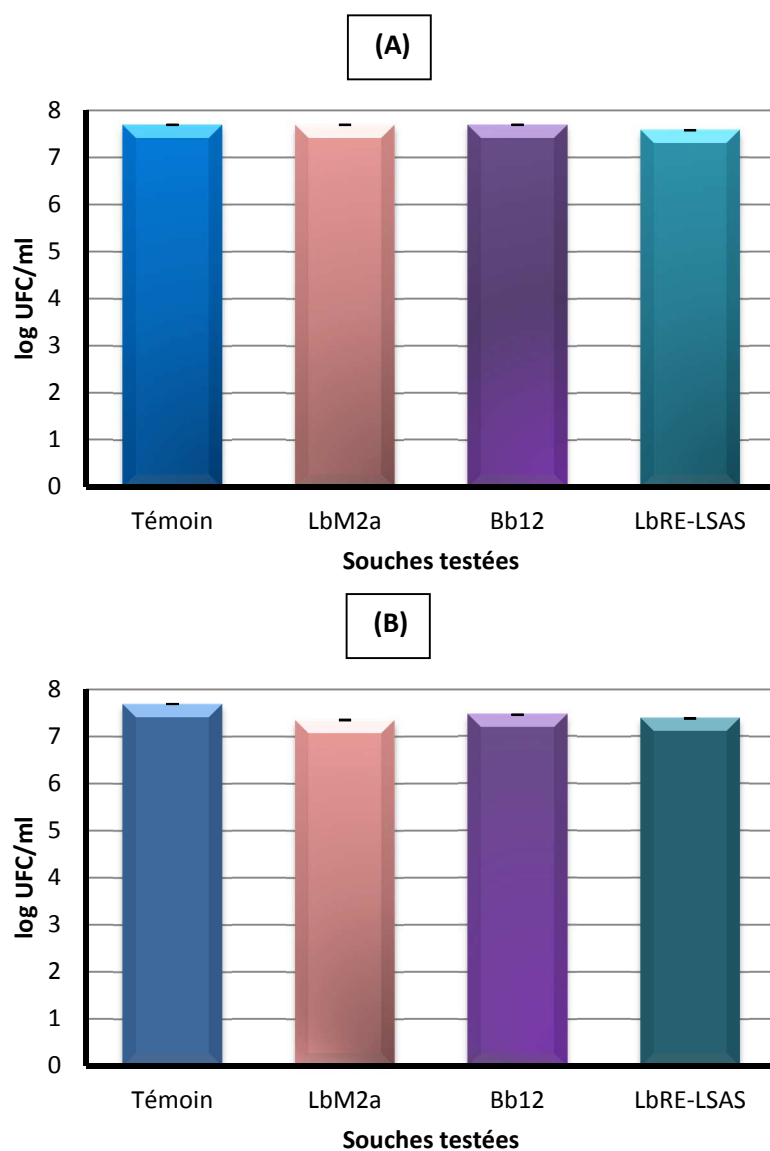


Figure 36: Viabilité des cellules de *Listeria innocua* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 2 h (A) et 4 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoïn = culture pure de *Listeria innocua* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

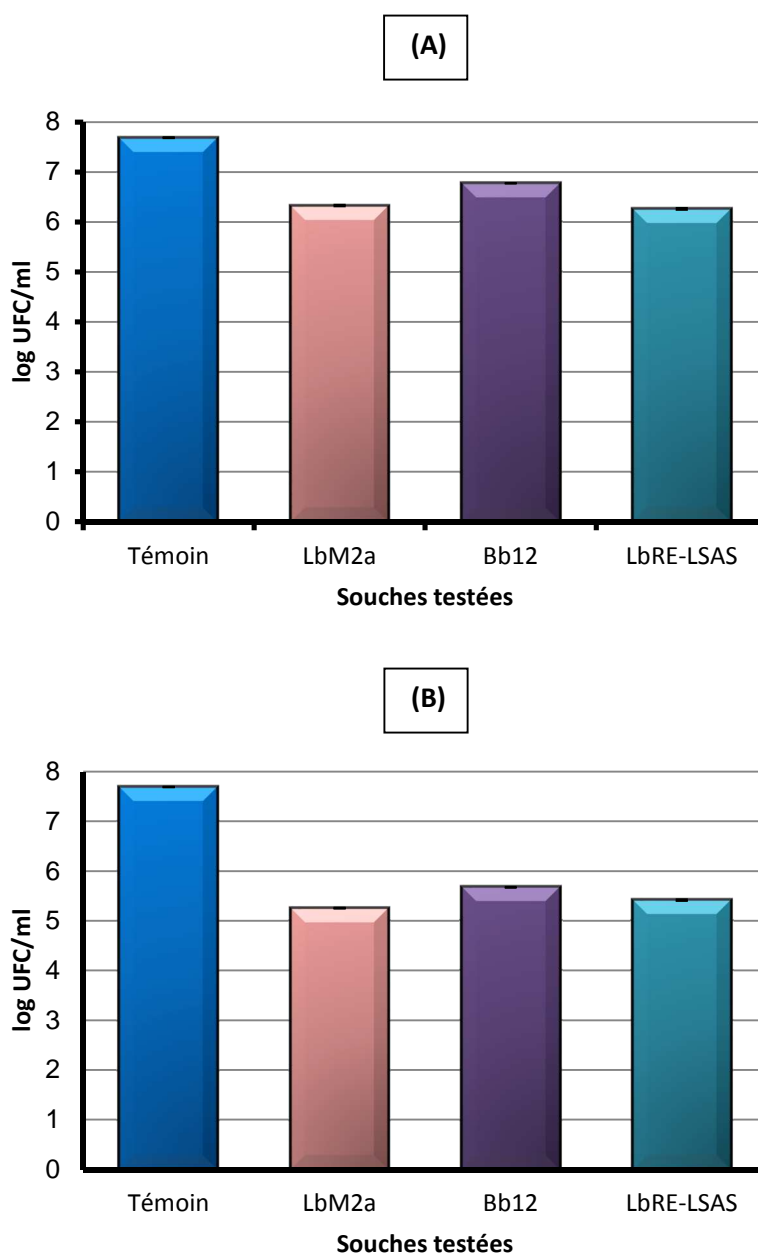


Figure 37: Viabilité des cellules de *Listeria innocua* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 6 h (A) et 8 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Listeria innocua* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

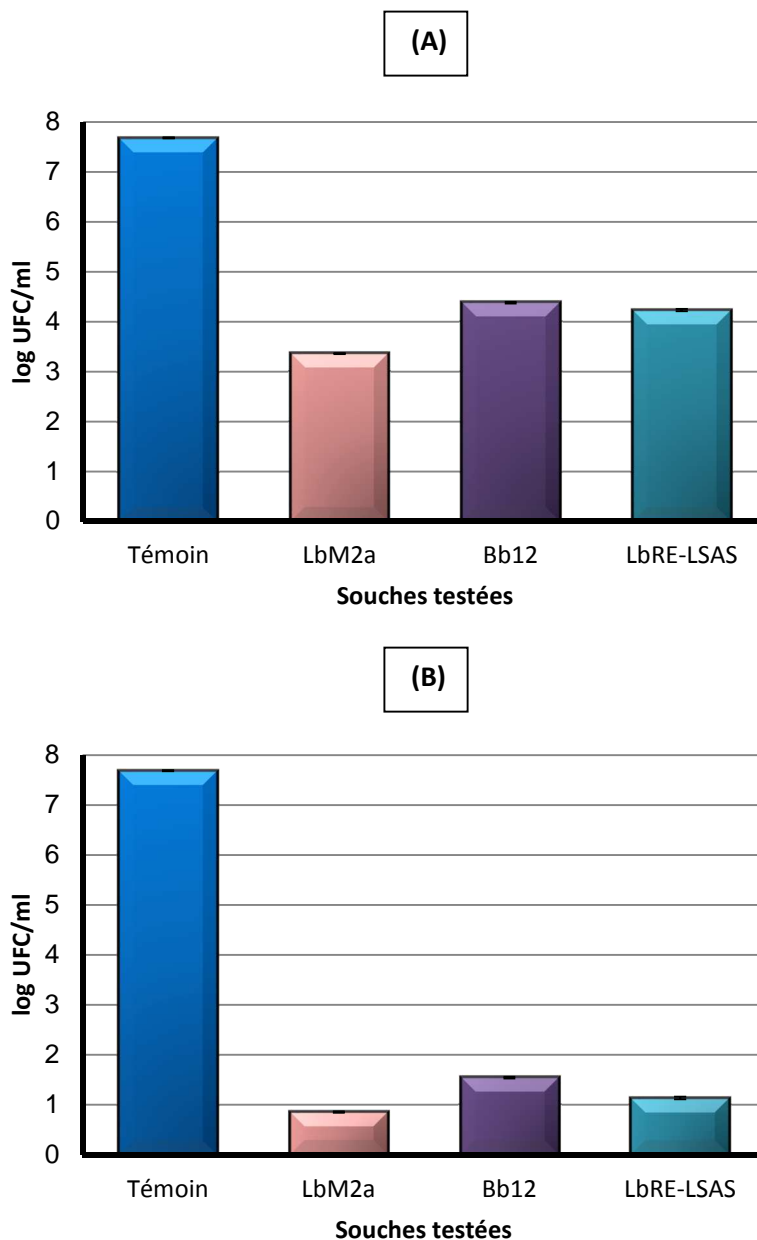


Figure 38: Viabilité des cellules de *Listeria innocua* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 10 h (A) et 24 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoign = culture pure de *Listeria innocua* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

Dans une expérience réalisée par Liévin et al. (2008), ils ont constaté qu'après 3 h de contact des souches bifides CA1 et F9 avec *Listeria monocytogenes*, la viabilité de ce pathogène a diminuée de 3 log.

Lewus et al. (1991) ont testé l'activité antagoniste de *Lactobacillus acidophilus* 88 vis-à-vis de trois souches de *Listeria* : *L. monocytogenes* Scott A, *L. monocytogenes* V7 et *L. monocytogenes* 101m, les résultats ont été surprenants au vu de la résistance des deux premières souches qui n'ont pas donné des zones d'inhibition, alors que la troisième souche, *L. monocytogenes* 101m, a exprimé des zones qui varient entre 1 et 10 mm, malgré la similarité dans la structure protéique des bactériocines produites par *Lactobacillus acidophilus*.

La cinétique d'inhibition des cellules de *Listeria innocua* par les différentes souches testées est illustrée par la figure 38.

Dans une étude similaire, El Demerdash et Mostafa (2008) ont rapporté que *Listeria monocytogenes* DSM 12464 a été fortement inhibée par l'activité antimicrobienne des surnageants issues de deux souches de *B. bifidum* : B 11 et B12 ainsi qu'une souche de *L. rhamnosus* : HM2.

Dans une publication de O'Riordan et Fitzgerald (1998), à travers l'investigation de l'activité antagoniste de 22 souches bifides comprenant les espèces : *B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, il a été rapporté l'existence d'une forte inhibition vis-à-vis de *Listeria innocua* BL-86-26, *Staphylococcus* sp. UCC 1494 et de *Staphylococcus aureus* UCC PRMMI. En revanche, ces auteurs ont remarqué l'absence de l'activité inhibitrice dans les surnageants de ces souches.

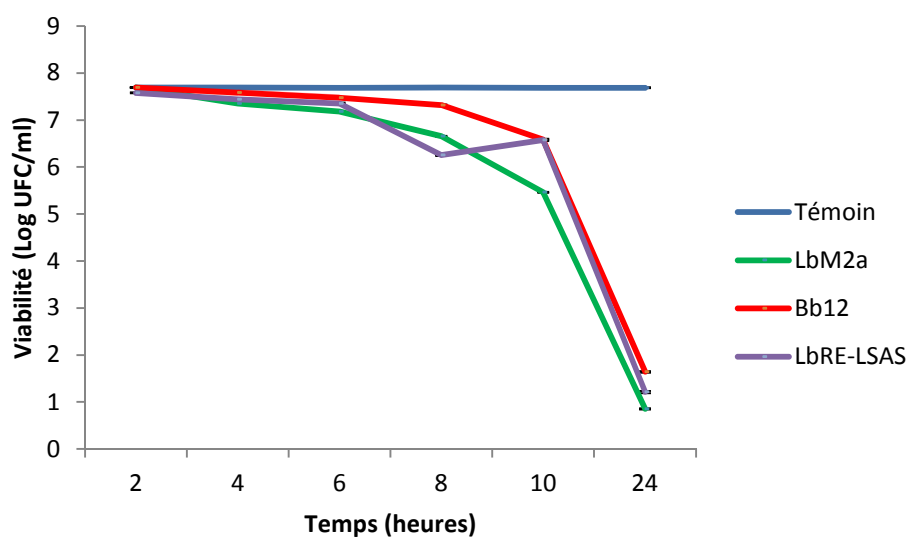


Figure 39 : Cinétique d'inhibition des cellules de *Listeria innocua* (log UFC /mL) soumise à l'antagonisme des différentes souches testées / souche pathogène=1 /1. Témoin = culture pure de *Listeria innocua* en absence de souches bénéfiques. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

Dans une étude réalisée par [Maria Jose et al. \(2015\)](#), il a été montré que les isolats issus du rumen: *L. reuteri*, *L. rhamnosus* et *L. plantarum* avaient un effet inhibiteur remarquable vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes* et *Salmonella menston*.

[Shuhaimi et al. \(1999\)](#) ont démontré que *B. infantis* G4 manifestait une activité antagoniste vis-à-vis de germes pathogènes comme *Vibrio cholerae*, *Salmonella enteritidis*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Listeria monocytogenes*.

III.5.4. Cinétique d'inhibition de *Micrococcus luteus* CECT 241

Après 2 h de contact cellulaire entre les souches testées et *Micrococcus luteus* CECT 241, nous avons noté une importante activité inhibitrice avec la dominance de l'action de la souche LBRE-LSAS (fig. 40A).

Après 4 h de contact (fig. 40B), la perte de la viabilité était comprise entre 1.57 et 2.17 log avec la dominance de la même souche.

Après 6 h de contact, une action majeure est enregistrée par la souche LBRE-LSAS sur *Micrococcus luteus*, où la perte de la viabilité était de l'ordre de 3.62 log (fig. 41A), correspondant à un taux de 47.07 (tableau 19). Après 8 h de contact, la souche LBRE-LSAS maintient sa dominance antagoniste avec un taux maximum de l'ordre de 52.66% (fig. 41B).

Après 10 h de contact, l'action inhibitrice continue à s'accroître légèrement avec une perte de viabilité variant de 3.97 à 4.54 log (fig. 42A).

La valeur maximale d'inhibition a été atteinte après 24 h de contact, où la perte de la viabilité maximale était de l'ordre de 7.145 log (tableau 19) correspondant à un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 92.91% exercée par la souche LBRE-LSAS (tableau 19 ; fig. 42B et 43).

Tableau 19 : Pertes de la viabilité (log UFC/mL) et taux d'inhibition (en % des cellules inhibées) de *Micrococcus luteus* CECT 241 en coculture à 37°C avec *Lactobacillus plantarum* (LbM2a), *Bifidobacterium aimalis* subsp *lactis* (Bb12) et *Lactobacillus rhamosus* (LBRE-LSAS) dans un rapport cellulaire égal à 1.

Souches antagonistes	Inhibition exprimée en	Temps de coculture en heures					
		T2h	T4h	T6h	T8h	T10h	T24h
LbM2a	Perte de viabilité en log UFC/mL	1.35	1.94	2.78	3.18	4.36	7.02
	% des cellules inhibées	17.55	25.22	36.15	41.35	56.69	91.39
Bb12	Perte de viabilité en log UFC/mL	1.18	1.57	2.22	3.42	3.97	6.58
	% des cellules inhibées	15.34	20.41	28.86	44.47	51.62	85.55
LBRE-LSAS	Perte de viabilité en log UFC/mL	1.47	2.17	3.62	4.05	4.54	7.14
	% des cellules inhibées	19.11	28.21	47.07	52.66	59.03	92.91

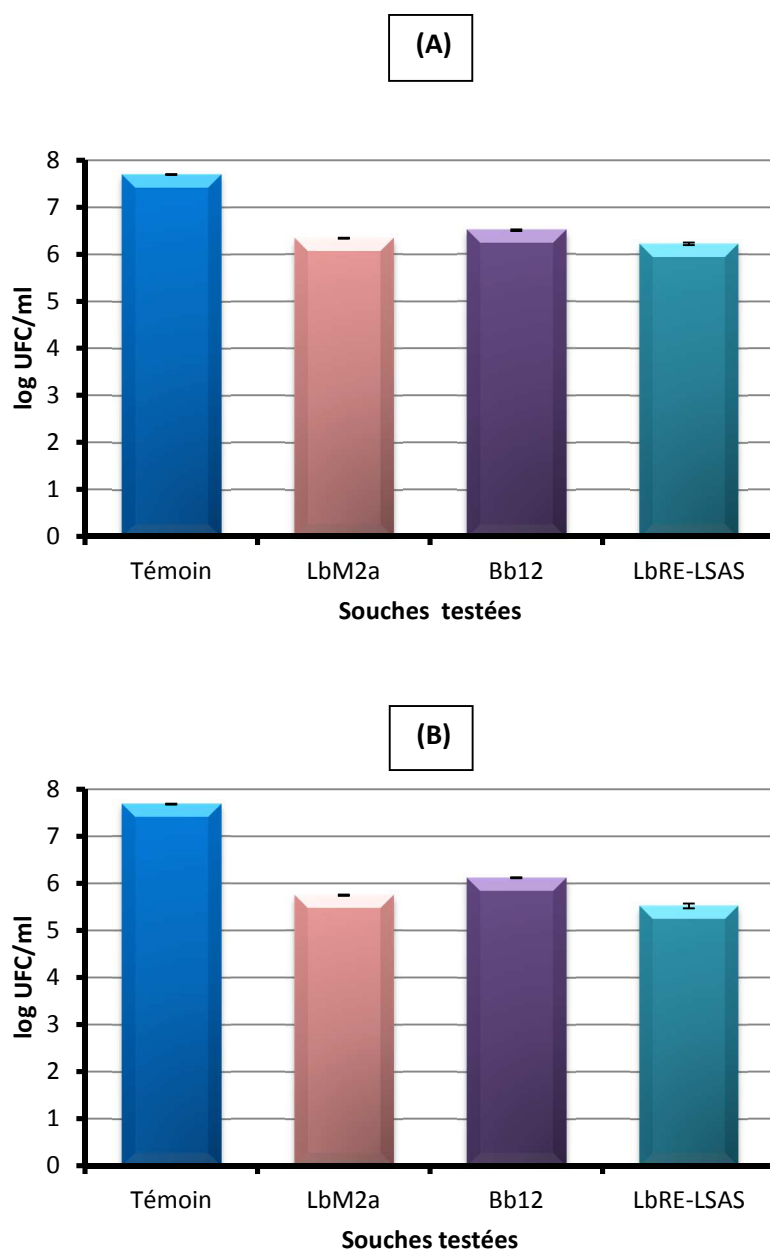


Figure 40: Viabilité des cellules de *Micrococcus luteus* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 2 h (A) et 4 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Micrococcus luteus* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

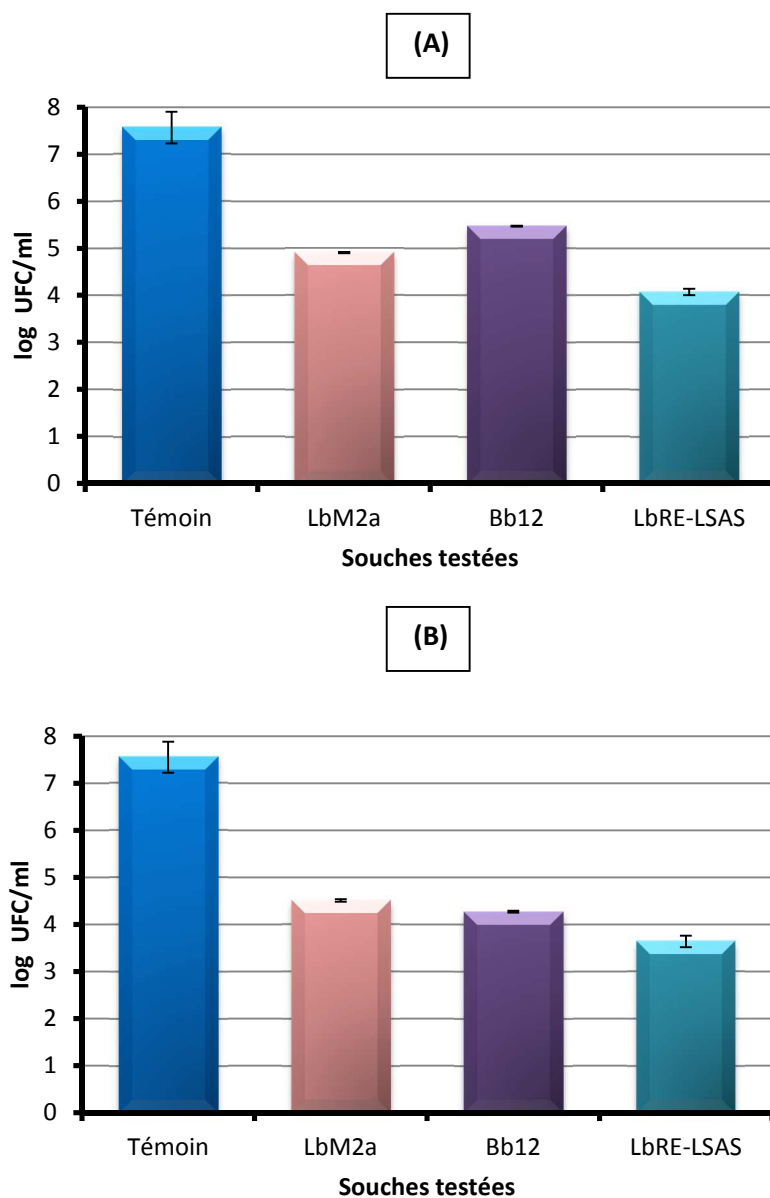


Figure 41: Viabilité des cellules de *Micrococcus luteus* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 6 h (A) et 8 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Micrococcus luteus* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

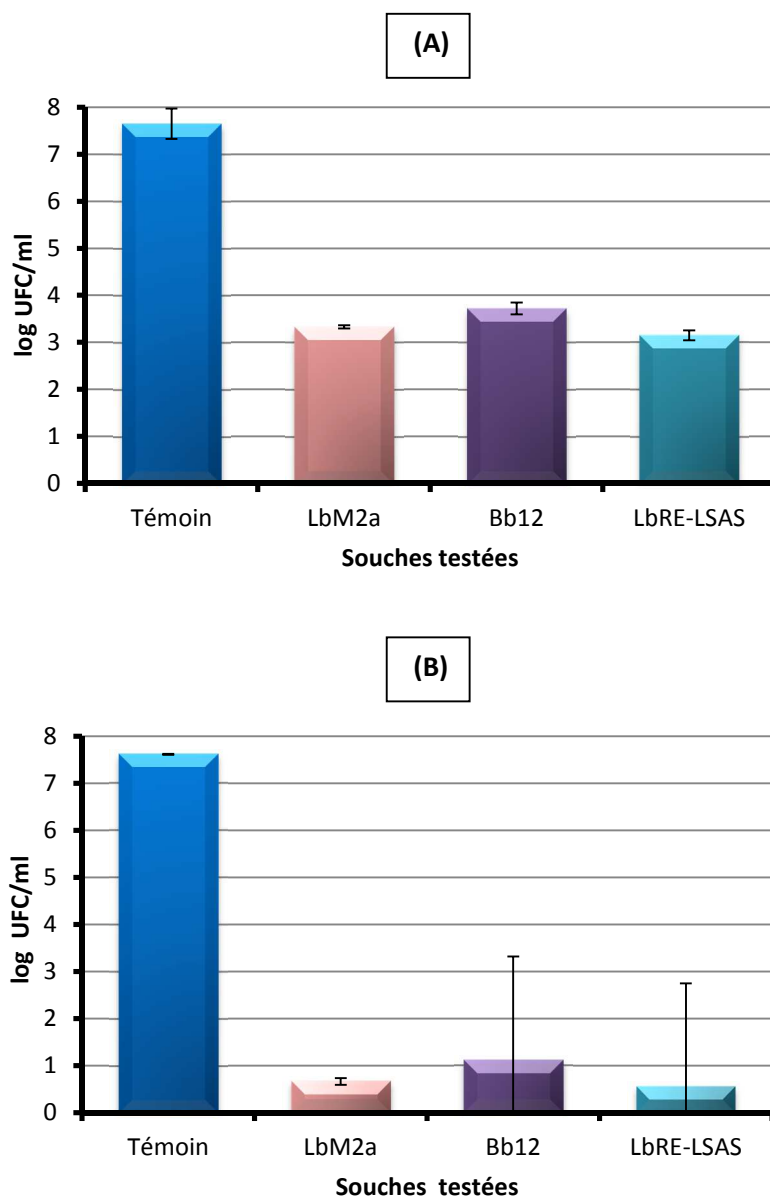


Figure 42: Viabilité des cellules de *Micrococcus luteus* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 10 h (A) et 24 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Micrococcus luteus* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

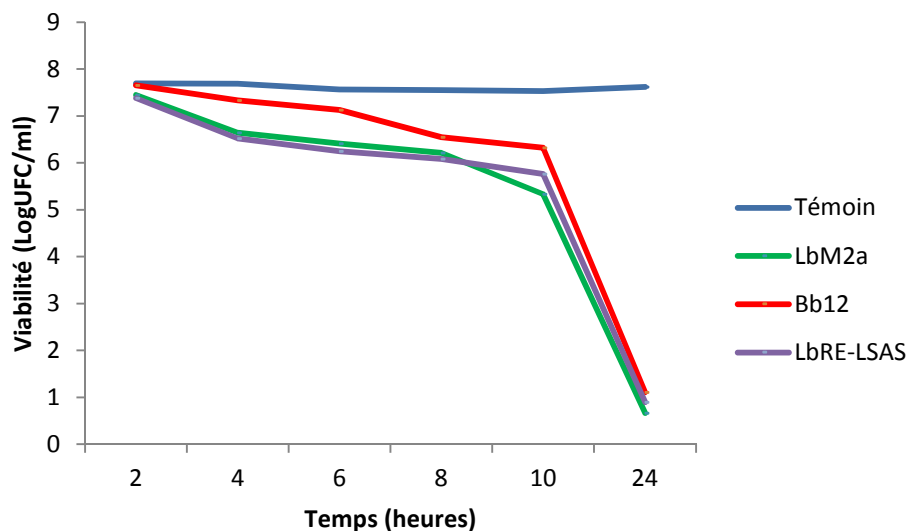


Figure 43: Cinétique d'inhibition des cellules de *Micrococcus luteus* (log UFC /mL) soumise à l'antagonisme des différentes souches testées / souche pathogène=1 /1. Témoin = culture pure de *Micrococcus luteus* en absence de souches bénéfiques. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

Dans la plupart des recherches relatives à l'activité antagoniste, notamment celles des bactéries lactiques, on a souvent recours à *Micrococcus luteus* comme microorganisme indicateur en raison de sa forte sensibilité (Wirawan *et al.*, 2006; Riazi *et al.*, 2007, 2009).

L'étude de Li *et al.* (2005) est un autre cas d'exemple d'utilisation de *Micrococcus luteus* (dans leur cas, il s'agit de l'ATCC 10420) comme souche indicatrice de l'activité antagoniste d'une bactériocine, la lactocine 160, produite par *Lactobacillus rhamnosus*.

Dans la présente étude (Chaalel *et al.*, 2015), deux souches de cette espèce (*Micrococcus luteus* ATCC 10420 et *Micrococcus luteus* CECT 241) ont servi comme souches indicatrices de l'activité antagoniste de la souche *Lactobacillus plantarum* LbM2a.

III.5.5. Cinétique d'inhibition de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en coculture avec les souches LbM2a, LBRE-LSAS et Bb12

Après 2 h de contact entre les souches testées et le pathogène *Staphylococcus aureus* CECT457, l'inhibition était légère, notant des pertes de viabilité variables de 0.11 à 0.22 log, et les taux d'inhibition variaient entre 1.45 et 2.82 % avec un maximum enregistré avec la souche LbM2a (fig. 44A ; tableau 20).

Après 4 h de contact cellulaire (fig. 44B), le taux d'inhibition a faiblement augmenté pour afficher un maximum de 7.34 % avec la LBRE-LSAS. La perte de viabilité s'altère faiblement, pour donner les valeurs suivantes : 0.30, 0.47 et 0.57 log, respectivement pour les souches Bb12, LbM2a et LBRE-LSAS (tableau 20).

L'inhibition augmente légèrement après 6 h de contact pour atteindre un maximum de perte de viabilité de l'ordre de 1.55 log avec un taux de 20.13 % par la souche LbM2a suivie, respectivement, par les souches LBRE-LSAS et Bb12 (fig. 45A).

Après 8 h de contact (fig. 45B), l'activité inhibitrice des souches testées évolue avec une action maximale exercée par la souche LBRE-LSAS, reflétée par un taux d'inhibition atteignant 39.05 %, correspondant à une perte de viabilité de l'ordre de 2.23 log, suivie par la souche LbM2a qui affiche une action inhibitrice de l'ordre de 33.23 %, correspondant à une

perte de viabilité de l'ordre de 2.56 log; alors que la souche Bb12 a montré une action inhibitrice moins importante, et qui est de l'ordre de 24.08 %.

Après 10 h de contact, le maximum d'inhibition enregistré vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* est atteint par la souche LbM2a (58.71%), et qui correspond à une perte de viabilité de l'ordre de 4.51 log (fig.46A).

Au bout de 24 h de contact le maximum d'inhibition a été enregistré entre le germe pathogène et les souches testées (fig.46B). D'après la figure 46B, nous constatons que la souche LbM2a est celle qui est la plus active sur *Shigella dysenteriae* avec un taux d'inhibition de l'ordre de 93.15 %, suivie respectivement par les souches LBRE-LSAS et Bb12 dont les taux d'inhibition respectifs sont de l'ordre de 82.41 et 67.23% (tableau 20, fig. 47).

Dans une étude similaire, [El Demerdash et Mostafa \(2008\)](#) ont rapporté que *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 a été fortement inhibée par l'activité antimicrobienne des surnageants issus de deux cultures de deux souches de *B. bifidum* : B 11 et B12 ainsi que d'une troisième culture d'une souche de *L. rhamnosus* : HM2.

[Mobarez et al. \(2008\)](#) ont étudié l'activité antagoniste des bactériocines issues de 6 souches de *Lactobacillus acidophilus* isolées du yaourt traditionnel vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, ils ont constaté une puissante activité antagoniste exercée par les surnageants de ces souches.

Dans une étude similaire réalisée par [Topisirovic et al. \(2006\)](#), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGSM1-19 est très active vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ; alors qu'aucune action antagoniste n'est observé sur la souche *Staphylococcus aureus* MR427.

Dans la présente étude, l'activité antagoniste de la souche isolée, *Lactobacillus plantarum* LbM2a, vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 a été puissante.

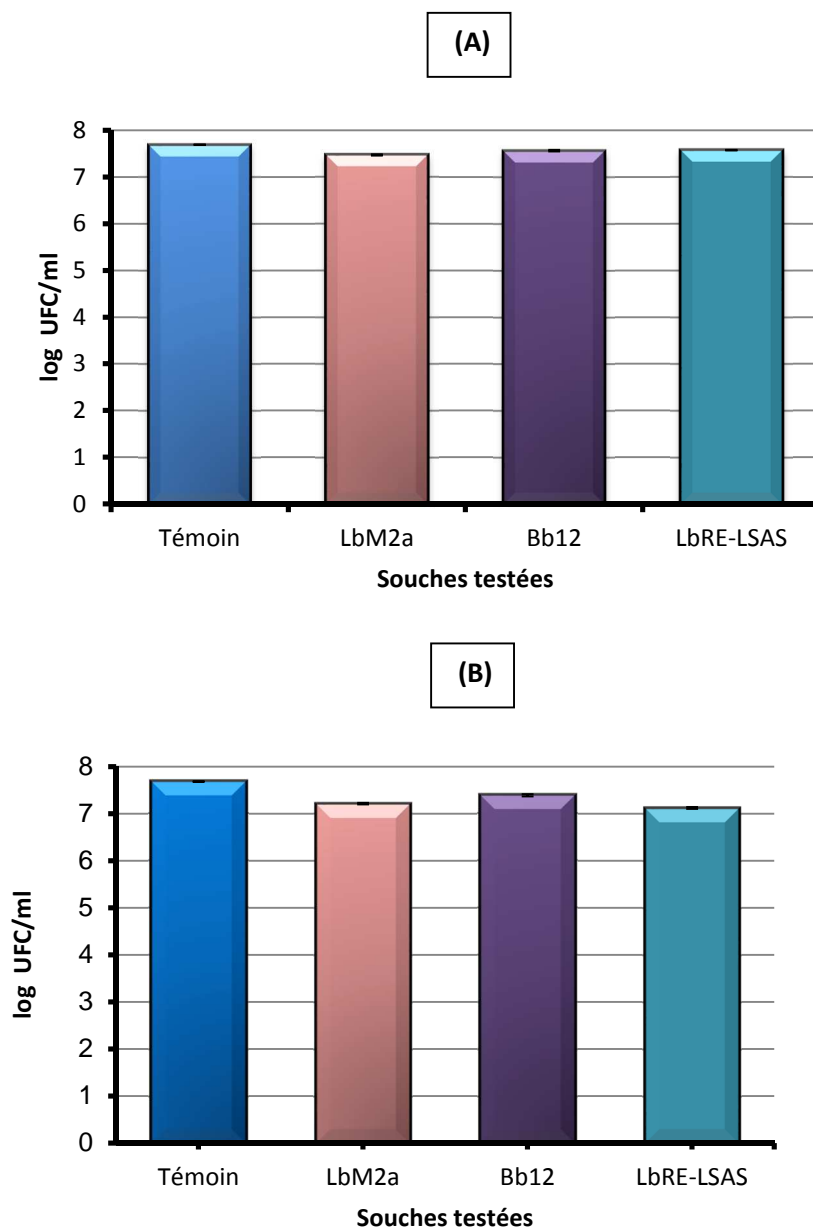


Figure 44: Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 2 h (A) et 4 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Staphylococcus aureus* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

Tableau 20 : Pertes de la viabilité (log UFC/mL) et taux d'inhibition (en % des cellules inhibées) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en coculture à 37°C avec *Lactobacillus plantarum* (LbM2a), *Bifidobacterium aimalis* subsp *lactis* (Bb12) et *Lactobacillus rhamosus* (LBRE-LSAS) dans un rapport cellulaire égal à 1.

Souches antagonistes	Inhibition exprimée en	Temps de coculture en heures					
		T2h	T4h	T6h	T8h	T10h	T24h
LbM2a	Perte de viabilité en log UFC/mL	0.217	0.475	1.548	2.556	4.515	7.164
	% des cellules inhibées	2.82	6.17	20.13	33.23	58.71	93.15
Bb12	Perte de viabilité en log UFC/mL	0.126	0.299	1.245	1.852	3.401	5.17
	% des cellules inhibées	1.63	3.88	16.18	24.08	44.22	67.23
LBRE-LSAS	Perte de viabilité en log UFC/mL	0.112	0.569	1.466	2.234	4.205	6.338
	% des cellules inhibées	1.45	7.399	19.06	39.05	54.68	82.41

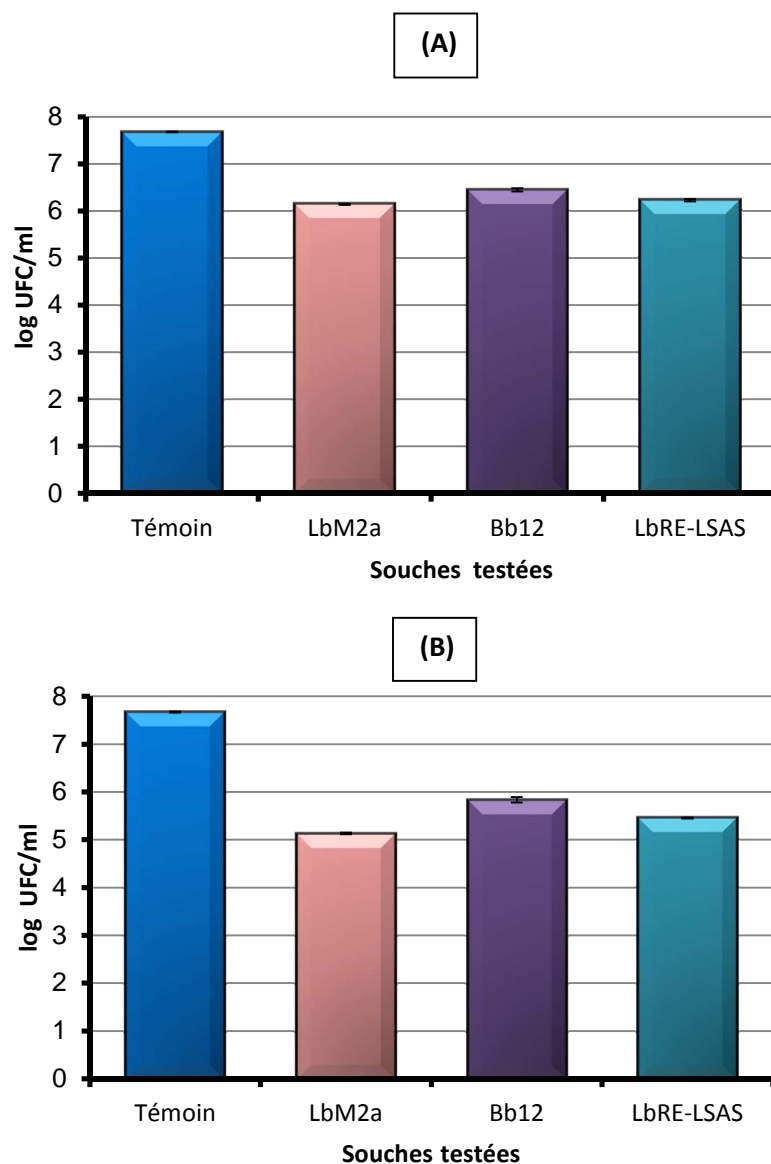


Figure 45: Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 6 h (A) et 8 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Staphylococcus aureus* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

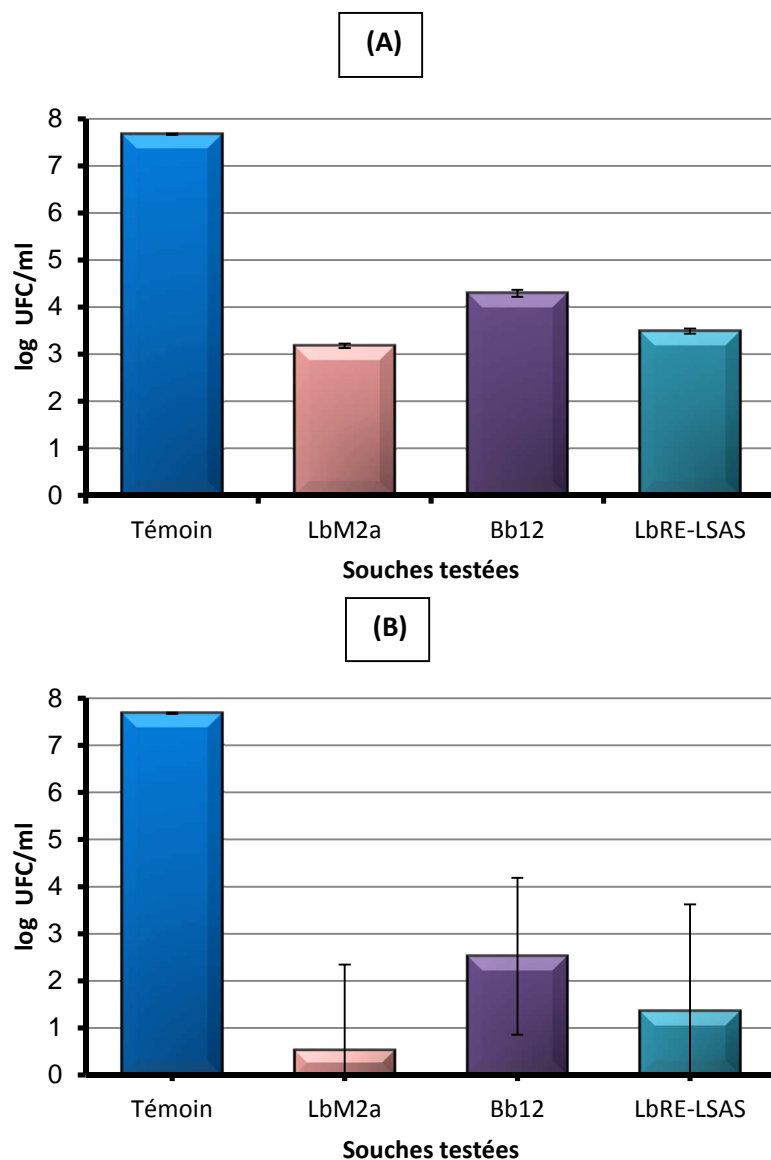


Figure 46: Viabilité des cellules de *Staphylococcus aureus* (log UFC/mL) soumises à l'antagonisme des différentes souches testées pendant 10 h (A) et 24 h (B) de coculture à 37 °C avec un rapport cellulaire souche testée / souche pathogène = 1/1. Témoin = culture pure de *Staphylococcus aureus* en absence de souches testées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

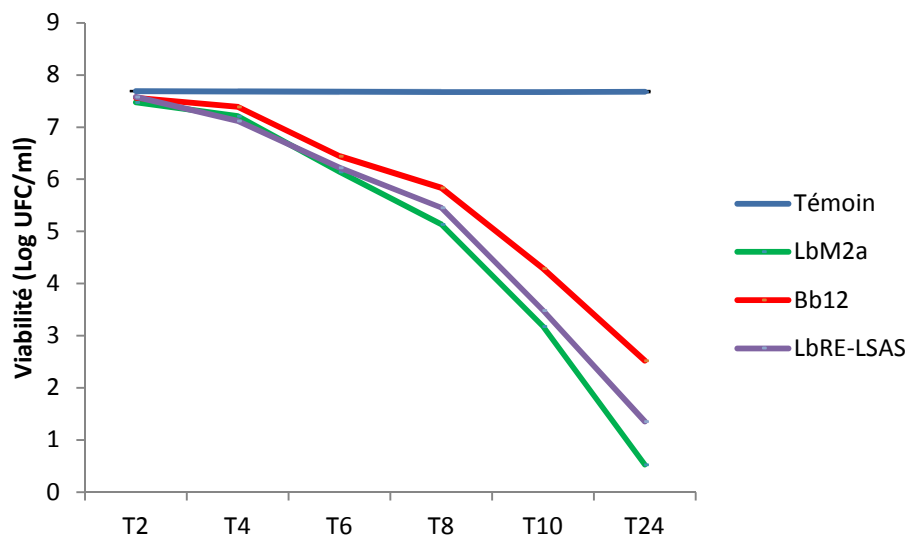


Figure 47 : Cinétique d'inhibition des cellules de *Staphylococcus aureus* (log UFC /mL) soumise à l'antagonisme des différentes souches testées / souche pathogène=1 /1. Témoign = culture pure de *Staphylococcus aureus* en absence de souches bénéfiques. Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations \pm SEM (n=3).

III.6. Fractions protéiques des surnageants bactériens à acidité neutralisée analysés par HPLC inverse

L'HPLC inverse a abouti à la révélation de deux chromatogrammes correspondant au fractionnement des substances des échantillons de surnageants bactériens à acidité neutralisée (SBAN) issus des cultures des souches LBRE-LSAS et LbM2a

Cette analyse HPLC a révélé l'existence d'un seul pic pour chaque SBAN, doté d'une activité antibactérienne et qui est situé entre la 4^{ème} et la 5^{ème} minute du début de la chromatographie (figures 48 et 49).

Plusieurs auteurs ont réalisé une purification par HPLC inverse des bactériocines à partir de surnageants actifs de bactéries lactiques, C'est le cas des travaux de [Hu et al. \(2013\)](#) qui ont identifié une nouvelle souche de lactobacille produisant une bactériocine, la plantaricine 163, qui a été purifiée par en utilisant l'HPLC en phase inverse.

Une bactériocine, issue de *Lactobacillus plantarum* 163, a été identifiée biochimiquement et caractérisé par séquençage de l'ADNr 16S. Cette souche produit une bactériocine, la plantaricine 163, qui a été purifiée par en utilisant la chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC).

[Song et al. \(2014\)](#) ont isolé une souche, *Lactobacillus plantarum* ZJ5, à partir de moutarde fermentée, avec une large gamme d'activité inhibitrice contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Ils ont pu isoler et identifier le peptide antibactérien qui est la plantaricine ZJ5 (PZJ5), et qui présente une extrême résistance et stabilité au pH et à la chaleur.

[Zergui et al. \(2015\)](#) ont également isolé une souche de *Lactobacillus plantarum* DU10 à partir de lait de chamelle. Cette souche sécrète une bactériocine qui a un large spectre d'activité antimicrobienne et qui a été purifiée par HPLC inverse.

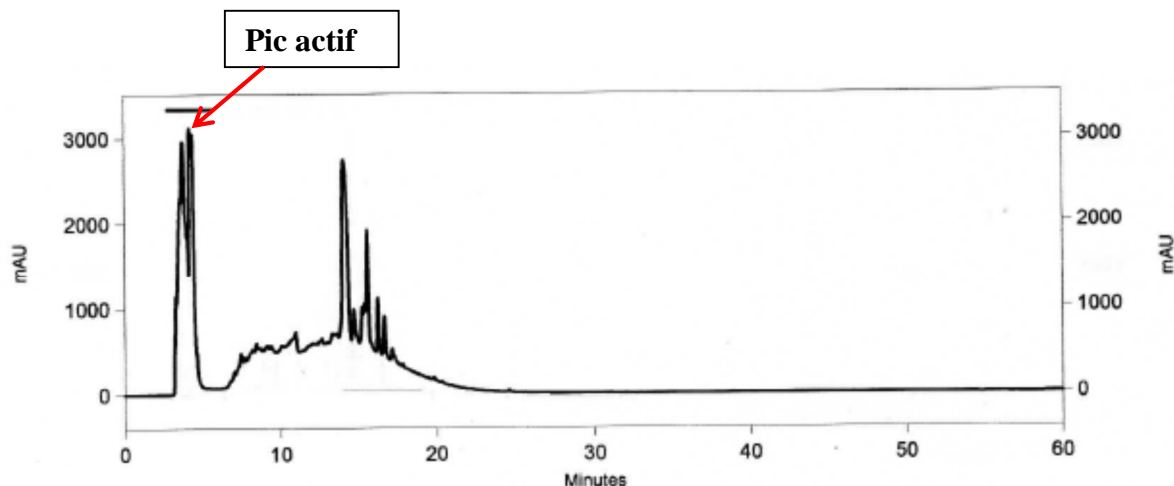


Figure 48 : Chromatogramme représentant les différentes fractions issues du surnageant bactérien à acidité neutralisée (SBAN) de la souche *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS cultivée sur milieu MRS après passage sur une colonne analytique de dimensions 250 x 4,6 mm (NUCLEOSIL 300-5 C18 HPLC) avec une porosité de 120 Å, pour une phase stationnaire de granulométrie de 5 µm. La phase mobile est composée de 2 solvants : un solvant A polaire (Eau-0,1% TFA) et un solvant B apolaire (ACN-0,1% TFA).

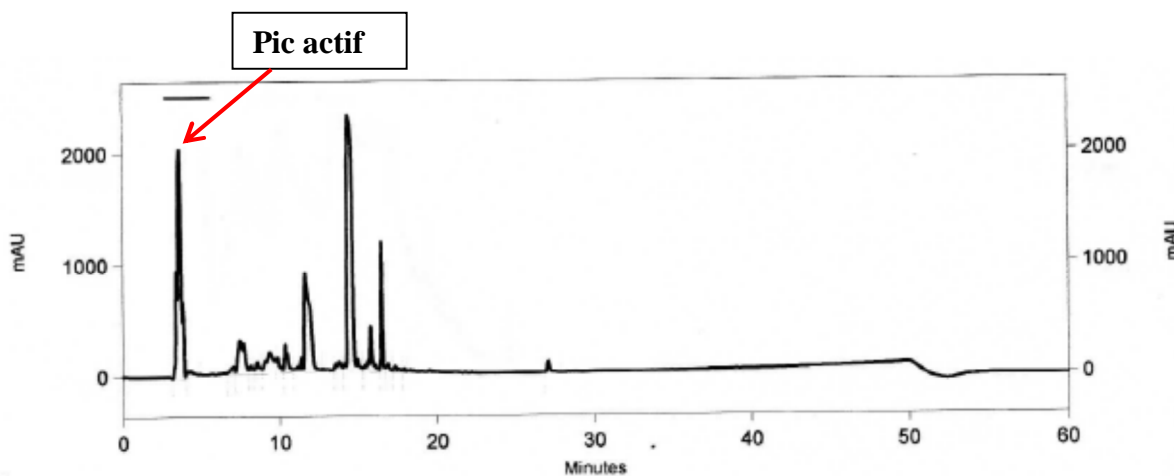


Figure 49 : Chromatogramme représentant les différentes fractions issues du surnageant bactérien à acidité neutralisée (SBAN) de la souche *Lactobacillus plantarum* Lbm2a cultivée sur milieu MRS après passage sur une colonne analytique de dimensions 250 x 4,6 mm (NUCLEOSIL 300-5 C18 HPLC) avec une porosité de 120 Å, pour une phase stationnaire de granulométrie de 5 µm. La phase mobile est composée de 2 solvants : un solvant A polaire (Eau-0,1% TFA) et un solvant B apolaire (ACN-0,1% TFA).

CONCLUSION

Conclusion

Au cours de ce travail nous avons pu isoler à partir des selles de nourrissons sains des souches lactiques ayant certaines propriétés probiotiques comme le pouvoir antagoniste vis-à-vis d'une gamme de bactéries pathogènes Gram positives et Gram négatives.

La première étape d'identification a consisté à caractériser les souches isolées, dont l'appartenance a été préalablement recherchée sur la base de critères morphologiques et biochimiques. C'est ainsi que le profil fermentaire de différents sucres a été déterminé. Après quoi, on a procédé à l'identification moléculaire visant à déterminer l'identité génétique de ces souches en réalisant une PCR (amplification en chaîne par polymérase). Les séquences obtenues sont ensuite comparées avec des séquences déposées dans des banques de données telles, par exemple, EMBL, NCBI, BiBi et Genbank.

Cet isolement a abouti à la sélection de deux souches appartenant au genre *Lactobacillus* : il s'agit de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *L. plantarum* LbM2a. Ces deux souches ont affiché une remarquable activité antagoniste avec des pourcentages de l'ordre de 99% de similarité après comparaison des séquences d'ADN avec la base Genbank.

Notre investigation à l'échelle moléculaire en utilisant des amorces spécifiques nous a permis de détecter et de caractériser génétiquement les gènes codant pour la plantaricine EF et K dans le génome de la souche *L. plantarum* LbM2a.

L'évaluation du pouvoir antibactérien des deux souches *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *L. plantarum* LbM2a a permis de montrer que l'action antagoniste de ces souches vis-à-vis certains pathogènes (*Staphylococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Shigella* et *Escherichia*) est exercée, non seulement, en présence des cellules de nos deux souches isolées, mais aussi en présence de leur surnageant (SBAN) de culture.

Les surnageants bactériens à acidité neutralisée (SBAN) issues des deux souches *L. rhamnosus* (LBRE-LSAS) et *L. plantarum* LbM2a ont conservé leur activité antimicrobienne dans une gamme de pH comprise entre 2 et 6. Néanmoins, cette activité a été fortement, pour ne pas dire complètement, inhibée par les enzymes protéolytiques.

Les deux surnageants (SBAN) se sont révélés thermorésistants après une exposition à des températures de l'ordre de 100 °C pendant 30 min ou de -80°C pendant 4 mois.

L'ensemble de ces résultats montrent tout l'intérêt que présentent ces souches isolées si elles venaient à exprimer d'autres propriétés probiotiques aussi importantes que l'antagonisme bactérien.

La stratégie la plus simple d'utilisation des bactériocines dans les produits alimentaires est l'inoculation des aliments avec la culture vivante de la souche productrice de bactériocine dans des conditions permettant la production *in situ* de bactériocines. Elle est économiquement la moins contraignante et moins coûteuse par rapport à l'application directe des bactériocines purifiées.

Au vu des résultats de cette expérience quant à l'isolement par HPLC inverse des fractions protéiques actives des SBAN de ces deux lactobacilles, ainsi que leur ultrafiltration ; il serait intéressant de déterminer leur séquence en acides aminés et d'en dégager les particularités liées à leur fonctionnalité.

Par ailleurs, étant donné que l'origine des souches isolées est le tube digestif, leurs performances *in vivo* devraient être étudiées dans le but d'explorer d'autres propriétés bénéfiques pour la santé de l'hôte pouvant les rapprocher du privilégié statut de « microorganismes probiotiques ».

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

-A-

1. **Abdel-Bar N, Harris ND and Rill RL (1987)**. Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Sci.* **52**: 411 – 415.
2. **Abee T (1995)**. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Let.* **129**: 1 – 10.
3. **Achemchem F. J., Abrini M., Martínez-Bueno E., Valdivia & Maqueda M, (2004)**. Purification et caractérisation d'une bactériocine anti-*Listeria* produite par *Enterococcus faecium* F-420 isolé à partir de lait cru de chèvre. *Congrès International de Biochimie*. Pp : 384-387.
4. **Ammor S., Tauveron G., Dufour E & Chevallier I (2005)**. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 2—Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. *Food control.* **17 (6)**: 462-468.
5. **Andersson R (1986)**. Inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Spheroplasts* of Gram-negative bacteria by antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. *Int J Food Microbiol*; **3**: 149 – 60.
6. **Atrih A., and Foster S J (2001)**. Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *J Appl Microbiol.* **91**: 364-372.

-B-

7. **Babasaki K., Takao T., Shimonishi Y and Kurahashi K (1985)**. Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J Biochem.* **98**: 585-603.
8. **Barbés C and Boris S (1999)**. Potential role of lactobacilli as prophylactic agents against genital pathogens. *AIDS Patient Care STDS.* **13**: 747-751.
9. **Barbosa M S., Todorov S D., Belguesmia Y., Choiset Y., Rabesona H., Ivanova I V., et al. (2014)**. Purification and characterization of the bacteriocin

produced by *Lactobacillus sakei* MBSa1 isolated from Brazilian salami. *J Appl Microbiol.* **116**: 1195-1208.

10. **Bauer R and Dicks L (2005)**. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **101**: 201-216.
11. **Bradley A (2002)**. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J.* **164**: 116-128.
12. **Broadbent J R., Chou Y C., Gillies K and Kondo J K (1989)**. Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. *J Dairy Sci.* **72**: 3342-3345.
13. **Busse H-J., Denner E B M and Lubitz W (1996)**. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J Biotechnol.* **47**: 3-38.

-C-

14. **Castellano P., Vignolo G., Farias R N., Arrondo J L & Chelin R (2007)**. Molecular view by fourier transform infrared spectroscopy of the relationship between lactocin 705 and membranes: speculations on antimicrobial mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* **73(2)**: 415-420.
15. **Chaalel A., Riazi A., Dubois-Dauphin R and Thonart P (2015)**. Screening of plantaricin EF and JK in an Algerian *Lactobacillus plantarum* isolate. *Asian Pac J Trop Dis.* **5(6)**: 474-482.
16. **Chatterjee S., Chatterjee D K., Jani R H., Blumbach J., Ganguli B N., Klesel N., Limbert M and Seibert G (1992)**. Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus in vitro* and *in vivo* antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)*. **45**: 839-845.
17. **Cheikhyoussef A., Pogori N., Chen H., Tian F., Chen W., Tang J & Zhang H, (2008)**. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602. *Food Control*, doi:10.1016/j.foodcont.2008.08.003.
18. **Cintas L M., Rodríguez J M., Fernandez M F., Sletten K., Nes I F., Hernandez PE & Holo H (1995)**. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl Environ Microbiol*; **61**:2643–2648.
19. **Cocconier M H., Lievin V., Hemery E & Servin A L (1998)**. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human

- Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl. and Environ. Microbiol.* **64 (11)**: 4573-4580.
20. **Collado M C., Gonzalez A., Gonzalez R., Hernandez M., Ferrus M A & Sanz Y (2005)**. Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrobial Agents.* **25**: 385–391.
21. **Corr S C., Li Y., Riedel C U., O'Toole P W., Hill C and Gahan C G (2007)**. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad Sci U S A.***104**: 7617-7621.
22. **Corsetti A., Gobbetti M., Rossi J and Damiani P (1998)**. Antimould activity of sourdoughlactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl Microbiol Biotechnol.***50**: 253-256.
23. **Cotter P D & Hill C (2003)**. Surviving the acid test: response of Gram-Positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67 (3)**: 429-453.
24. **Czuprynski C J., Faith N G and Steinberg H (2002)**. Ability of the *Listeria monocytogenes* strain Scott A to cause systemic infection in mice infected by the intragastric route. *Appl Environ Microbiol.***68**: 2893-2900.

-D-

25. **De Jong A., van Hijum S A F T., Bijlsma J J E., Kok J & Kuiper's O P (2006)**. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool *Nucleic Acids Research*, **Vol. 34**, Web Server issue W273–W279. doi:10.1093/nar/gkl237.
26. **De Lima E T & Fliho R L A (2005)**. Bacteriocins: Nomenclature, detection, mechanism of action and potential use in poultry production. *J. Food. Agric. Environ.* **3 (2)**:62-66.
27. **De Man J C., Rogosa M and Sharpe M E (1960)**. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. App. Bacteriol.* **23(1)**: 130-135.
28. **De Vuyst L & Leroy F (2007)**. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**:194–199.
29. **Deegan L H., Cotter P D and Hill C (2006)**. Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *Int Dairy J.* **16**: 1058-1071.

30. **Dicks L M T., Heunis D A., van Staden D A., Brand A., Sutyak Noll K and Chinkindas M L (2011).** Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In: Drider D., and Rebuffat S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Springer Verlag. Stellenbosch, South Africa.* pp 391-421.
31. **Diep D., Salehian Z., Holo H & Nes I F (2007).** Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 2384-2389.
32. **Diep D B., Straume D., Kjos M., Torres C and Nes I F (2009).** An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides.* **30**: 1562–1574.
33. **Dortu C and Thonart P (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : Caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environn.* **13(1)** : 143-154.
34. **Drider D., Fimland G., Héchard Y., Mc Mullen L M & Prévost H (2006).** The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiol. and Molec. Biology Reviews.* **70**: 564–582.
35. **Drider D and Prevost H (2009).** Bactéries lactiques, Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles, *Economica*, 593 p., chap. II (« Métabolisme des bactéries lactiques, les acides aminés, Véronique MONNET »).

-E-

36. **Eijsink V G., Skeie M., Middelhoven P H., Brurberg M B & Nes I F (1998).** Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3275-3281.
37. **El Demerdash H and Mostafa H (2008).** Antimicrobial Activity of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* Isolates. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology;* *Vol. 6 (2):* 9-14.
38. **El-Ziney M G., Uyttendaele M., Debevere J & Jakobsen M (1998).** Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Lett.* **20 (10):** 913-916.

39. **Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K & Ishizaki A (2000).** Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 85–106.

-F-

40. **Farge P (1998).** Données récentes sur l'étiopathogénie de la carie. *Archives de Pédiatrie.***5**:1140-1144.
41. **Fimland G., Johnsen L., Axelsson L., Brurberg M B., Nes I F., Eijsink V G H & Nissen-Meyer J (2000).** A C-Terminal Disulfide Bridge in Pediocin-Like Bacteriocins Renders Bacteriocin Activity Less Temperature Dependent and Is a Major Determinant of the Antimicrobial Spectrum. *J. Bacteriol.* **182**: 2643–2648.
42. **Fooks L J and Gibson G R (2002).** *In vitro* investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology.* **39**: 67-75.
43. **Forestier C., De Champs C., Vatoux C and Joly B (2001).** Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *In vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol.* **152**: 167–173.
44. **Frey L (1993).** Les bactériocines des bactéries lactiques. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **8 (4)**: 245-250.

-G-

45. **Gálvez A., Abriouel, H., Lopez R L and Ben Omar N (2007).** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol.***120**: 51-70.
46. **Gálvez A., Abriouel H., Ben Omar N and Lucas R (2011).** Food Applications and Regulation. In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp 253-390.
47. **Galvin M., Hill C and Ross R P (1999).** Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays *Lett. Appl. Microbiol.* **28**: 355-358.
48. **Goldstein B P., Wei J., Greenberg K and Novick R (1998).** Activity of nisin against *Streptococcus pneumoniae*, *in vitro*, and in a mouse infection model. *J Antimicrob Chemother.***42**: 277-278.

49. **Gomes D A., Souza A M L., Lopes R V., Nunes A C & Nicoli J R (2006).** Comparaison of antagonistic ability against enteropathogens by Gram positif and Gram negatif anaerobic dominents of human fecal microbiota. *Folia Microbiol.* **51 (2):** 141-145.
50. **Gomes A M P., Silva M L P C and Malcata F X (1998).** Caprine cheese with probiotic strains: the effects of ripening temperature and relative humidity on proteolysis and lipolysis. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und Forschung.* **207:** 386-394.
51. **Gong H S., Meng X C and Wang H (2010).** Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China. *Food Control;* **21:** 89–96.
52. **Gopal P K., Prasad J., Smart J and Gill H S (2001).** *In Vitro* Adherence Properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 Strains and Their Antagonistic Activity against an Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology.* **67:** 207-216.
53. **Gravesen A., Ramnath M., Rechinger K B., Andersen N., Jänsch L., Héchard Y., Hastings J W & Knochel S (2002).** High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *L. monocytogenes*. *Microbiology.* **148:** 2361- 2369.
54. **Guinane C M., Cotter P D., Lawton E M., Hill C & Ross P (2007).** Insertional mutagenesis to generate lantibiotic resistance in *Lc. lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73 (14):** 4677-4680.
55. **Gutierrez J., Criado R., Citti R., Martín M., Herranz C., Nes I., Cintas L and Hernández P (2005).** Cloning, production and functional expression of enterocin P a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol.* **103:** 239-25.
56. **Guyonnet D., Fremaux C., Cenatiempo Y & Berjeaud J M (2000).** Method for Rapid Purification of Class IIa Bacteriocins and Comparison of Their Activities. *Appl. Environ. Microbiol,* p. 1744–1748.
- H-**
57. **Hancock R E (2000).** Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs.***9:** 1723-1729.

58. **Harbarth S., Rutschmann O., Sudre P and Pittet D (1998).** Impact of methicillin resistance on the outcome of patients with bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med.***158**: 182-189.
59. **Hécharde Y., Pelletier C., Cenatiempo Y & Frère J (2001).** Analysis of sigma (54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII Man) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology.* **147**: 1575-1580.
60. **Heunis T D and Dicks L M (2010).** Nanofibers offer alternative ways to the treatment of skin infections. *J Biomed Biotechnol* doi:b10.1155/2010/510682.
61. **Höltzel A., Gänzle M G., Nicholson G J., Hammes W P and Jung G (2000).** The FirstLow Molecular Weight Antibiotic from Lactic Acid Bacteria: Reutericyclin, a NewTetramic Acid. *Angew Chem Int Ed Engl.* **39**: 2766-2768.
62. **Houlihan A J., Mantovani H C and Russell J B (2003).** Effect of pH on the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. *FEMS Microbiology Letters.* **231**: 27–32.
63. **Howell T H., Fiorellini J P., Blackburn P., Projan S J., de la Harpe J and Williams R C (1993).** The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. *J Clin Periodontol.***20**: 335-339.
64. **Hsiao C & Siebert K (1999).** Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **47(3)**, 189-201.
65. **Hu M., Zhao H., Zhang C., Yu J and Lu Z (2013).** Purification and characterization of plantaricin 163, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 163 isolated from traditional Chinese fermented vegetables. *J Agric Food Chem.* **61**: 11676-82.
66. **Hutt P., Shchepetova J., Loivukene K., Kullisaar T & Mikelsaar M, (2006).** Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *J. Appl. Microbiol.* **100**: 1324–1332.

-I-

67. **Ingham A., Ford M., Moore R J and Tizard M (2003).** The bacteriocin piscicolin 126 retains antilisterial activity *in vivo*. *J Antimicrob Chemother.* **51**: 1365-1371.

-J-

68. **Jack R W., Tagg J R & Ray B (1995)**. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *FEMS Microbiological*. **59**: 171-200.
69. **Jack R W., wan J., Gordon J., Harmark K., Davidson B E., Hillier A J., Wettenhall R E H., Hickey M W & Coventry M J (1996)**. Characterization of the Chemical and Antimicrobial Properties of Piscicolin 126, a Bacteriocin Produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 2897–2903.
70. **Jankovic I., Sybesma W., Phothirath P., Ananta E and Mercenier A (2010)**. Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Curr Opin Biotechnol*; **21**:175–181.
71. **Janssen M., Geeraerd A H., Cappuyns A., Garcia-Gonzalez L., Schockaert G., Houteghem N V., Vereecken K M., Debevere J., Devlieghere F & 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.* **73 (5)**:1601-1611.
72. **Johnsen L., Fimland G., Mantzilas D & Nissen-Meyer J (2004)**. Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* **70 (5)**: 2647-2652.

-K-

73. **Kandler O and Weiss N (1986)**. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212 AL. *In: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G. (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol 2, Baltimore, Williams & Wilkins , p. 1209-1234.
74. **Kellner R., Jung G., Horner T., Zahner H., Schnell N., Entian K. D and Gotz F (1988)**. Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. *Eur J Biochem.* **177**: 53-59.
75. **Kılıç G B., Kuleaşan H., Sömer V F and Akpınar D (2013)**. Determining potential probiotic properties of human originated *Lactobacillus plantarum* strains. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **18 (3)**: 479-485.

76. **Klaenhammer T R (1988)**. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. **70**: 337–349.
77. **Klaenhammer T R (1993)**. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**:39–86.
78. **Klaenhammer T R (1994)**. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques. in << Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques >> DE ROISSART H., LUQUET F. M. Editeurs *Lorica. Uriage*. 245-280.
79. **Knoetze H., Todorov S D and Dicks L M. (2008)**. A class IIa peptide from *Enterococcus mundtii* inhibits bacteria associated with otitis media. *Int J Antimicrob Agents*.**31**: 228-234.
80. **Kobilinsky A., Nazer A I & Dubois-Brissonnet F (2007)**. Modeling the inhibition of *Salmonella* Typhimurium growth by combination of food antimicrobials. *Int. J. Food Microbiol.* **115**: 95-109.
81. **Kouakou P., Dortu C., Dubois-Dauphin R., Vandenbol M & Philippe Thonart (2010)**. Plasmid-associated bacteriocin production by *Lactobacillus* LMG21688 suppresses *Listeria monocytogenes* growth rebound in a food system. *FEMS Microbiol Lett.* **306**: 37–44.
82. **Kramer N E., Van Hijum S A., Knol J., Kok J & Kuipers O P (2006)**. Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lc. lactis* acquires nisin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50 (5)**: 1753-1761.
83. **Kruszewska D., Sahl H G., Bierbaum G., Pag U., Hynes S O and Ljungh A (2004)**. Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. *J Antimicrob Chemother.***54**: 648-653.
84. **Kullen M J., Sanzky-Dawes R B., Crowell D C and Klaenhammer T R (2000)**. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Journal of Applied Microbiology.* **89**: 511–516.

-L-

85. **Larpent J P and Larpent-Gourgaud M (1997)**. Mémento technique de microbiologie : micro-organismes eucaryotes et procaryotes, structure, métabolisme, systématique, applications industrielles, milieux de culture et réactifs. *Tec & Doc Lavoisier*, 1039 pages.

86. **Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A and Gobbetti M (2000).** Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol.***66**: 4084-4090.
87. **Lee Y K., Puong K Y., Ouwehand A C and Salminen S (2003).** Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J Med Microbiol.* **52**: 925–930.
88. **Lengkey H A W., Balia R L., Togoe I., Tasbac B A and Ludong M (2009).** Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw poultry meat. *Biotechnol Anim Husb.* **25**: 1071-1077.
89. **Lewus C B., Kaiser A & Montville T J (1991).** Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **57(6)**: 1683-1688.
90. **Li J., Aroutcheva A A., Faro S., Chikindas M L (2005).** Mode of action of lactocin 160, a bacteriocin from vaginal *Lactobacillus rhamnosus*. *Infect Dis Obstet Gynecol.* **13**:135–140.
91. **Lievin V., Peiffer I., Hudault S., Rochar F., Neeser J R & Servin A (2000).** *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut.* **47**: 646-652.
92. **Liu S-Q (2003).** Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Inter. J. of Food Microbiol.* **83**: 115– 131.

-M-

93. **Maggi L., Mastromarino P., Macchia S., Brigidi P., Pirovano F., Matteuzzi D and Conte U (2000).** Technological and biological evaluation of tablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration. *Eur J Pharm Biopharm.***50**: 389-395.
94. **Maria Jose N., Bunt C R and Hussain M A (2015).** Comparison of Microbiological and Probiotic Characteristics of Lactobacilli Isolates from Dairy Food Products and Animal Rumen Contents. *Microorganisms.* **3**: 198-212.
95. **Marroki A., Zúñiga M., Kihal M and Gaspar P M (2011).** Characterization of *Lactobacillus* from Algerian goat's milk based on phenotypic, 16S rDNA

- sequencing and their technological properties. *Brazilian Journal of Microbiology*. **42**: 158-171.
96. **Mataragas M., Drosinos E H & Metaxopoulos J (2003)**. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2°C. *Food Microbiol.* **20**: 259–265.
97. **Mc Auliffe O., ROSS R P & Hill C (2001)**. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 285-308.
98. **McLeod A., Nyquistb O L., Snipen L, Naterstada K and Axelssona L (2008)**. Diversity of *Lactobacillus sakei* strains Investigated by phenotypic and genotypic methods. *Systematic and Applied Microbiology*. **31**:393-403.
99. **Mills S., Serrano L M., Griffin C., O'Connor P M, Schaad G., Bruining C., Hill C., Ross R P and Meijer W C (2011)**. Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. *Microbial Cell Factories*. **10** (Suppl 1): S7.
100. **Mobarez A. M., Hosseini Doust R., Sattari M & N Manthegi, (2008)**. Antimicrobial effects of bacteriocin like substance produced by *L. acidophilus* from traditional yoghurt on *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *J. Biological sci.* **8** (1): (221-224).
101. **Mojgani N, Sabiri G, Ashtiani M and Torshizi M (2009)**. Characterization of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus brevis* NM 24 and *L. fermentum* NM 332 Isolated from Green Olives in Iran. *The Internet Journal of Microbiology*. **6** (2).
102. **Montville T J and Kaiser A L (1993)**. Antimicrobial proteins: classification nomenclature, diversity and relationship to bacteriocin, pp: 1-22 in Bacteriocins of lactic acid bacteria. Hoover D.G and Steenson, L R. Ed. *Academic press, New York*.
103. **Moorthy G., Murali M R & Devaraj S N (2007)**. Protective role of lactobacilli in *Shigella dysenteriae* 1–induced diarrhea in rats. *Nutrition*. **23**: 424–433.
104. **Moorthy G., Murali M R & Devaraj S N (2009)**. Lactobacilli facilitate maintenance of intestinal membrane integrity during *Shigella dysenteriae* 1 infection in rats. *Nutrition*. **25**: 350–358.

105. **Moretro T., Aasen I M., Storro I & Axelsson L (2000).** Production of sakacin P by *Lb. sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbol.* **88 (3):** 536-545.
106. **Morgan S M., O'Connor P M., Cotter P D., Ross R P & Hill C (2005).** Sequential actions of the two component peptides of the lantibiotic lactacin 3147 explain its antimicrobial activity at nanomolar concentration. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49 (7):** 2606-2611.
107. **Moroni O., Kheadr E., Boutin Y., Lacroix C & Fliss I (2006).** Inactivation of adhesion and invasion of food-borne *Listeria monocytogenes* by bacteriocin producing *Bifidobacterium* strains of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **72 (11):** 6894-6901.
108. **Mota-Meira M., LaPointe G., Lacroix C and Lavoie M C (2000).** MICs of mutacin BNy266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* **44:** 24-29.
109. **Muriana P M & Klaenhammer T R (1991).** Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus spp.* *J. Bacteriol.* **173:** 1779-1788.
- N-
110. **Naghmouchi K., Kheadr E., Lacroix C & Fliss I (2007).** Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* **24:** 718-727.
111. **Nair L S and Laurencin C T (2007).** Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polymer Sci.* **32:** 762-798.
112. **Nettles C G and Barefoot S F (1993).** Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* **56:** 338-356.
113. **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.
114. **Niu W W and Neu H C (1991).** Activity of mersacidin, a novel peptide, compared with that of vancomycin, teicoplanin, and daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* **35:** 998-1000.

115. **Nomoto K (2005)**. Prevention of infections by probiotics. *J Biosci Bioeng*.**100**: 583-592.

-O-

116. **Ogunbanwo S T., Sanni A I and Onilude A A (2003)**. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*. **2 (8)**, pp. 219-227.
117. **Oppegard C., Rogne P., Emanuelsen L., Kristiansen P E., Fimland G & Nissen-Meyer J (2007)**. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13 (4)**: 210-219.
118. **O'Riordan J L & Fitzgerald F (1998)**. Antisense inhibition of vitamin D receptor expression induces apoptosis in monoblastoid U937 cells. *J. Immunol.* **156**: 4391-4395.

-P-

119. **Papagianni M (2003)**. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Advances*. **21**: 465–499.
120. **Patton G C & Van Der Donk W A (2005)**. New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 543-551.
121. **PREMA P (2013)**. *In vitro* antagonistic activity of a probiotic *Lactobacillus plantarum* against water borne pathogens. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **5**: Issue 4.

-R-

122. **Reddy G C., Shahani KM., Friend B A and Chandan R C (1984)**. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and bulgaricus, production and partial purification of Bulgaricus cultured. *J. Dairy Products*. **8**: 15 – 19.
123. **Reid G and Bruce A W (2001)**. Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis*.**183** Suppl **1**: S77-80.
124. **Riazi S., Dover S., Turovskiy Y and Chikindas M L (2007)**. Commercial ampholytes used for isoelectric focusing may interfere with bioactivity based purification of antimicrobial peptides. *J Microbiol Methods*. **71**:87–89.

125. **Riazi S., Wirawan R E., Badmaev V and Chikindas M L (2009).** Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050. *J appl Microbiol.* **106**: 1370–1377.
126. **Richard C., Cangon R., Naghmouchi K., Bertrand D., Prévost H & Drider D (2006).** Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.* **23**: 175–183.
127. **Riffon R., Sayasith K., Khalil H., Dubreuil P., Drolet M and Lagace J (2001).** Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol.* **39**: 2584-2589.
128. **Rihakova J., Cappelletti J M., Hue I., Demnerova K., Federighi M., Prévost H and Drider D (2010).** *In vivo* activities of recombinant divercin V41 and its structural variants against *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**: 563-564.
129. **Robertson A., Tirado C., Lobstein T., Jermini M., Knai C., Jensen J H., Ferro-Luzzi A and James W P (2004).** Food and health in Europe: a new basis for action. *WHO Reg Publ Eur Ser*: i-xvi, 1-385, back cover.
130. **Rojo-Bezares B., Yolanda S., Navarro L., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F and Torres C (2007).** Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiology*; **24**: 482–491.
131. **Roland P S and Stroman D W (2002).** Microbiology of acute otitis externa. *Laryngoscope.* **112**: 1166-1177.
132. **Ross P R., Morgan S and Hill C (2002).** Preservation and fermentation: Past, Present and Future. *International Journal of Food Microbiology.* **78**:3-16.
133. **Ross P R., Desmond C., Fitzgerald G F & Stanton C (2005).** Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology.* **98**: 1410-1417.

-S-

134. **Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J & Mattila -Sandholm T., (2000).** Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *J. Bacteriol.* **84**: 197-215.

135. **Salmaso S., Elvassore N., Bertucco A., Lante A and Caliceti P (2004).** Nisin-loaded poly-L-lactide nano-particles produced by CO₂ anti-solvent precipitation for sustained antimicrobial activity. *Int J Pharm.***287**: 163-173.
136. **Sankar N R., Priyanka V D., Reddy P S., Rajanikanth P., Kumar V K., Indira M., et al. (2012).** Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* Isolated from cow milk. *Int J Microbiol Res.* **3(2)**: 133-137.
137. **Sarika A R., Lipton A P and Aishwarya M S (2010).** Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. *Advance. J. Food Sci. Technol.* **2 (5)**: 291-297.
138. **Sass P., Jansen A., Szekat C., Sass V., Sahl H G and Bierbaum G (2008).** The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.***8**: 186.
139. **Schöbitz R., Suazo V., Costa M and Ciampi L (2003).** Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.***84**: 237-244.
140. **Segal N., Givon-Lavi N., Leibovitz E., Yagupsky P., Leiberman A and Dagan R (2005).** Acute otitis media caused by *Streptococcus pyogenes* in children. *Clin Infect Dis.***41**: 35-41.
141. **Settanni L and Corsetti A (2008).** Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int J Food Microbiol.* **121** : 123-138.
142. **Sharpe M E (1979).** Identification of the lactic acid bacteria. In: Identification Methods for Microbiologists. In: Skinner, F. A. and D. W. (Eds). pp. 233-259. *London: Academic Press.*
143. **Shuhaimi M., Yazid A M., Ali A M., Ghazali M H., Zaitun H and Atiqah N A (1999).** Antibacterial activity, antimicrobial susceptibility and adherence properties of *Bifidobacterium infantis* G4. *J. Biol. Sci.* **2**: 1231-1235.
144. **Song D F., Zhu M Y and Gu Q (2014).** Purification and Characterization of Plantaricin ZJ5, a New Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. *PLoS ONE.* **9 (8)**: e105549.

145. **Stiles M E (1997)**. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* **179 (19)**, 616-6171.
146. **Strus M., Gosiewski T., Kochan P & Heczko P B (2006)**. The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. *FEMS Immuno. Medical Microbiol.* **48**: 56-63.
147. **Sutyak K E., Wirawan R E., Aroutcheva A A and Chikindas M L (2008a)**. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Appl Microbiol.***104**: 1067-1074.
148. **Sutyak K E., Robert A., Anderson., Sara E., Dover., Kenneth A., Feathergill., Alla A., Aroutcheva., Sebastian Faro and Chikindas M L(2008b)**. Spermicidal Activity of the Safe Natural Antimicrobial Peptide Subtilisin. *Hindawi Publishing Corporation, Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. Volume 2008, Article ID 540758, 6 pages. doi:10.1155/2008/540758.*

-T-

149. **Tagg J R (2004)**. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian J Med Res.***119 Suppl**: 13-16.
150. **Tagg J R., Dajani A S and Wannamaker L W (1976)**. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev*; **40 (3)**:722–756.
151. **Taylor G D., Kibsey P., Kirkland T., Burroughs E and Tredget E (1992)**. Predominance of staphylococcal organisms in infections occurring in a burns intensive care unit. *Burns.***18**: 332-335.
152. **Ten Brink B., Minekus M., Vander Vossen JMBM., Leer R J and Huis J H J (1994)**. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimisation of production of acidocin B., a novel bacteriocin produced by *L. acidophilus* M46. *J Appl Bacteriol.* **77**:140-148.
153. **Tiihonen K., Ouwehand A C and Rautonen N (2010)**. Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Res Rev.* **9**:107–116.
154. **Todorov S., Onno B., Sorokine O., Chobert J M., Ivanova I & Dousset X (1999)**. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced

by *Lactobacillus plantarum* ST31 isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*. **48**: 167–177.

155. **Todorov S D & Dicks L M T (2005)**. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technol.* **36**: 318–326.
156. **Topisirovic L., Kojic M., Fira D., Golic N., Strahinic I & Lozo J (2006)**. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **112**: 230–235.

-V-

157. **Vadyvaloo V., Hastings J W., van der Merwe M J & Rautenbach M (2002)**. Membranes of class IIa Bacteriocin-resistant *L. monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Appl. Environ. Microbiol.* **68 (11)**: 5223-5230.
158. **Vadyvaloo V., Snoep J L., Hasting J W and Rautenbach M (2004)**. Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *L. monocytogenes* strains. *Microbiology.* **150**: 335-340.
159. **Ventura M., Elli M., Reniero R and Zink R (2001)**. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Ecol.* **36**: 113-121.
160. **Vollenweider S & Lacroix C (2004)**. 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.* **64**: 16-27.

-W-

161. **Wiedemann C I., Bottiger T., Bonelli R R., Schneider T., Sahl H-G & Martýnez B (2006a)**. Lipid II-Based. Antimicrobial Activity of the Lantibiotic Plantaricin. *Appl. Environ. Microbiol.* **72 (4)**: 2809–2814.
162. **Wiedemann I., Böttiger T., Bonelli R R., Wiese A., Hagge S O., Gutschmann T., Seydel U., Deegan L., Hill C., Ross P & Sahl H G (2006b)**. The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147 - a complex mechanism involving specific

interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Mol. Microbiol.* **61(2)**: 285-296.

163. **Wirawan R E., Swanson K M., Kleffmann T and Jack R W and Tagg J R (2007).** Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology.* **153**:1619–1630.

-Y-

164. **Yang R., Johnson M C & Ray B (1992).** Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58 (10)**: 3355-3359.

-Z-

165. **Zacharof MP and Lovitt RW (2012).** Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia.* **2**: 50-6.
166. **Zalan Z., Barath A & Halasz A (2005).** Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technol. Biotech.* **43 (3)**: 219-225.
167. **Zergui A., Saidi N, Arul V., Bessaiah H., Benmalek Y., Bouayad L and Kihal M (2015).** Purification and Molecular Characterization of Two-Antimicrobial Peptides Produced by *Lactobacillus plantarum* DU10. *International Journal of Biological Chemistry.* **9**: 46-58.

PUBLICATION