



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Option : Microbiologie**

**THESE  
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
DOCTORAT EN SCIENCES**

**Par  
Mme MENAD Najett**

**THEME**

**Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de *Salmonella* sp**

**Soutenue publiquement le : 22/11/2017**

**Membres de jury :**

Benakriche Belmehel	Professeur	Univ Mostaganem	Président
Bensoltane Ahmed	Professeur	Univ Ahmed Ben Bella-Oran	Examineur
Bekada Ahmed M.A.	Professeur	C. U. Tissemsilet	Examineur
Hadadji Miloud	Professeur	Univ Ahmed Ben Bella-Oran	Examineur
Chougrani Fadela	Professeur	Univ Mostaganem	Examinatrice
Cheriguene Abderrahim	Professeur	Univ Mostaganem	Rapporteur

**Année universitaire 2017-2018**

## REMERCIEMENTS

Au nom de dieu clément et miséricordieux, grâce lui est faite pour avoir permis à notre peuple de recouvrir son existence à travers les nations et nous avoir guidé de l'obscur vers la luminescence.

Certes, le développement exige à la fois la récupération des richesses naturelles, leur valorisation, l'établissement de bases industrielles et le relèvement des niveaux de formation, cette épargne collective implique des efforts et des sacrifices de chacun de nous.

Tous d'abord je remercie DIEU de m'avoir donnée la force et le courage de terminer mes études.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de recherche de la Microbiologie et Biologie Végétale sous la direction de Monsieur CHERIGUENE A., je ne saurais taire les qualités humaines et pédagogiques, ni surtout l'immense compétence scientifique. La quintessence de mes remerciements ne sera jamais que fadeur à la fierté que j'éprouve d'avoir pu travaillé dans son équipe.

Que Madame CHOUGRANI F. Professeur à l'université de Mostaganem, soit assuré de ma profonde reconnaissance pour l'honneur qu'il me fait d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Que Monsieur BENSOLTANE A., Monsieur HADADJI M.; Professeur à l'université d'Es Sénia-Oran et Monsieur BEKADA Ahmed M.A. professeur au centre universitaire de Tissemsilet trouvent ici mes sincères remerciements pour m'avoir acceptés d'être examinés ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur BENAKRICHE B. professeur à l'université de Mostaganem pour l'honneur qu'il me fait accepter de présider le jurer de ce travail.

A tous, merci du fond du cœur

# SOMMAIRE

Remerciement

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

ملخص

Abstract

Introduction..... 1

## Chapitre I

### Les bactéries lactiques

1. Les bactéries lactiques.....	3
2. Habitat et origine des bactéries lactiques.....	3
3. Taxonomie des bactéries lactiques.....	3
4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques.....	4
4.1. Le genre <i>Lactobacillus</i> .....	4
4.2. Le genre <i>Lactococcus</i> .....	5
4.3. Le genre <i>Leuconostoc</i> .....	6
4.4. Le genre <i>Streptococcus</i> .....	6
4.5. Le genre <i>Vagococcus</i> .....	7
4.6. Le genre <i>Enterococcus</i> .....	8
4.7. Le genre <i>Aeorococcus</i> , <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i> .....	8
4.7.1. <i>Pediococcus</i> .....	8
4.7.2. <i>Tetragenococcus</i> .....	9
4.7.3. <i>Weissella</i> .....	9
5. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques.....	10
5.1. Le pH et les acides organiques.....	10
5.2. Le peroxyde d'hydrogène.....	11
5.3. Le dioxyde de carbone.....	11
5.4. Le diacétyl.....	11
5.5. La reutérine.....	11
5.6. Les bactériocines.....	12
6. Utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocine.....	12

## Chapitre II

### Les bactériocines

1. Historique.....	14
2. Définition.....	14
3. Classification.....	14
3.1. Classe I : Les lantibiotiques.....	15
3.2. Classe II.....	15
3.2.1. La sous-classe Iia.....	15
3.2.2. La sous-classe IIb.....	16
3.2.3. La sous-classe IIc.....	16
3.3. Classe III.....	16
3.4. Classe IV.....	17
4. Mécanisme d'action des bactériocines.....	17
4.1. Mode d'action des bactériocines de classe I.....	17
4.2. Mode d'action des bactériocines de classe II.....	18

4.3. Mode d'action des bactériocines de classe III.....	23
5. La production des bactériocines.....	23
6. Le conditionnement des bactériocines.....	23
7. Domaines d'application des bactériocines.....	24
7.1. Le typage bactérien.....	24
7.2. Application de la bactériocine dans le secteur alimentaire.....	24
7.3. Domaines de la médecine humaine et vétérinaire.....	25
7.4. Domaine agricole.....	26
8. Les bactéries productrices de bactériocines.....	26

### **Chapitre III** ***Salmonella* sp**

1. Introduction.....	28
2. Les infections digestives d'origine bactériennes.....	29
2.1. Définition.....	29
2.2. Les différentes infections d'origine bactérienne.....	31
2.2.1. Salmonellose.....	31
2.2.2. La gastro-entérite aigue.....	31
2.2.2.1. Définition.....	31
2.2.2.2. Classification.....	32
2.2.2.3. Mode de contamination.....	33
a. La contamination interhumaine.....	33
b. La contamination par les aliments.....	33
c. Animaux familiers.....	34
2.2.2.4. Le développement de la maladie.....	34
a. Phase de l'adhésion des salmonelles.....	34
b. Invasion des entérocytes.....	34
c. Dissémination systémique.....	34
d. Genèse des signes cliniques.....	35

### **Chapitre IV** **Matériel et Méthodes**

<b>Objectif</b> .....	37
1. Isolement et identification des souches utilisées.....	37
1.1. Les bactéries lactiques (productrices).....	37
1.1.1. Origine des échantillons utilisés.....	37
1.1.2. Isolement des souches lactiques.....	38
1.1.3. Identification des souches lactiques.....	39
1.1.3.1. Identification phénotypiques.....	39
1.1.3.2. Identification biochimique et physiologique.....	39
1.1.3.2.1. Tests physiologiques.....	39
a. Croissance à différentes températures.....	39
b. Culture sur milieux hostiles.....	39
c. Culture sur milieu alcalin.....	40
1.1.3.2.2. La croissance sur le lait «bleu de Sherman».....	40
1.1.3.2.3. Tests biochimiques.....	40
a. Etude de l'hydrolyse d'esculine.....	40
b. Production d'Acétoïne.....	40
c. Etude du métabolisme azoté (ADH).....	40
d. Etude du profil fermentaire.....	41

e. Le caractère homo ou hétérofermentaire.....	41
1.2. La souche pathogène (indicatrice).....	42
1.2.1. Origine de la souche utilisée.....	42
1.2.2. Identification phénotypique, biochimique et physiologique.....	42
2. La conservation des souches.....	43
3. Effet antibactérien des bactéries lactiques.....	43
3.1. Test <i>in vivo</i> .....	43
3.1.1. Etude de la survie des souches lactiques dans les conditions extrêmes du tube digestif.....	43
3.1.1.1. Effet des sels biliaires et pH.....	43
3.1.1.2. Effet de l'enzyme pepsine.....	43
3.1.1.3. Adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial.....	44
3.1.1.4. Test d'hydrophobicité.....	44
3.1.2. Antibiogramme.....	45
3.1.3. Réalisation du test.....	45
3.1.3.1. La mise en lots des animaux.....	46
3.1.3.2. La préparation des souches et leurs milieux de dénombrement....	47
3.1.3.3. Le dénombrement de <i>Salmonella</i> sp et les souches lactiques utilisées.....	47
3.2. Test <i>in vitro</i> .....	48
3.2.1. Test d'activité sur milieu solide, méthode de diffusion en puits.....	48
3.2.1.1. Méthode directe.....	48
3.2.1.2. Méthode indirecte.....	49
a. Préparation de pré-culture de la bactérie test (pathogène).....	49
b. Préparation du surnageant actif.....	49
c. Réalisation du test.....	50
3.2.2. Caractérisation de l'agent inhibiteur.....	50
3.2.2.1. Effet des enzymes protéolytiques.....	50
a. Préparation des enzymes.....	51
b. Technique.....	51
3.2.2.2. Effet de la température.....	51
3.2.2.3. Effet du pH et sels biliaires.....	52
4. Extraction et purification partielle des peptides bioactifs.....	52
4.1. Méthodes Adsorption-Désorption.....	52
4.2. Méthode de précipitation au sulfate d'ammonium.....	54
5. Effet inhibiteur des extraits trouvés par les deux méthodes d'extraction.....	55
6. La cinétique de croissance de <i>Salmonella</i> sp.....	55
6.1. En culture pure.....	55
6.2. En culture mixte.....	56
7. Caractérisation des peptides bioactifs.....	56
7.1. Spectroscopie UV-visible.....	56
7.2. Analyse par HPLC.....	56
7.3. Analyse par Infra-rouge.....	57
8. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	57
9. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	57

## Chapitre V

### Résultats

#### Partie 1

1. Résultats de l'isolement des souches utilisées.....	58
--	----

1.1. Les souches lactiques.....	58
1.2. La souche pathogène.....	64
2. Etude de la survie des souches lactiques dans les conditions extrême du tube digestif.....	65
2.1. Effet des sels biliaires pendant 0, 2, 4 et 24 heures.....	66
2.2. Effets de l'enzyme Pepsine.....	66
2.3. Adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial.....	67
2.4. Test d'hydrophobicité.....	68
3. Antibiogramme.....	68
4. Test <i>in vivo</i> .....	69
4.1. Le dénombrement de BAL aux jours 0, 4 et 7.....	69
4.2. Confirmation de l'axénie des souris utilisées.....	70
4.3. Dénombrement aux jours 4, 7 et 10.....	71
5. Effet inhibiteur des isolats.....	72
6. Caractérisation de l'agent inhibiteur.....	74
7. Caractérisation chimique de l'agent inhibiteur.....	75
7.1. Effet des enzymes protéolytiques.....	75
7.2. Effet de la température.....	76
7.3. Effet du pH et sels biliaires.....	77

## **Partie 2**

8. Résultat de l'effet des extraits.....	78
9. Résultat de l'étude de la cinétique de croissance des souches utilisées en culture pure.....	79
10. Résultat de la croissance de <i>Salmonella</i> sp en culture mixte.....	81
10.1. En présence de l'extrait lactique obtenu par la méthode d'adsorption-désorption.....	81
10.2. En présence de l'extrait lactique obtenu par la méthode précipitation au sulfate d'ammonium.....	84
11. Résultat de la caractérisation de la substance inhibitrice.....	86
11.1. Test UV-Visible.....	86
11.2. Test HPLC.....	87
11.3. Test Infrarouge.....	99
12. Résultat de la détermination des concentrations minimales inhibitrices des peptides bioactifs.....	103
13. Résultat du CMB.....	105

## **Chapitre VI**

<b>Discussion</b> .....	107
-------------------------	-----

<b>Conclusion</b> .....	127
<b>Références bibliographiques</b> .....	129
<b>Annexe</b> .....	165

## ABREVIATIONS

<b>ACN:</b> Acétonitrile	<b>FAO:</b> Food and Agriculture Organization	<b>NADH:</b> Nicotinamide adenine dinucléotide
<b>ADH:</b> Arginine Dihydrolase	<b>FDA:</b> Food and Drug Administration	<b>NaOH:</b> Hydroxyde de sodium
<b>ADN:</b> Acide désoxyribonucléique	<b>fru:</b> Fructose	<b>ND:</b> N'est pas déterminé
<b>ADNr:</b> ADN ribosomal	<b>g:</b> Gramme	<b>Pe.:</b> <i>Pediococcus</i>
<b>ADP:</b> Adenosine 5' - diphosphate	<b>G:</b> Temps de génération	<b>O<sub>2</sub>:</b> Oxygène
<b>amd:</b> Amidon	<b>G+C:</b> Guanine + Cytosine	<b>OMS:</b> Organisation mondiale de la santé
<b>AMY:</b> Amygdaline	<b>gal:</b> Galactose	<b>P:</b> Phosphate
<b>API:</b> Analytical profile index	<b>glu:</b> Glucose	<b>pH:</b> Potentiel d'Hydrogène
<b>ara:</b> Arabinose	<b>h:</b> Heur	<b>S.:</b> <i>Salmonella</i>
<b>ARNr:</b> Acide Ribonucléique Ribosomique	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> Eau oxygénée	<b>Sp.:</b> <i>Streptococcus</i>
<b>ATCC:</b> American type of culture collection	<b>HCl:</b> Chlorure d'hydrogène	<b>sp:</b> Espèce non précisée
<b>ATP:</b> Adenosine 5' - triphosphate	<b>INO:</b> Inositol	<b>ssp:</b> Sous espèce
<b>Aw:</b> Activité de l'eau	<b>Lb.:</b> <i>Lactobacillus</i>	<b>subsp:</b> Sous sous espèce
<b>BCP:</b> Bromocresol pourpre	<b>Lc.:</b> <i>Lactococcus</i>	<b>TFA:</b> Acide trifluoroacétique
<b>BN:</b> Bouillon nutritif	<b>Ln.:</b> <i>Leuconostoc</i>	<b>Te.:</b> <i>Tetragenococcus</i>
<b>Cl.:</b> <i>Clostridium</i>	<b>mg:</b> Milligramme	<b>TFA:</b> Acide trifluoroacétique
<b>cm:</b> Centimètre	<b>min:</b> Minute	<b>tr:</b> Tour
<b>CMI:</b> Concentration minimale inhibitrice	<b>ml:</b> Millilitre	<b>tris:</b> Trishydroxy-méthyl-amino-méthane
<b>CO<sub>2</sub>:</b> Dioxyde de carbone	<b>mM:</b> Milli-molaire	<b>UFC:</b> Unité formant colonies
<b>Da:</b> Dalton	<b>mnt:</b> Mannitol	<b>°C:</b> Degré Celsius
<b>DO:</b> Densité optique	<b>MRS:</b> Milieu de Man-Rogosa et Sharp	<b>UV:</b> Ultra violet
<b>EMP:</b> Embden- Meyerhof-Parnas	<b>MRS-BCP:</b> Milieu MRS additionnée de pourpre de Bromocrésol	<b>V:</b> Volume
<b>EPS:</b> Exopolysaccharides	<b>NaCl:</b> Chlorure de sodium	<b>VP:</b> Voges-Proskauer
	<b>NAD<sup>+</sup>:</b> Nicotinamide adenine dinucléotide	<b>µl:</b> Microlitre
		<b>µ:</b> Micron
		<b>µg:</b> Microgramme
		<b>µm:</b> Micromètre

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> <i>Lactobacillus acidophilus</i> au microscope électronique.....	5
<b>Figure 2 :</b> <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> au microscope électronique.....	5
<b>Figure 3 :</b> <i>Pediococcus</i> au microscope électronique.....	9
<b>Figure 4 :</b> Formation de pores membranaires par le complexe nisine-lipide II.....	18
<b>Figure 5 :</b> Schéma montrant la structure du mannose perméase du système phosphotransférase.....	20
<b>Figure 6 :</b> Mode d'action utilisé par les bactériocines de classe Iia et par les lactococcines A et B (classe Iid).....	20
<b>Figure 7 :</b> Mode d'action des bactériocines de classe Iia.....	22
<b>Figure 8 :</b> Représentation schématique des différentes étapes de la pathogénie après infection orale par <i>Salmonella</i> sp.....	35
<b>Figure 9 :</b> Pathogénie de la diarrhée.....	36
<b>Figure 10 :</b> Cage d'élevage des souris.....	46
<b>Figure 11 :</b> Les étapes pour recueillir les organes des souris. a : Anesthésie de la souris par le chloroforme, b : fixation de la souris, c : souris saine après dissection, d : organes d'une souris saine.....	48
<b>Figure 12:</b> Méthode de diffusion en puits pour la recherche des substances antimicrobiennes.....	49
<b>Figure 13:</b> Protocole d'adsorption-désorption.....	53
<b>Figure 14:</b> Protocole de précipitation au sulfate d'ammonium.....	55
<b>Figure 15:</b> Observation macroscopique de bactéries lactiques utilisées.....	59
<b>Figure 16:</b> Observation microscopique de bactéries lactiques utilisées après coloration de Gram (Gx100).....	59
<b>Figure 17:</b> Le profil fermentaires des glucides de la bactérie isolée <i>Leuconostoc</i> sp...	61
<b>Figure 18:</b> Schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques.....	61
<b>Figure 19:</b> Observation macroscopique de <i>Salmonella</i> sp cultivé sur milieu SS.....	64
<b>Figure 20:</b> Observation microscopique de <i>Salmonella</i> sp après coloration de Gram (Gx100).....	65
<b>Figure 21:</b> Recherche de l'Uréase.....	65
<b>Figure 22:</b> Recherche de LDC.....	65
<b>Figure 23:</b> Culture de <i>Salmonella</i> sp sur milieu Hajna-Kligler.....	65
<b>Figure 24:</b> Identification de la souche <i>Salmonella</i> sp par la galerie API 20 <sup>E</sup> .....	65
<b>Figure 25:</b> Effet de 0,3% sels biliaire sur la croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> .....	67
<b>Figure 26:</b> Effet de 0,3% sels biliaire sur la croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427.....	67
<b>Figure 27:</b> Test d'adhésion de <i>Lactobacillus plantarum</i> (a) et <i>Leuconostoc</i> sp (b) au tissu épithélial du côlon.....	67
<b>Figure 28:</b> Antibiogramme de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427 (a) et <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> (b).....	68
<b>Figure 29:</b> Evolution de la flore lactique au cours du temps.....	70
<b>Figure 30:</b> Evolution de <i>Salmonella</i> sp au cours du temps après le dénombrement sur milieu SS.....	72
<b>Figure 31:</b> Activité antibactérienne des souches lactiques, surnageant et culot vis-à-vis de <i>Salmonella</i> sp.....	73
<b>Figure 32:</b> Effet des surnageants neutralisés sur la croissance de <i>Salmonella</i> sp.....	74
<b>Figure 33:</b> Effet des surnageants lactiques traités par les enzymes protéolytiques sur	75

la croissance de <i>Salmonella</i> sp.....	
<b>Figure 34:</b> Effet des surnageants traités par différentes températures sur la croissance de <i>Salmonella</i> sp.....	<b>76</b>
<b>Figure 35:</b> Effet des surnageants traités à différent pH et sels biliaires sur la croissance de <i>Salmonella</i> sp.....	<b>78</b>
<b>Figure 36:</b> Effet antibactérien des extraits lactiques.....	<b>79</b>
<b>Figure 37:</b> La cinétique de croissance des souches utilisées.....	<b>81</b>
<b>Figure 38:</b> La croissance de <i>Salmonella</i> sp en présence de l'extrait lactique trouvé par adsorption-désorption.....	<b>83</b>
<b>Figure 39:</b> La croissance de <i>Salmonella</i> sp en présence de l'extrait lactique trouvé par précipitation au sulfate d'ammonium.....	<b>85</b>
<b>Figure 40:</b> Résultat de l'analyse par le spectrophotomètre des extraits obtenus par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium.....	<b>86</b>
<b>Figure 41:</b> Résultat de l'analyse par le spectrophotomètre des extraits obtenus par la méthode d'adsorption-désorption.....	<b>87</b>
<b>Figure 42:</b> Résultat de HPLC de la Nisine.....	<b>89</b>
<b>Figure 43:</b> Résultat de HPLC de l'extrait de la souche <i>Leuconostoc</i> sp obtenu par adsorption-désorption.....	<b>90</b>
<b>Figure 44:</b> Résultat de HPLC de l'extrait de la souche <i>Leuconostoc</i> sp obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium.....	<b>91</b>
<b>Figure 45:</b> Résultat de HPLC de l'extrait de la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> obtenu par adsorption-désorption.....	<b>92</b>
<b>Figure 46:</b> Résultat de HPLC de l'extrait de la souche <i>Lactobacillus plantarum</i> obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium.....	<b>93</b>
<b>Figure 47:</b> Résultat de HPLC de l'extrait de la souche <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427 obtenu par adsorption-désorption.....	<b>94</b>
<b>Figure 48:</b> Résultat de HPLC de l'extrait de la souche <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427 obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium.....	<b>95</b>
<b>Figure 49:</b> Résultat de HPLC de l'extrait de la souche <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> obtenu par adsorption-désorption.....	<b>96</b>
<b>Figure 50:</b> Résultat de HPLC de l'extrait de la souche <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium.....	<b>97</b>
<b>Figure 51:</b> Résultat de HPLC de l'extrait de la souche <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> obtenu par adsorption-désorption.....	<b>98</b>
<b>Figure 52:</b> Résultat de HPLC de l'extrait de la souche <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium.....	<b>99</b>
<b>Figure 53:</b> Résultat de l'IR des extraits lactiques.....	<b>103</b>
<b>Figure 54:</b> La CMI de l'extrait de <i>Leuconostoc</i> sp.....	<b>104</b>
<b>Figure 55:</b> La CMI de l'extrait de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	<b>104</b>
<b>Figure 56:</b> La CMI de l'extrait de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427.....	<b>104</b>
<b>Figure 57:</b> La CMI de l'extrait de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> .....	<b>105</b>
<b>Figure 58:</b> La CMI de l'extrait de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> .....	<b>105</b>
<b>Figure 59:</b> CMB des extraits lactiques trouvés par la précipitation au sulfate d'ammonium.....	<b>106</b>
<b>Figure 60 :</b> Lecture selon le profil numérique à l'ade du catalogue analytique Api 20 <sup>E</sup> .....	<b>165</b>
<b>Figure 61 :</b> Effet de 0.3% sels biliaire sur la croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> .....	<b>166</b>
<b>Figure 62 :</b> Effet de 0.3% sels biliaire sur la croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427.....	<b>166</b>

<b>Figure 63 :</b> Effet de 0.3% sels biliaire sur la croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> .....	<b>166</b>
<b>Figure 64 :</b> Effet de 0.3% sels biliaire sur la croissance de <i>Leuconostoc</i> sp.....	<b>166</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Conséquences cellulaires dues à l'action de peptides antibactériens.....	<b>22</b>
<b>Tableau 2:</b> Souches productrices de bactériocines.....	<b>27</b>
<b>Tableau 3:</b> Liste des différents agents et fréquence de rapportage dans les TIA déclarées en 2007.....	<b>29</b>
<b>Tableau 4:</b> Tableau récapitulatif des principales causes de toxi-infections alimentaires.....	<b>30</b>
<b>Tableau 5:</b> Aperçu des épisodes de Salmonella en 2007.....	<b>31</b>
<b>Tableau 6:</b> Observation macroscopique et microscopique des souches lactiques utilisées.....	<b>60</b>
<b>Tableau 7:</b> Les caractères biochimiques des.....	<b>63</b>
<b>Tableau 8:</b> Utilisation des carbohydrates de carbone par les souches dans une Galerie biochimique classique.....	<b>64</b>
<b>Tableau 9:</b> Résultats de l'identification biochimique (Api 20 <sup>E</sup> ).....	<b>65</b>
<b>Tableau 10:</b> Le diamètre des zones d'inhibition de <i>Salmonella</i> sp.....	<b>73</b>
<b>Tableau 11:</b> Le diamètre des zones d'inhibition de <i>Salmonella</i> sp.....	<b>75</b>
<b>Tableau 12:</b> Le diamètre des zones d'inhibition de <i>Salmonella</i> sp en mm.....	<b>76</b>
<b>Tableau 13:</b> Le diamètre des zones d'inhibition de <i>Salmonella</i> sp en mm.....	<b>77</b>
<b>Tableau 14:</b> Le diamètre de la zone d'inhibition de <i>Salmonella</i> sp.....	<b>79</b>
<b>Tableau 15:</b> Cinétique de croissance en culture pure.....	<b>80</b>
<b>Tableau 16:</b> Cinétique de croissance en culture mixte avec l'extrait trouvé par adsorption-désorption.....	<b>83</b>
<b>Tableau 17:</b> Cinétique de croissance en culture mixte avec l'extrait trouvé par précipitation au sulfate d'ammonium.....	<b>86</b>
<b>Tableau 18:</b> Analyse qualitative des extraits trouvés par la méthode d'adsorption- désorption.....	<b>88</b>
<b>Tableau 19:</b> Analyse qualitative des extraits trouvés par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium.....	<b>88</b>
<b>Tableau 20:</b> Tableau d'identification par galerie Api 20 <sup>E</sup> .....	<b>165</b>

## LISTE DES HISTOGRAMMES

<b>Histogramme 1:</b> Effet des sels biliaries et pH1.....	<b>66</b>
--	-----------

## **Résumé :**

Cette étude porte sur les effets bénéfiques des microorganismes dénommés probiotiques à savoir : *Lactococcus* sp, *Lactobacillus* sp et *Leuconostoc* sp, des souches lactiques isolées à partir du lait cru de vache et *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 une souche de référence, et proposer les différentes possibilités thérapeutiques non antibiotiques vis-à-vis de l'agent pathogène *Salmonella* sp.

Nous avons réalisé un test *In vivo* où nous avons remarqué qu'un traitement en présence de ces souches lactiques est efficace car il provoque une diminution importante du germe pathogène étudié dans les crottes, intestin et estomac. L'efficacité de ces souches lactiques a été confirmée par des tests de résistance aux conditions digestifs (pH, sels biliaires, les enzymes digestives).

La recherche de la substance antagoniste a été réalisée suivant la méthode de diffusion sur gélose. Une caractérisation de l'agent inhibiteur a été réalisée après élimination de l'effet des acides organiques (neutralisation du milieu à pH 7) et un effet de l'enzyme pepsine et trypsine ainsi qu'un test de stabilité à température 100°C pendant 75min.

Les cinq souches lactiques ont données des zones d'inhibition à l'égard de la souche cible *Salmonella* sp. Les substances inhibitrices produites perdent leurs activités après traitement par la pepsine, trypsine et à pH : 2.5, 4.3, 6.5.

Ensuite, une extraction des peptides bioactifs par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium et la méthode d'Adsorption-Désorption. Les extraits ont été caractérisés par une analyse à l'UV-Visible, IR et HPLC. Enfin, notre travail s'achève avec la détermination des CMI et CMB des extraits des souches modèles.

**Mots clés :** *Lactococcus* sp, *Salmonella* sp, Bactériocine, Adsorption-Désorption, Précipitation au sulfate d'ammonium.

## ملخص:

بحث هذه الدراسة الآثار المفيدة من الكائنات الحية الدقيقة بروبيوتيك وهي *Lactococcus sp*, *Lactobacillus sp* و *Leuconostoc sp* سلالات معزولة من حليب البقر الخام وسلالة مرجعية *Lactococcus lactis subsp lactis* CNRZ 1427 واقتراح إمكانيات علاجية مختلفة من غير المضادات الحيوية ضد السالمونيلا. حققنا الاختبار في جسم حي (الفئران) حيث لاحظنا أن العلاج في وجود هذه السلالات اللاكتيك فعالة لأنه يسبب انخفاضا كبيرا في العوامل المسببة للأمراض في الأمعاء والمعدة. تم تأكيد فعالية سلالات اللاكتيك من اختبارات التحمل لظروف الجهاز الهضمي (pH، الأملاح الصفراوية والأنزيمات الهاضمة) البحث عن المادة الخصم أجريت وفقا لطريقة النشر على الأجار تم إجراء توصيف المادة الخصم بعد إزالة تأثير الأحماض العضوية (في درجة الحموضة 7) وتأثير انزيم البيبسين و التربسين و اختبار استقرار في درجة حرارة 100 درجة مئوية لمدة 75 دقيقة. السلالات الخمس أعطت تثبيط ضد السالمونيلا. المواد المثبطة المنتجة تفقد أنشطتها بعد العلاج مع البيبسين، التربسين ودرجة الحموضة: 2.5، 4.3، 6.5. وأخيرا، ينتهي عملنا مع تقرير التركيز المثبط الأدنى للمواد المنتجة للسلالات الخمس. ثم، استخراج البيبتيدات النشطة من خلال طريقة *Adsorption-précipitation au sulfate d'ammonium* وطريقة *Désorption*. ثم تحليل البيبتيدات النشطة المستخرجة عن طريق الأشعة فوق البنفسجية-مرئي، الأشعة تحت الحمراء و HPLC.

## الكلمات المفتاحية:

مبيد جرثومي، *Lactococcus sp*, *Salmonella sp*, *Adsorption-Désorption*, طريقة *précipitation au sulfate d'ammonium*

**Abstract :**

This study examined the beneficial effects of microorganisms called probiotics: *Lactococcus* sp, *Lactobacillus* sp and *Leuconostoc* sp, lactic strains isolated from raw cow's milk and a reference strain *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427; and proposed the different therapeutic possibilities antibiotics, with respect to the pathogen *Salmonella* sp.

An *in vivo* test was performed where it was observed that treatment in the presence of these lactic strains is effective because it causes a remarkable decrease of this pathogenic organism studied in the droppings, intestine and stomach. The efficacy of these lactic strains was confirmed by tests of resistance to digestive conditions (pH, bile salts, and digestive enzyme).

The search for the antagonist substance was carried out according to the agar diffusion method. A characterization of the inhibiting agent was carried out after removal of the effect of organic acids (neutralization of the medium at pH 7) and an effect of the enzyme pepsin and trypsin thus a stability test at 100°C temperature for 75 min.

The five strains gave zones of inhibition against the target strain *Salmonella* sp. The inhibitory substances produced lose their activities after treatment with pepsin, trypsin and at pH: 2.5, 4.3, 6.5.

Then, extraction of the bioactive peptides by the method of ammonium sulfate precipitation and Adsorption-Desorption method. The extracts were characterized by UV-Visible, IR and HPLC analysis. Finally, our work ends with the determination of MICs of the extracts of the model strains.

**Key words:** *Lactococcus* sp, *Salmonella* sp, Bacteriocin, Adsorption-Desorption, Ammonium Sulphate Precipitation.

# **INTRODUCTON**

## INTRODUCTION

Malgré l'application des technologies modernes de transformation des aliments et l'application des principes de qualité, les toxi-infections alimentaires sont à la base de plus de 9000 morts chaque année dans le monde (Mead et Slutsker, 1999).

Des moyens usuels de prévention tels les traitements physiques (hautes pressions, rayons ionisants, pasteurisation, stérilisation, congélation, réfrigération...), chimiques (nitrites, sulfites), compromettent souvent la qualité de l'aliment. Les chercheurs et les industriels de l'agro-alimentaire sont de plus en plus contraints à réduire l'emploi de ce type de conservateurs, en utilisant des bactéries lactiques et leurs substances actives.

Le lait cru de part sa richesse en substances nutritives (protéines, graisses, glucides, vitamines...etc.), constitue un milieu favorable pour le développement des germes. Lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions, le lait cru contient peu de germes ( $10^3$  germes par mL). Il s'agit de germes saprophytes et parmi eux, on trouve les Streptocoques lactiques (*Lactococcus*) et les Lactobacilles, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Leuconostoc*.

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans la fermentation de différents aliments. Leur capacité à produire des acides organiques accompagnés de l'abaissement du pH est le majeur facteur par lequel ces dernières inhibent la croissance des autres microorganismes concurrents. D'autres métabolites tels que le peroxyde d'hydrogène, l'alcool et le diacétyl synthétisés par les bactéries lactiques peuvent aussi contribuer à la préservation des produits alimentaires. De plus, ces dernières peuvent synthétiser des composés inhibiteurs de nature protéique appelés bactériocines. Pour cela, des bactéries lactiques sont isolées du lait cru provenant des vaches laitières et élevées dans des stations d'élevage situées dans la wilaya de Mostaganem (Algérie). Dans cette étude cinq genres de bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus* vont être utilisées pour mettre en évidence l'effet inhibiteur *in vivo* et *in vitro* de nos souches lactiques vis-à-vis de *Salmonella* sp.

Les bactériocines sont des substances protéiques antimicrobiennes qui ont un large spectre d'inhibition incluant des micro-organismes d'altération et pathogènes. Ceci a conduit les chercheurs à s'intéresser à ces molécules et à leur éventuelle application dans le domaine de l'agro-alimentaire comme bio-conservateurs et en médecine humaine et vétérinaire comme de nouveaux agents antimicrobiens.

## Introduction

Le manuscrit s'articule autour de cinq chapitres dont le contenu est brièvement résumé ci-dessous.

Le chapitre I présente un bref historique sur les bactéries lactiques et le rôle qu'elles jouent pour l'amélioration de la santé contre les agressions bactériennes qui touchent l'équilibre de ce système digestif ; ces infections d'origine bactériennes ont été résumées dans le troisième chapitre. Dans le chapitre II, nous avons défini les bactériocines, leurs mécanismes d'action, leurs effets sur la santé, ce qui permettrait de les utiliser comme solution alternative et comme un traitement biothérapeutique.

Le chapitre IV (Matériel et Méthodes) regroupe les différentes étapes de notre étude ; isolement, identification et purification des souches utilisées, la réalisation des deux tests *in vivo* et *in vitro* puis nous sommes attelés à extraire et caractériser les molécules à effet antibactérien, en utilisant deux différentes méthodes la précipitation au sulfate d'ammonium et l'adsorption/désorption.

Le deux chapitre V et VI regroupe les résultats obtenus et la discussion respectivement.

La conclusion de ce travail est présentée à la suite de ces cinq chapitres suivi par les références bibliographiques et annexe.

# **Chapitre I**

## **Les bactéries lactiques**

### **1. Les bactéries lactiques**

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen (1919) au début du XX<sup>e</sup> siècle, les bactéries lactiques (LAB) constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique.

Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (requièrent des molécules organiques complexes comme source énergétique) (De Roissart, 1986); elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. La fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO<sub>2</sub> ...etc.) (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet *et al.*, 2005).

Elles sont Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négative, oxydase négative généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio *et al.*, 1994 ; Hogg, 2005).

### **2. Habitat et origine des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Hassan et Frank, 2001).

### **3. Taxonomie des bactéries lactiques**

Depuis la description du *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot, 2008).

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique/biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire

des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique du lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (**Vandamme et al., 1996**).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classifier les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (**Collins et al., 1993**).

À ce groupe de bactéries lactiques, appartient plusieurs genres comme *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. (**Stiles et Holzappel, 1997 ; Pot, 2008**). Des genres nouveaux, par exemple *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupes des bactéries lactiques (**Broadbent, 2001 ; Axelsson, 2004**).

Le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré par plusieurs auteurs comme genre de bactéries lactiques, bien qu'il se distingue par un pourcentage en G+C de 55%, largement supérieur à celui des autres genres et par une voie métabolique de fermentation des différents sucres. Les études phylogénétiques basées sur l'analyse des séquences des ARN ribosomiques ont confirmé l'appartenance de ces différents genres à un même groupe qui inclut également *Clostridium*, *Bacillus* et *Propionibacterium* (**Pilet et al., 2005**).

#### **4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques**

##### **4.1. Le genre *Lactobacillus***

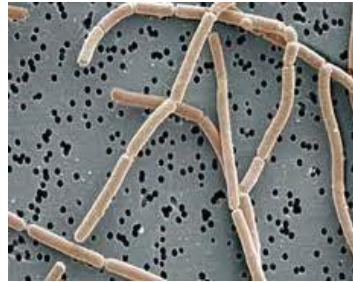
**Famille I :** *Lactococcaceae*

**Genre I :** *Lactobacillus*

*Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles

longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes (figure 1), immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C.

Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (**Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc *et al.*, 1994**).



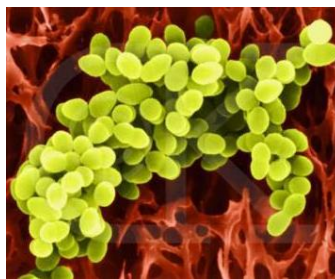
**Figure 1:** *Lactobacillus bulgaricus* au microscope électronique  
([www.bioweb.usu.edu](http://www.bioweb.usu.edu)).

### 4.2. Le genre *Lactococcus*

**Famille VI:** *Streptococcaceae*

**Genre II:** *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits «lactiques», car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (**Pilet *et al.*, 2005**). Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paires ou en chaînes de longueur variable (figure 2). Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capables de se développer à 10°C, mais pas à 45°C.



**Figure 2:** *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* au microscope électronique  
([www.bioweb.usu.edu](http://www.bioweb.usu.edu)).

Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (**Tamime, 2002**).

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces et plusieurs sous-espèces; *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis* subsp *lactis*, *Lc. lactis* subsp *cremoris* et *Lc. lactis* subsp *hordniae* (**Pot et al., 1996 ; Pot, 2008**).

### **4.3. Le genre *Leuconostoc***

**Famille V:** *Leuconostocaceae*

**Genre I:** *Leuconostoc*

Ils représentent les coques hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO<sub>2</sub> et d'éthanol, et se regroupent en paires ou en chainettes mésophiles. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrans, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (**Ho et al., 2007**).

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les *Leuconostoc* principalement *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris* et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO<sub>2</sub>, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (**Ogier et al., 2008**).

Récemment, l'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été classée dans un nouveau genre, *Oenococcus oeni* et certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (**Stiles et Holzappel, 1997**).

### **4.4. Le genre *Streptococcus***

**Famille VI:** *Streptococcaceae*

**Genre I:** *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée.

Ce genre est généralement divisé en trois groupes: pyogène, oral et les autres streptocoques.

Le groupe pyogène contient plusieurs streptocoques pathogènes, hémolytiques (hémolyse) qui nuisent à la santé humaine. Les *Streptococcus pneumoniae*, précédemment inclus dans ce groupe, sont transférés maintenant dans le groupe oral puisqu'ils sont associés principalement à la cavité orale de l'homme et de l'animal. En général, les streptocoques pyogènes sont  $\alpha$ -hémolytiques tandis que les streptocoques oraux sont  $\alpha$ - ou non-hémolytiques. Le groupe oral est divisé en cinq sous-groupes phylogénétiques qui sont respectivement les groupes *anginosus*, *mitis*, *salivarius*, *bovis* et *mutans*. Les caractéristiques biochimiques telles que: la fermentation des hydrates de carbones, l'hydrolyse de l'arginine, et certaines activités enzymatiques sont utilisées dans la classification (Furet *et al.*, 2004; Rantsiou *et al.*, 2004; Rossetti et Giraffa, 2005 ; Koort *et al.*, 2006 ; Piraino *et al.*, 2006 ; Desar *et al.*, 2008).

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*. Cette espèce est l'un des deux ferments (avec *Lactobacillus delbrückii* ssp *bulgaricus*) impliquée (et obligatoire) pour la dénomination yaourt en législation française et pour certains fromages. Les *Sp. thermophilus* ont été inclus dans le groupe des «autres streptocoques» (Scheilfer, 1987) mais ensuite, transférés au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Sp. salivarius* (Haddie, 1995). Une troisième espèce, *Sp. vestibularis* appartient également au groupe des streptocoques (Kawamura *et al.*, 1995). La résistance à la température, la capacité à croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *Sp. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Haddie, 1986).

### **4.5. Le genre *Vagococcus***

#### **Famille IV: *Enterococcaceae***

#### **Genre II: *Vagococcus***

Les espèces du nouveau genre *Vagococcus* sont facilement confondues avec les lactocoques au niveau morphologique, mais ces deux genres sont clairement distincts par leur composition en acides gras. Certaines espèces de *Vagococcus* sont mobiles (Teixeira *et al.*, 1999). Les amorces d'oligonucléotides spécifiques à ce genre et ses espèces sont disponibles, ce qui rend l'identification des bactéries de ce genre fiable et réalisable (Ammor *et al.*, 2005 ; Endo et Okada, 2005).

### **4.6. Le genre *Enterococcus***

**Famille IV:** *Enterococcaceae*

**Genre I:** *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* regroupe les streptocoques fécaux qui présentent une hémolyse de type  $\alpha$ ,  $\beta$ , et qui appartiennent au groupe sérologique D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* (auparavant *Streptococcus faecalis*), et ses variétés *En. durans* et *En. bovis*). Les *Enterococcus* sont les bactéries lactiques les plus controversées (**Franz et al., 2003**).

Les entérocoques produisent des bactériocines (**Moreno et al., 2006 ; Sabia et al., 2003, Sabia et al., 2002**). D'ailleurs, des préparations d'*En. faecium* (autrefois *Sp. faecium*) et d'*En. faecalis* ont été utilisées en tant que probiotiques (**Ruiz-Moyano et al., 2008**). Certaines résistent aux antibiotiques et transfèrent de telles propriétés au moyen d'éléments génétiques mobiles.

### **4.7. Le genre *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus***

Ce sont des coques formées de cellules groupées en tétrades. Le genre *Aerococcus* qui contient cinq espèces est généralement moins intéressant dans l'agroalimentaire. Cependant, une étude récente a suggéré que ces bactéries pourraient être responsables du verdissement des produits carnés cuits (**Peirson et al., 2003**).

#### **4.7.1. *Pediococcus***

**Famille I:** *Lactococcaceae*

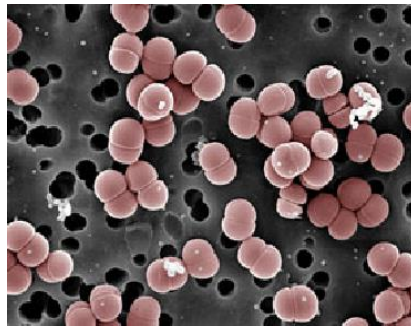
**Genre III:** *Pediococcus*

Sept espèces de *Pediococcus* sont connues: *Pe. acidilactici*, *Pe. damnosus*, *Pe. dextrinicum*, *Pe. inopinatus*, *Pe. parvutus*, *Pe. pentosaceus* et *Pe. urinaequi*. Collins et al. (1990) ont proposé de reclasser la dernière avec le genre des *Aerococcus* mais aucun changement officiel sur cette suggestion n'a été réalisé (**Dobson et al., 2010**). Avec la transposition de *Pe. urinae-equi* au genre *Aerococcus* et de *Pe. halophilus* au genre *Tetragenococcus*, les *Pediococcus* peuvent être décrits comme les seules coques lactiques acidophiles et homofermentaires. Ils se divisent alternativement dans deux plans ce qui aboutit à la formation de tétrades (figure 3) (**Simpson et Taguchi, 1995**). Ces dernières sont importantes dans l'agroalimentaire tant sous l'aspect négatif que positif. Les *Pe.*

*damnosus* sont les microorganismes majeurs de l'altération de la bière à cause de la formation des diacétyl/acétoïne qui créent le goût du beurre.

Les *Pe. acidilactici* et *Pe. pentosaceus* ont démontré leur utilité dans l'élaboration de plusieurs produits carnés fermentés naturels. Ceci a conduit à de nombreuses sélections de souches et l'utilisation comme agents antibactériens ou probiotiques dans la fabrication de produits carnés (**Ruiz-Moyano *et al.*, 2008 ; Albano *et al.*, 2007 ; Schneider *et al.*, 2006**).

Les pédiocoques sont également des bactéries lactiques autochtones qui permettent la maturation des fromages (**Gonzalez *et al.*, 2007 ; Gurira *et al.*, 2005**).



**Figure 3:** *Pediococcus* au microscope électronique  
([www. bioweb.usu.edu](http://www.bioweb.usu.edu)).

### **4.7.2. *Tetragenococcus***

**Famille IV:** *Enterococcaceae*

**Genre III:** *Tetragenococcus*

Seulement deux espèces de *Tetragenococcus* sont connues: *Te. halophilus* (précédemment considérées comme *Pe. halophilus*) et *Te. muriaticus*.

Les *Enterococcus solitarius* sont phylogénétiquement liés au *Tetragenococcus*. Ces bactéries résistent à des concentrations élevées en sel (supérieures à 18% NaCl) et en sont dépendantes pour leur croissance. Les espèces *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration de sel élevée par exemple les sauces de soja (**Masuda *et al.*, 2008 ; Tosukhowong *et al.*, 2005**).

### **4.7.3. *Weissella***

**Famille V:** *Leuconostocaceae*

**Genre III:** *Weissella*

Dans la famille des *Leuconostocaceae*, la séparation des *Weissella* du groupe des *Leuconostoc* et de certaines autres bactéries lactiques hétérofermentaires est toujours problématique.

En général, les espèces du genre *Weissella* sont constituées de courts bacilles, de coccobacilles ou des coques ovoïdes, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés, immobiles, catalase négative (*Weissella paramesenteroides* peut produire une pseudocatalase lorsqu'elle est cultivée sur un milieu pauvre en glucose), oxydase négative, aéro-anaérobies ou micro-aérophiles, chimio-organotrophes, hétérofermentaires stricts, cultivant à 15°C, ayant des exigences nutritionnelles complexes.

### **5. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques**

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques.

#### **5.1. Le pH et les acides organiques**

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques qui 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 tandis qu'il conduit à la formation d'acide 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.

Les acides organiques sont un des agents classiques de préservation des aliments (**Brul et Coote, 1999**) et 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 Siebert, 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 acides. Ceux-ci leur sont également utiles pour survivre au transit intestinal (**Brul et Coote, 1999 ; Cotter et Hill, 2003**).

### **5.2. 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. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents microorganismes 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 est parfois décrit comme étant des pseudocatalases (**Strus et al., 2005**).

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**).

### **5.3. 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**).

### **5.4. Le diacétyl**

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus* sp, *Leuconostoc* sp, *Lactobacillus* sp et *Pediococcus* sp. Le diacétyl (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram négatifs et les bactéries Gram positifs non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (**El Ziney et al., 1998**).

### **5.5. La reutéline**

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* (**El Ziney et al., 1998**). La fermentation du glycérol se déroule en deux étapes. Le glycérol sera tout d'abord déshydraté par une «glycérol déshydratase» pour former de la reutéline qui sera ensuite réduite en 1,3-propanediol par une oxydoréductase. Cette deuxième étape est inhibée en l'absence de glucose. La reutéline s'accumule alors dans le microorganisme producteur. À 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, 2004).

### **5.6. Les bactériocines**

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Les plus connues sont: la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane (Dortu et Thonart, 2009). La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (De Vuyst et Leroy, 2007 ; Kumari *et al.*, 2009).

## **6. Utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocine**

C'est durant le XIX<sup>e</sup> siècle, au Danemark, que la première boisson fermentée fabriquée à partir d'un mélange de souches bactériennes isolées à partir de lait cru a été commercialisée. Le concept de ferment a ensuite évolué au début du XX<sup>e</sup> siècle après l'identification de quelques souches impliquées dans la fermentation.

Grâce à leurs propriétés d'acidification et de production de polysaccharides, les bactéries lactiques ont souvent été utilisées en co-cultures pour initier et/ou améliorer la fermentation de nombreux aliments comme la choucroute, les saucisses ou les olives vertes. Cependant, une des caractéristiques des bactéries lactiques qui leur permet de se placer comme bioconservateur est leur production de molécules antimicrobiennes (Settanni et Corsetti, 2008).

La production de bactériocine offre de nombreux avantages, comme le coût ou l'augmentation de la compétition avec la microflore résidente augmentant ainsi l'inhibition de croissance des bactéries pathogènes. La diminution du coût de préparation pourrait généraliser la pratique permettant aux pays en voie de développement où la sécurité alimentaire est le plus souvent compromise de bénéficier de ces applications (Holzapfel et Schillinger, 2002).

De nombreuses souches bactériennes productrices de bactériocines sont actuellement utilisées dans les produits alimentaires fermentés, tels que les produits laitiers, les viandes, les poissons ou les légumes. Les souches bactériennes du genre *Lactococcus* sont les bactéries productrices de bactériocines les plus utilisées (Gálvez *et al.*, 2007 ; O'Sullivan *et al.*, 2003).

L'optimisation de l'arôme du fromage pourrait être réalisée par l'utilisation des souches productrices de lacticine 3147 en combinaison avec des cultures bactériennes productrices d'amino-transférases et de décarboxylases (**Makhloufi, 2011**).

Du fait de leur robustesse, leur présence naturelle dans différents produits alimentaires et leur production de nombreuses bactériocines, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* productrices de bactériocines sont largement utilisées comme adjuvants (**Franz et al., 2007**). Les bactéries appartenant au genre *Pediococcus* productrices de bactériocines ne sont pas adaptées à la fabrication des produits laitiers fermentés de par leur manque ou leur lenteur de fermentation du lactose (**Papagianni et al., 2007 ; Rodríguez et al., 2002**).

D'autres qualités ont depuis été associées aux bactéries lactiques lorsqu'elles sont associées aux produits alimentaires comme l'augmentation des valeurs nutritionnelles des aliments, la réduction de la formation de produits toxiques et la propriété de probiotique.

En plus de la propriété de bioconservation, plusieurs propriétés ont été attribuées aux bactéries productrices de bactériocines telles que la diminution des gaz dus à la fermentation ainsi qu'à l'amélioration du goût et de la qualité du produit fini.

Grâce à leur activité protéolytique et leur acidification importante du milieu, les bactéries productrices de bactériocines sont utilisées soit pour initier la fermentation soit pour jouer le rôle d'adjuvant en présence d'une bactérie initiatrice de fermentation (**Gálvez et al., 2007**). Aussi, la croissance de la co-culture ne doit avoir aucun effet sur les propriétés physicochimiques et organoleptiques du produit fini ni interférer avec celles-ci.

De plus, la bactérie productrice doit être prédominante et capable de produire sa bactériocine à n'importe quelle température, pendant la réfrigération ou à température ambiante, afin d'empêcher la croissance et la prolifération des bactéries pathogènes dans les aliments (**Holzappel et al., 1995**).

# **Chapitre II**

## **Les bactériocines**

### 1. Historique

L'histoire de bactériocines s'étend au début des années 1920. Bien que leur activité antimicrobienne ait été découverte en 1928, les bactériocines n'ont pas été utilisées dans les produits alimentaires jusqu'en 1951. Dans les années 1960, la première bactériocine, appelée nisine, qui est produite par *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, a été purifiée et reconnu comme agent de conservation alimentaire par la FAO/OMS en 1969. En 1988, la FDA a approuvé l'utilisation de la nisine comme additif dans les produits en conserves aux États-Unis pour inhiber la croissance de *Cl. botulinum*. En outre, les résultats d'études de recherche indiquent que la résistance de *Listeria monocytogenes* à la nisine ne semble pas être stable.

### 2. Définition

Les bactériocines sont des substances antimicrobiennes de nature protéique (**Tagg et al., 1976**). La détection des bactériocines remonte à 1925 par André Gratia qui a observé que la croissance de certaines souches d'*Escherichia coli* a été inhibée en présence d'un composé antibactérien, dont il a donné le nom de colicin V. Cette substance a été caractérisée comme composé peptidique thermostable. Tagg et al. (**1976**) suggéraient qu'un composé antimicrobien doit être considéré comme une bactériocine que lorsqu'il satisfait aux critères suivants:

- L'activité des bactériocines doit disparaître sous l'action des protéases.
- Un spectre d'inhibition étroit dirigé contre les espèces apparentées à la souche productrice.
- La présence d'une fraction protéique biologiquement active.
- Un mode d'action bactéricide.
- Un site d'attachement (récepteurs) spécifique sur les cellules sensibles.
- La bactérie productrice synthétise une molécule qui la protège contre sa propre bactériocine.

Les bactériocines sont codées par des plasmides.

### 3. Classification

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

### **3.1. Classe I : Les lantibiotiques**

Ce sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, comme la lanthionine, la  $\beta$ -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Les lantibiotiques peuvent être divisés en deux types : la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (**Twomey *et al.*, 2002**). Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticine 3147.

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par la liaison à des récepteurs spécifiques telle que le lipide II (undecaprenyl pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un précurseur du peptidoglycane. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la mort de la cellule (**McAuliffe et Hill, 2001a ; Twomey *et al.*, 2002 ; Bauer et Dicks, 2005 ; Patton et Van Der Donk, 2005**).

Les lantibiotiques composés de deux peptides comme la lacticine 3147 agit également par formation de pores dans la membrane des cellules cibles (**Mc Auliffe et Hill, 2001**). La lacticine 3147 a un spectre d'action large. Le peptide A1 a une activité qui est plus élevée en présence du peptide A2. Il a été récemment proposé que la lacticine 3147 A1 agit en se liant au lipide II, inhibant la synthèse du peptidoglycane et permettant à la lacticine 3147 A2 de former un pore dans la membrane de la cellule cible (**Morgan *et al.*, 2005 ; Wiedemann *et al.*, 2006**).

### **3.2. Classe II**

Ce sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoélectrique varie entre 8 et 10.

#### **3.2.1. La sous-classe IIa**

Ces bactériocines contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toute une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure

et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (**Fimland et al., 2000 ; Richard et al., 2006**). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (**Eijsink et al., 1998 ; Fimland et al., 2000 ; Drider et al., 2006 ; Richard et al., 2006**).

### **3.2.2. La sous-classe IIb**

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

### **3.2.3. La sous-classe IIc**

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la «mannose perméase», pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilité de la membrane et par conséquent, la mort de la cellule (**Dalet et al., 2000 ; Héchard et al., 2001 ; Gravesen et al., 2002 ; Arous et al., 2004 ; Vadyvaloo et al., 2004 ; Bauer et Dicks., 2005**). Le mécanisme de formation des pores n'est pas bien connu, même si l'hypothèse la plus courante est l'association de différentes molécules de la bactériocine (**Ennahar et al., 2000 ; Fimland et al., 2000 ; Diep et al., 2007**).

Les bactériocines de classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram+. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules à savoir les cations et les anions (**Oppegard et al., 2007**).

## **3.3. Classe III**

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

produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Nilsen *et al.*, 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigutova *et al.*, 2007).

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

### **3.4. Classe IV**

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

## **4. Mécanisme d'action des bactériocines**

### **4.1. Mode d'action des bactériocines de classe I**

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II (Undecaprenylpyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un précurseur de peptidoglycane. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique.

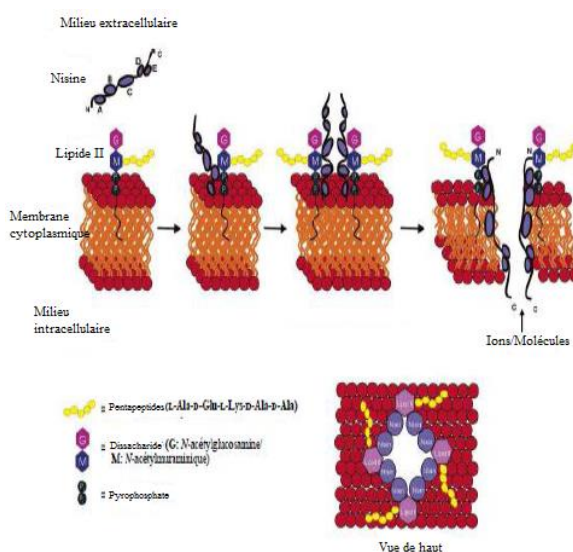
De même, le lipide II intervient comme molécule d'amarrage lors de l'interaction nisine-membrane initiale, facilitant l'adoption d'une conformation adéquate de la molécule de nisine pour la formation des pores (Hasper *et al.*, 2006). Ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc.

Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice (le gradient de pH et le gradient électrochimique) et à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. L'interaction avec le lipide II permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de réduire la concentration du lantibiotique nécessaire à la formation des pores, mais peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (Bauer et Dicks, 2005 ; Patton et Van Der Donk, 2005).

Des peptides générés par mutagenèse dirigée ont permis de montrer que la capacité de la nisine d'inhiber la biosynthèse du peptidoglycane était indépendante de son aptitude à former des pores (Wiedemann *et al.*, 2001). Les lantibiotiques de type A dissipent la force

proton-motrice par formation de pores et interfèrent avec la synthèse des peptidoglycanes alors que la plupart des lantibiotiques de type B agissent par inhibition de la synthèse des peptidoglycanes.

Néanmoins, certains forment également des pores dans la membrane des cellules cibles (**Bauer et Dicks, 2005 ; Patton et Van Der Donk, 2005**). La nisine, un lantibiotique de type A, interagit avec le lipide II au niveau du MurNAc (figure 4, tableau 1) tandis que la mersacidine, un lantibiotique de type B, interagit avec le GlcNAc du lipide II.



**Figure 4 :** Formation de pores membranaires par le complexe nisine-lipide II (**Chatterjee et al., 2005**).

Les lantibiotiques composés de deux peptides comme la *lacticine 3147*, agissent également par formation de pores dans la membrane des cellules cibles (**Mc Auliffe et Hill, 2001a**). La *lacticine 3147* a un spectre d'action large. Le peptide A1 a une activité qui est plus élevée en présence du peptide A2. Il a été proposé que la *lacticine 3147 A1* agit en se liant au *lipide II*, inhibant ainsi la synthèse des peptidoglycanes et permettant à la *lacticine 3147 A2* de former un pore dans la membrane de la cellule cible (**Morgan et al., 2005 ; Wiedemann et al., 2006**).

### 4.2. Mode d'action des 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 spécifique, la «mannose perméase», pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de

la membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule (Arous *et al.*, 2004 ; Vadyvaloo *et al.*, 2004 ; Bauer et Dicks, 2005).

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

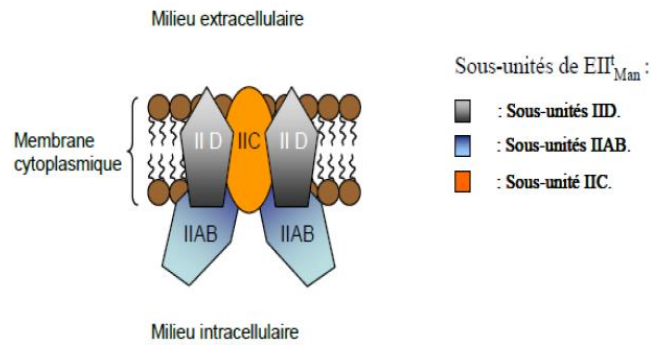
Toutes les bactériocines de classe IIa présentent au moins un ou deux ponts disulfures dans leur structure. La réduction de ces liaisons thioester (les ponts disulfures) par le  $\beta$ -mercaptoéthanol diminue l'effet antimicrobien de la bactériocine. Ceci montre clairement l'importance de ces ponts pour l'activité inhibitrice. Fimland *et al.* (2000) ont montré par des études de mutagenèse dirigée, que le second pont disulfure (24-44) de la *pédiocine PA 1* interagissait de façon spécifique avec une cible membranaire qui facilite l'insertion de la bactériocine dans le coeur hydrophobe de la membrane, en la rendant plus perméable.

Le caractère de molécules réceptrices pourrait varier selon les bactériocines de classe IIa (Eijsink *et al.* 2002). Chez *L. monocytogenes*, la perméase *ElIt* est formé d'un complexe de trois sous-unités, les sous unités *IIC*, *IID* et *IIA-IIB* codées par l'opéron *mpt*. Hechard *et al.* (2001) ont montré que le niveau d'expression de l'opéron *mpt* est en corrélation direct avec le niveau de sensibilité de *L. monocytogenes*. Ces résultats suggèrent que les sous-unités *IIC* et *IID* de la perméase *ElIt* pourraient être une cible membranaire pour les bactériocines de classe IIa (Dridier *et al.*, 2006).

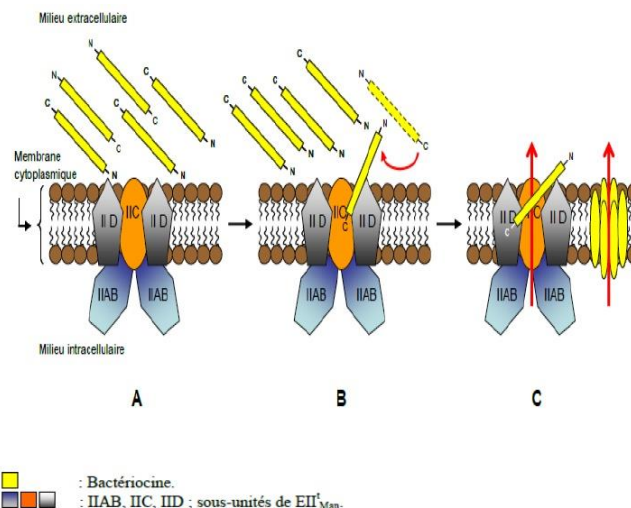
Les bactériocines de classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram+. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules, des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la force proton motrice. Les ions transportés sont spécifiques de la bactériocine (Oppegard *et al.*, 2007). Le ratio optimal d'activité entre les deux sous-unités est en général de 1:1 mais il est de 4:1 pour la *lactocine 705* (Castellano *et al.*, 2007 ; Oppegard *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 perméase») (Diep *et al.*, 2007).

*ElItMan* est une mannose perméase phosphotransférase impliquée dans le transport des sucres (glucose et mannose) chez les bactéries à Gram positif. Elle est formée de trois types de sous-unités dans lesquelles *MptAB* est une protéine localisée à la surface de la membrane cytoplasmique et *MptC* et *MptD* sont deux protéines transmembranaires (figure 5) (Diep *et al.*, 2007, Hechard et Sahl, 2002). Castellano *et al.* (2007) ont montré que les

deux peptides composant la *lactocine 705* ont des activités bien spécifiques. La *lactocine 705 $\alpha$*  interagit avec la surface de la membrane cellulaire et la déshydrate, ce qui permet à la *lactocine 705 $\beta$*  de former des pores. Les deux figures 5 et 6 montrent respectivement la structure de la mannose perméase et le mode d'action utilisé par les bactériocines de classe IIa et par les lactococcine A et B (classe IId) (tableau 1).



**Figure 5:** Schéma montrant la structure de la mannose perméase du système phosphotransférase (Diep *et al.*, 2007).



**Figure 6 :** Mode d'action utilisé par les bactériocines de classe IIa et par les lactococcines A et B (classe IId) (Diep *et al.*, 2007).

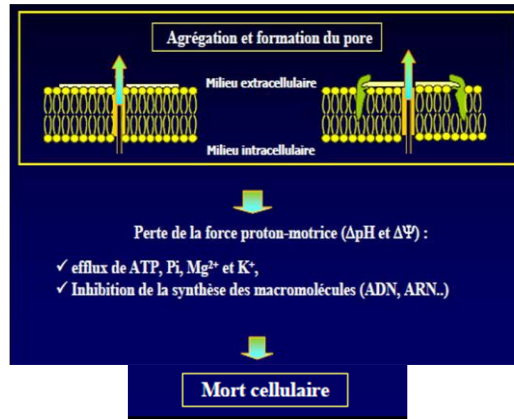
Ce modèle suggère que la bactériocine de classe IIa interagit directement avec les deux sous unités transmembranaires MptC et MptD lors du premier contact avec la membrane cytoplasmique de la bactérie cible (figure 6 A et B). L'interaction entre la bactériocine et MptC/MptD perturberai la conformation de EII<sup>Man</sup>, provoquant alors la fuite d'organites intracellulaires et la mort de la bactérie cible (figure 6 C) (Diep *et al.*, 2007). Yan *et al.* (2000), ont montré que l'activité de la *leucocine A* est corrélée à des interactions stéréochimiques avec une molécule cible chirale: l'énantiomère D. Il apparaît,

au regard de la littérature que cette molécule, EIItMan (récepteur) serait impliquée dans la voie du transport du mannose (**Ramnath et al., 2002 ; Hechard et al., 2001 ; Dalet et al., 2001**). EIItMan est une perméase permettant le transport de glucose et du mannose et son expression est contrôlée par les facteurs *ManR* et  $\sigma 54$ . Oscariz et Pisabarro (**2001**) ont étudié le mode d'action de la *céreine 8* (bactériocine de classe IIa) produite par *Bacillus cereus* Bc7.

L'interaction de la *céreine 8* avec la membrane lipidique commence par des interactions électrostatiques non spécifiques de la partie Nterminal cationique (hydrophile) avec les charges négatives de la membrane phospholipidique. La partie C-terminal hydrophobe intervient dans la formation des pores, qui est similaire à l'action des bactériocines de classe IIa. Gaussier et al. (**2002**) ont montré que l'association entre l'interface et la membrane affecte la conformation du peptide mais ne requière pas la présence d'un récepteur.

Le mécanisme d'action de la *pédiocine PA-1* a été élucidé par spectroscopie infrarouge. Les résultats ont montré que la *pédiocine PA-1* n'interagit qu'avec des vésicules chargées négativement (*Dimyristoyl-phosphatidylglycérol : DMPG*) grâce à son extrémité N-terminale. Le peptide affecte la région interfaciale des (*Dimyristoylphosphatidylcholine: DMPG*) mais pas le coeur hydrophobe. Cette insertion à l'interface est susceptible de contribuer à la déstabilisation de la bicouche lipidique qui conduirait par la suite à la mort cellulaire (**Gaussier et al., 2002**).

Ramnath et al. (**2004**) ont montré que l'expression hétérologue de l'opéron de *mptACD* de *L. monocytogenes* chez *Lactococcus lactis* rend ces souches plus sensibles aux bactériocines de classe IIa. Les travaux de la même équipe ont montré que l'expression de la sous unité *IIC* était suffisante pour induire la sensibilité de *Lactococcus lactis* aux bactériocines de classe IIa et par conséquent proposé la sous-unité *IIC* comme molécule cible des bactériocines de classe IIa. Suzuki et al. (**2005**) ont rapporté que la *piscicocine CS526*, une bactériocine de classe IIa, induit un efflux rapide de potassium (K<sup>+</sup>) à partir des cellules cibles, une réduction du niveau de l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) intracellulaire, ce qui causera la dissipation de la force proton motrice, provoquant le mort cellulaire. Le schéma de la figure suivante résume les effets des bactériocines sur les cellules cibles (tableau 1).



**Figure 7:** Mode d'action des bactériocines de classe IIa (Dridier, 2006).

**Tableau 1 :** conséquences cellulaires dues à l'action de peptides antibactériens

Bactériocines	Effets	Références
Acidocine 8912	Perturbation du potentiel transmembranaire Fuite d'isobutyrate et de glutamate	Tahara <i>et al.</i> , 1996
Auréocine 53	Arrêt de l'incorporation de molécules marquées (glucose, glutamate, thymidine) Arrêt de la synthèse des protéines, de l'ADN et des polysaccharides. Perturbation du potentiel transmembranaire. Fuite de potassium. Fuite de carboxyfluorescéine sur liposomes chargés négativement.	Netz <i>et al.</i> , 2002
Bavaricine MN	Perturbation du potentiel transmembranaire. Fuite de carboxyfluorescéine.	Kaiser et Montville, 1996
Entéroccine P	Diminution du potentiel de membrane. Pas d'effet sur la force proton-motrice (légère augmentation ATPase?). Disparition de l'ATP, pas de fuite mais hydrolyse. Fuite de carboxyfluorescéine sur liposome. Fuite de potassium. Pas de perturbation de la capture du phosphate ni fuite de phosphate. Accumulation intracellulaire de glutamate mais pas de fuite : pas de perturbation de la capture du glutamate.	Herranz <i>et al.</i> , 2001a ; Herranz <i>et al.</i> , 2001b
Lactostrepcine 5	Bloque la synthèse de l'ADN et des protéines. Diminution de la transcription de l'ARN Inhibition de la capture de l'uridine Diminution de la concentration en ATP intracellulaire et fuite d'ATP. Fuite de potassium.	Zajdel <i>et al.</i> , 1985
Mésentéricine Y105	Perturbation du potentiel transmembranaire. Fuite d'isobutyrate, de glutamate, de leucine et de lysine.	Maftah <i>et al.</i> , 1993
Nisine	Fuite d'ATP, d'ADP, d'AMP, de phosphoénolpyruvate, de carboxyfluorescéine, de phosphate, de calcéine, de lysine, de potassium et de glutamate Perturbation du potentiel transmembranaire.	Ruhr et Sahl, 1985; Stevens <i>et al.</i> , 1992; Garcera <i>et al.</i> , 1993; Abee <i>et al.</i> , 1994; Davies et Adams, 1994; Winkowski <i>et al.</i> , 1994; Winkowski <i>et al.</i> , 1996; Bennik <i>et al.</i> , 1997; Breukink <i>et al.</i> , 1997; Waite <i>et al.</i> , 1998b
Pédiocine PA-1	Perturbation du potentiel transmembranaire. Fuite de carboxyfluorescéine, de phosphate, de potassium, d'isobutyrate et de glutamate. Baisse de la concentration en ATP.	Chikindas <i>et al.</i> , 1993 ; Chen et Montville, 1995 ; Chen <i>et al.</i> , 1997b
Pédiocine JD	Perturbation du potentiel transmembranaire. Fuite de protons. Baisse de la concentration en ATP.	Christensen et Hutkins, 1992
Pisciocine CS526	Fuite de potassium. Hydrolyse de l'ATP intracellulaire. Perturbation du potentiel transmembranaire.	Suzuki <i>et al.</i> , 2005
Plantaricine A	Dissipation du potentiel de membrane. Fuite de potassium.	Kristiansen <i>et al.</i> , 2005

### **4.3. Mode d'action des bactériocines de classe III**

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

### **5. La production des 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 adsorbées à la surface de la bactérie productrice (Savijoki *et al.*, 2006), ce qui mène à sa baisse de concentration de bactériocines dans le milieu de culture. Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée.

Comme l'ont montré Moretro *et al.* (2000) pour la production de sakacin P par *L. sakei*, une même bactériocine peut être produite par des souches ou espèces différentes dont la capacité de production peut être variable. Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production (Verluyten *et al.*, 2004). Les températures et pH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux de la croissance.

La composition du milieu, tout particulièrement les concentrations des sources de carbone et d'azote, affecte 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 (Aasen *et al.*, 2000 ; Nel *et al.*, 2001 ; Todorov et Dicks, 2004 ; Verluyten *et al.*, 2004).

D'autre part, quelques études ont montré que la source de carbone utilisée et sa concentration est un facteur important dans l'optimisation de la production de bactériocines (Leal-Sanchez *et al.*, 2002 ; Leroy *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2007 ; Anastasiadou *et al.*, 2008).

### **6. Le conditionnement des bactériocines**

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. La

purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en œuvre de nombreuses techniques, à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle.

La stratégie souvent mise en œuvre est la semi - purification. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation (**Parente et Ricciardi, 1999**). La nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, est commercialisée sous une forme semi-purifiée.

### **7. Domaines d'application des bactériocines**

Les bactériocines peuvent être appliquées sous une forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat alimentaire. Les bactéries productrices peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires.

#### **7.1. Le typage bactérien**

Le pouvoir des bactériocines à inhiber certaines souches de la même espèce productrice et parfois des souches des autres espèces a été largement utilisé pour l'identification d'espèces de différents genres bactériens. La plupart des méthodes est basée sur l'inhibition d'une souche dite indicatrice ou sensible aux bactériocines. Cette méthode a été utilisée avec succès pour certaines bactéries Gram-négatif, telles que *Pseudomonas aeruginosa* (**Pitt et Gaston 1995**). L'utilisation des bactériocines a permis aussi à Merino et al. (**2000**) de différencier les souches de *Shigella*.

#### **7.2. Application de la bactériocine dans le secteur alimentaire**

L'utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire est avantageuse non seulement à cause de leur large spectre d'activité, mais aussi parce qu'elles sont non toxiques, facilement dégradables par les enzymes digestives et ne compromettent pas la prise des médicaments (**Ryan et al., 1998**). Du fait qu'elles sont des substances naturelles, l'emploi des bactériocines permettrait d'avoir des produits plus sains et réduirait l'utilisation des agents chimiques de conservation (**Harlander, 1993 ; Galvarez et al., 2007**).

L'utilisation combinée de bactériocines différentes, peut être aussi une approche attirante pour éviter le développement de souches résistantes. La combinaison de bactériocines avec des traitements physiques, comme le traitement à haute pression ou dans un champ électrique, offre une conservation plus efficace des produits alimentaires, fournissant ainsi une barrière complémentaire aux formes les plus résistantes comme les endospores bactériennes (**Galvarez et al., 2007**).

D'un point de vue législatif, une telle substance est considérée comme un additif alimentaire. Jusqu'à présent, seule la nisine, un lantibiotique, est acceptée comme additif alimentaire (E234) (**Guinane et al., 2005**). Tout comme la nisine, l'utilisation de la pédiocine dans la conservation des viandes, des salades et du fromage a été brevetée en Europe (**Chen et al., 1997a**).

Les bactériocines peuvent également être appliquées sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice. Cette préparation sera considérée comme un ingrédient fermenté. Elle contiendra la bactériocine, mais également d'autres métabolites microbiens tels que l'acide lactique. La pédiocine, une bactériocine de classe IIa, est commercialisée sous cette forme sous le nom ALTA 2341. Des essais ont été récemment fait avec la lacticine 3147, un lantibiotique (**Deegan et al., 2006**).

Un autre mode d'application des bactériocines consiste en l'immobilisation sur des cellules productrices dans des gels ou des films tels que l'alginate de calcium, la gélatine, la cellulose, les protéines de soja, des films de polysaccharides, etc. La bactériocine sera alors libérée dans le produit au cours de sa conservation. Depuis peu, des emballages en polyéthylène ou d'autres films plastiques contenant des bactériocines ont été développés. Ces emballages permettent de réduire la croissance des microorganismes pathogènes ou indésirables pouvant se développer en surface durant la conservation du produit (**Deegan et al., 2006**).

### **7.3. Domaines de la médecine humaine et vétérinaire**

L'utilisation des bactériocines n'est pas restreinte au domaine alimentaire, plusieurs études ont démontré que l'utilisation répandue des antibiotiques pour traiter et prévenir les infections, engendrait de sérieux problèmes de toxicité et de résistance. Les bactériocines ont été énormément appréciées comme étant des agents de thérapie naturelle, alternative aux antibiotiques, puisque l'effet inhibiteur des bactériocines pourrait réduire les effets nocifs engendrés par l'antibiothérapie.

Quelques lantibiotiques sont utilisables dans les applications médicales pour l'espèce humaine et animale. L'épidermine produite par *Staphylococcus epidermidis* (Allgaier *et al.*, 1986) est active contre *Propionibacterium acnes*, qui cause l'acné. Ce lantibiotique est utilisé dans la thérapie pour remplacer l'usage habituel de l'érythromycine et de la vitamine A. Cette application montre plusieurs avantages tels que l'absence de résistance aux lantibiotiques et leur faible coût de production par rapport aux antibiotiques. La nisine, quant à elle, peut être utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vu sa stabilité aux pHs acides et son activité contre *Helicobacter pylori* (De Vuyst et Vandamme, 1993). Trois autres bactériocines produites par *Lactobacillus johnsonii* LA1, *Lactobacillus casei* YIT 9029 et *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 montrent une activité inhibitrice contre l'agent pathogène gastrique humain *Helicobacter pylori* (Avonts et De Vuyst, 2001).

Dans le domaine de la médecine vétérinaire, les bactériocines pourraient être utilisées avec les ionophores dans une stratégie visant à prévenir l'apparition d'une résistance. L'utilisation d'une bactériocine à la place d'un antibiotique, par intermittence, aiderait à détruire les populations résistantes. Les ionophores antibiotiques ont un très large spectre d'action, donc ils peuvent agir sur à peu près la moitié de la flore naturelle trouvée dans le rumen des bovins, alors que les bactériocines sont par contre extrêmement spécifiques, ce qui permet, par exemple, de cibler seulement les bactéries qui dégradent des protéines alimentaires ou seulement celles qui produisent du méthane. Un autre avantage qui s'ajoute, tient au fait que les bactériocines sont des protéines non toxiques qui se digèrent facilement. Comme elles sont digérées par l'animal, il n'y a aucun risque qu'il reste des résidus dans la viande ou le lait. Par contre, les ionophores antibiotiques classiques ne sont pas digestibles, sont très toxiques et doivent être manipulés et administrés avec précaution.

### **7.4. Domaine agricole**

La protection des plantes contre les microorganismes phytopathogènes ainsi que la préservation des semences, sont les objets de l'exploitation des bactériocines en agriculture. Dans ce cas, les substances antibactériennes et substances antifongiques seront associées afin de lutter contre les ravageurs phytopathogènes (Paik *et al.*, 1997).

## **8. Les bactéries productrices de bactériocines**

De nombreuses souches bactériennes, à Gram positive et à Gram négative ont été décrites pour leurs capacités à produire des bactériocines (tableau 2). Pour les bactériocines

du genre *Bacillus* on peut citer : la subtiline produite par *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Klein *et al.*, 1993) similaire à la nisine, la coaguline secrétée par *Bacillus coagulans* I (4) (Le Marrec *et al.*, 2000), la bacillocine 490 produite par *Bacillus licheniformis* (Martirani *et al.*, 2002), la polyfermenticine SCD secrétée par *Bacillus polyfermenticus* (Lee *et al.*, 2000), l'entomocine et la thuricine produites par *Bacillus thurigiensis* (Cherif *et al.*, 2008), etc.

Cependant, les bactéries lactiques restent les meilleures candidates pour la production de bactériocines. Ces dernières sont l'objet d'une attention toute particulière depuis une dizaine d'années en raison de l'intérêt tant fondamental qu'appliqué qu'elles suscitent. Produites par de nombreuses espèces et dirigées contre des espèces homologues ou plus éloignées, comme *Listeria monocytogenes*, leur structure primaire a permis de définir une classification en trois classes (lantibiotiques, petites bactériocines, non lantibiotiques et bactériocines de grande taille). Leur mode d'action a été également analysé et différents modèles existent pour expliquer la perforation des membranes des cellules cibles de ces bactériocines. La formation de pores membranaires se fait via un récepteur protéique (non lantibiotique) ou par une insertion directe dans les bicouches phospholipidiques (lantibiotiques). Dans tous les cas, plusieurs molécules d'une même bactériocine agissent en synergie.

**Tableau 2:** Souches productrices de bactériocines (Gillor *et al.*, 2005).

Bactériocines	Souches indicatrices
<b>Lantibiotiques</b>	
Ancovenin	<i>Streptomyces</i> spp
Cinnamycin	<i>Streptoverticillum</i> and <i>Sytreptomyces</i> spp
Duramycin	<i>Streptoverticillum</i> and <i>Sytreptomyces</i> spp
Epidermin	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Gallidermin	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
Lacticin	<i>Lactococcus lactis</i>
Labthiopeptin	<i>Streptoverticillum cinnamonomum</i>
Mersacidin	<i>Bacillus subtilis</i>
Mutacin	<i>Streptococcus mutans</i>
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>
<b>Colicins</b>	
Ia, E1, E4,E7, E8, K et S8	<i>E. coli</i>
<b>Microcins</b>	
24, B17 et J25	<i>E. coli</i>
E294	<i>Klebsilla pneumoniae</i>
<b>Pyocins</b>	
S-35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>Gram (-) productrices de bactériocines</b>	
Serracin-P	<i>Serratia plymthicum</i>
Glycinicin	<i>Xanthomonas campestris</i>
Carotovoricin	<i>Erwinia carotovora</i>

# **Chapitre III**

## Les infections d'origine bactérienne

## **1. Introduction**

Chez l'homme sain, la très grande diversité d'espèces bactériennes et une certaine coopération métabolique permettent la stabilité écologique et l'homéostasie de la flore digestive. Dans leur état d'équilibre optimal les colonies bactériennes intestinales constituent une barrière efficace contre les invasions pathogènes.

Il est communément admis qu'un certain nombre de fonctions biologiques associées à la flore intestinale en relation avec son environnement jouent un rôle dans la protection contre la colonisation de l'intestin par des microorganismes pathogènes. Parmi ces fonctions on peut citer la compétition pour les nutriments et pour les sites d'adhésion à la muqueuse intestinale, la production de substances antimicrobiennes (bactériocines ou antibiotiques), l'abaissement du pH par production de métabolites acides gras à chaînes courtes et enfin la stimulation du système immunitaire. Certaines de ces activités peuvent avoir un effet direct sur la santé de l'hôte (**Choukri, 2007**).

La microflore intestinale exerce un rôle protecteur contre les germes pathogènes, ce rôle est appelé: effet de barrière (**Lievin et al., 2000**). La muqueuse intestinale joue un rôle fondamental dans la constitution d'une barrière physique entre le milieu externe (aliments, antigènes, bactéries...) et le milieu interne (**Lievin et al., 2000 ; Mullie et al., 2003**), elle assure deux fonctions de base qui sont opposées, la première c'est permettre le passage des nutriments, la deuxième, bloquer le passage des composés toxiques et de la flore nuisible (**Catto-Smith, 1996**).

Le bon fonctionnement de cette barrière assure le contrôle de la perméabilité intestinale dont les altérations, dans certains cas, peuvent être délétères (tableau 3). Par exemple, des études ont montrées que des bactéries comme *Salmonelles* sont capables de perturber le fonctionnement de cette barrière et par conséquent d'induire l'augmentation de la perméabilité intestinale (**Sable et al., 2000**). Souvent l'antagonisme est observé par des effets bactéricides, bactériostatiques, ou bactériolytiques. Les mécanismes d'interactions diffèrent et dépendent des propriétés et de l'activité des bactéries, leur nombre de population, et les conditions environnementales (**Fuller, 1989**).

Il serait donc impératif de rechercher des solutions alternatives permettant la restauration de l'équilibre de la microflore intestinale de l'hôte. L'utilisation des probiotiques s'est avérée une alternative prometteuse.

**Tableau 3:** Liste des différents agents et fréquence de rapportage dans les TIA déclarées en 2007 (Humphrey *et al.*, 2007 ; Swaminathan et Gerner-Smidt, 2007 ; Kérouanton *et al.*, 2007 ; Bettelheim, 2007 ; De Schrijver *et al.*, 2008).

Agents causals	Nombre d'épisodes	%	Agents causals	Nombre d'épisodes	%
Algues	0	0	Histamine	0	/
<i>Bacillus cereus</i>	7	9	Toxines microbiennes	0	/
<i>Campylobacter</i>	2	3	Norovirus	10	13
Produits chimiques	0	/	DSP-PSP	0	/
<i>Clostridium botulinum</i>	0	/	<i>Salmonella</i>	8	11
<i>E. coli</i> VTEC	2	/	<i>Shigella</i>	0	/
<i>Giardia</i>	0	3	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	7
Hépatite A	0	/	<i>Yersinia</i>	1	1

DSP-PSP: Diarrhetic shellfish poison -Paralytic shellfish poison.

## 2. Les infections digestives d'origine bactériennes

### 2.1. Définition

Différentes espèces bactériennes sont capables de provoquer des dysfonctionnements digestifs et surtout des dysfonctionnements intestinaux dont l'intensité dépend d'une part, de la pathogénicité de ces bactéries, et d'autre part de la réaction de l'hôte à l'infection (Choukri, 2007). Ces modifications digestives sont classées en trois grands types :

- ✓ Les affections touchant essentiellement l'intestin grêle proximal ;
- ✓ Les affections touchant principalement la zone iléo-caeco-colique ;
- ✓ Les affections résultant d'une diminution de la résistance à la colonisation.

Les affections du 2<sup>ème</sup> type correspondent à des atteintes inflammatoires du segment iléocaeco-colique, dues à des bactéries invasives capables de pénétrer dans les entérocytes, puis dans les ganglions lymphatiques mésentériques et ensuite éventuellement dans le foie, la rate, la circulation générale (Choukri, 2007).

Cette translocation est donc responsable d'infections systémiques. Parmi les bactéries responsables de ces phénomènes invasifs (tableau 4), ont été décrites sérovars de *Salmonella* (Contrefois *et al.*, 1986 ; De Rycke *et al.*, 1988).

L'abondance de ces bactéries est en relation directe avec l'hygiène, dans la plupart des cas c'est à l'origine d'intoxication alimentaire, en fait il existe deux catégories: l'infection alimentaire et l'intoxication alimentaire. Elles se différencient par la manière dont la maladie se manifeste (Collard *et al.*, 2005 ; Humphrey *et al.*, 2007 ; Swaminathan et Gerner-Smidt, 2007 ; Kérouanton *et al.*, 2007 ; Bettelheim, 2007 ; De Schrijver *et al.*, 2007).

**Tableau 4:** Tableau récapitulatif des principales causes de toxi-infections alimentaires (Humphrey *et al.*, 2007 ; Swaminathan et Gerner-Smith, 2007 ; Kérouanton *et al.*, 2007 ; Bettelheim, 2007 ; De Schrijver *et al.*, 2007).

Microorganisme ou toxine	Temps d'incubation	Symptômes	Produits à risque
<i>Salmonella</i>	6-48 heures à 72 heures (généralement 24)	Diarrhée, fortes fièvres, frissons, maux de tête, maux de ventre, vomissements. Les symptômes durent 2 à 3 jours, parfois plus.	Volaille, préparations à base d'œufs crus, viande de porc, produits laitiers, chocolat.
<i>Campylobacter jejuni</i> et <i>coli</i>	1 à 5 jours	Crampes d'estomac, selles liquides et abondantes (parfois sanguinolentes), douleurs musculaires, maux de tête, fièvre, nausées; durée : 7 à 10 jours.	Volaille, viande de porc, lait cru.
<i>Listeria monocytogenes</i>	3 à 70 jours	Etat grippal (fièvre et maux de tête), diarrhée, empoisonnement du sang, méningite, avortement spontané.	Fromage au lait cru, saumon cru et fumé, charcuterie : pâté, salami, jambon, crèmes glacées, beurre.
<i>E. coli</i> Vérotoxino-gène (VTEC)	3 à 9 jours	Symptômes qui peuvent persister plus d'une semaine; CH : colite hémorragique : d'abord une diarrhée très aqueuse, et ensuite diarrhée sanguinolente SHU : syndrome hémolytique urémique : diarrhée avec présence de sang, insuffisance rénale, mort.	Haché de bœuf, lait cru, fromage au lait cru.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3 à 7 jours	Syndromes de gastro-entéocolite, diarrhée aqueuse sévère, fièvre, maux de tête, pseudo-appendicite, inflammation articulaire.	Viande de porc, haché de porc, lait, eau.
Histamine	Quelques minutes à quelques heures	Rougeurs faciales, œdème du visage, nausées, vomissements, diarrhée, maux de tête, vertiges, goût de poivre dans la bouche, sensation de brûlure dans la gorge, démangeaisons, picotements de la peau, palpitations cardiaques.	Thon, anchois, maquereau, hareng, sardines.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	12 heures	Inflammation gastro-intestinale caractérisée par des diarrhées et des maux de ventre, parfois accompagnées de nausées, vomissements, fièvre et maux de tête.	Poissons crus ou insuffisamment cuits et produits de la mer.
<i>Shigella</i>	12-50 heures	Crampes au ventre, diarrhée sanguinolente, purulente ou glaireuse.	Crustacés, légumes, eau (produits de consommation manipulés par des hommes)
Toxines de <i>Staphylococcus aureus</i>	2-4 heures	Nausées, vomissements violents, pas de fièvre, maux de ventre, diarrhée, chute de tension.	Lait, fromage, crèmes glacées, viande, volaille, charcuterie, poisson, plats préparés, pâtisseries (aliments manipulés par des hommes).
Toxine émétique de <i>Bacillus cereus</i>	1-5 heures	Vomissements.	Céréales, riz, pâtes alimentaires (produits riches en amidon), plats préparés à base de pommes de terre
Toxine de diarrhée de <i>Bacillus cereus</i>	8-16 heures	Diarrhée et crampes au ventre.	Produits laitiers, poudre de lait, plats étuvés, épices et produits alimentaires fortement épicés (aliments riches en protéine).
Toxines de <i>Clostridium perfringens</i>	8-24 heures	Affections intestinales marquées par des coliques soudaines et diarrhée ensuite; généralement pas de nausées, de vomissements ni de fièvre; affection bénigne de courte durée.	Aliments refroidis trop lentement après cuisson, plats préparés, principalement à base de viande.
Toxines de <i>Clostridium botulinum</i>	8 à 24 heures	Vision double (diplopie), soif, constipation, étourdissements, difficulté de déglutition et d'élocution, problèmes respiratoires, paralysie, mort.	Conserves maison mal stérilisées, poisson, miel, charcuterie fine sans nitrites.

## **2.2. Les différentes infections d'origine bactérienne**

### **2.2.1. Salmonellose**

En pathologie humaine, les salmonelloses comprennent deux principaux types d'affections: Les salmonelloses humaines ou encore les fièvres typhoïde et paratyphoïdes due à *S. typhi*, *S. paratyphi* A, B et C, et Les salmonelloses d'origine animale, elles se présentent sous deux formes :

- ✓ La gastro-entérite à *Salmonella*: forme qui constitue un risque en animalerie d'expérimentation ;
- ✓ La Toxi-infection Alimentaire Collective (TIAC).

### **2.2.2. La gastro-entérite aiguë**

#### **2.2.2.1. Définition**

C'est une salmonellose, l'une des toxi-infections alimentaires la plus courante et la plus répandue. Elle représente une charge importante pour la santé publique. Les signes cliniques de la gastro-entérite aiguë surviennent entre 8 et 48 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé, le plus souvent dans la journée (**Leclerc et Mossel, 1989**). Cette gastro-entérite est provoquée par des Salmonelles (tableau 5) dites mineures (*S. typhimurium*, *S. enteridis*, *S. dublin*).

C'est un germe ubiquiste, la plupart sont des parasites intestinaux des animaux vertébrés et des oiseaux transmis à l'homme par le biais d'aliments contaminés. *Salmonella* peut survivre plus de 300 jours dans le sol, plus de 30 mois dans les crottins et plus de 9 mois dans l'eau (**Salmonellose et al., 2002**).

C'est un bacille Gram négatif de 1 à 2  $\mu$  de long, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche. Le génome de la bactérie est composé d'un ADN chromosomique et d'un ou plusieurs plasmides (**Amélie, 2006**).

**Tableau 5:** Aperçu des épisodes de *Salmonella* en 2007 (**Humphrey et al., 2007 ; Swaminathan et Gerner-Smidt, 2007 ; Kérouanton et al., 2007 ; Bettelheim, 2007 ; De Schrijver et al., 2007**).

<b>Province</b>	<b>Personnes Malades/hospitalisées</b>	<b>Lieu d'exposition</b>	<b>Sérotype/Lysotype</b>
Luxembourg	5/2	A la maison	<i>Enteritidis</i>
Brabant wallon	10/0	Au travail	<i>Enteritidis</i> PT23
Antwerpen	60/3	Restaurant	<i>Enteritidis</i>
Brabant flamand	12/3	Catering institutionnel	<i>Enteritidis</i> PT1
Bruxelles	3	Voyage à l'étranger	<i>Enteritidis</i>
Luxembourg	2/0	A la maison	<i>Typhimurium</i> var <i>Copenhagen</i> PT193

Les salmonelles se multiplient entre 7°C et 45°C avec un optimum à 35°C / 37°C. Elles supportent une gamme de pH allant de 4.5 à 9.0 avec un optimum de 6.5 à 7.5 (Amélie, 2006).

En fonction des acides utilisés, les sensibilités variables peuvent s'observer, ainsi l'utilisation d'acide citrique ou d'acide chlorhydrique autorise la croissance à pH 4.05 (en bouillon), pH 5.50 pour l'acide propionique; avec l'acide lactique cette limite s'établit à 4.40. Les salmonelles résistent parfaitement à la dessiccation et se développent bien dans des valeurs d'Aw de 0.945 à 0.999; pour des valeurs très faibles correspondant à des produits déshydratés (0.20), leur survie est de longue durée dans les aliments, les salmonelles peuvent se multiplier jusqu'à des valeurs d'Aw égales à 0.93 (Amélie, 2006).

Les salmonelles sont assez sensibles au NaCl, mais néanmoins leur présence a été reconnue dans des saumures à 3.2 %. La concentration maximale tolérée serait de 5.8 %. Elles sont sensibles aux nitrites. Ce sont des bactéries aéro-anaérobies facultatifs (Choukri, 2007).

#### **2.2.2.2. Classification**

**Classe:** *Gammaproteobacteria*

**Ordre:** *Entérobacterales*

**Famille:** *Enterobacteriaceae*

**Genre:** *Salmonella*

L'intérêt porté aux salmonelles n'est pas récent. Dès 1875, Koch et Pasteur s'y sont intéressés en mettant en place les bases de la bactériologie (Le Minor, 1992). Le bacille d'EBERTH (ou *Salmonella typhi*) fut décrit par Schroeter en 1886 comme agent de la fièvre typhoïde chez l'homme. Puis Klein isola en 1889 l'agent de la typhose aviaire (*S. gallinarum*). Le bacille de Loeffler (*S. typhimurium*) a ensuite été isolé à partir de sang de souris atteintes de salmonellose en 1890. Enfin, en 1894 Smith a décrit *Bacillus cholerae*, l'agent responsable du choléra du porc et l'a nommé *S. cholerasuis*. Le terme de *Salmonella* ne fut créé qu'en 1900 par Lignières, en l'honneur de Salmon, directeur des services vétérinaires des Etats-Unis à cette époque.

White en 1925 et Kauffmann à partir de 1930 établirent un système de classification basé sur l'identification antigénique des Salmonelles. De nos jours, il est démontré que le genre *Salmonella* comprend 3 espèces (Popoff et Bockemuhl, 2004):

- *Salmonella enterica* : composée de 6 sous-espèces (Le Minor, 1992) :

*Salmonella enterica* subsp *enterica*

*Salmonella enterica* subsp *salamae*

*Salmonella enterica* subsp *arizonae*

*Salmonella enterica* subsp *diarizonae*

*Salmonella enterica* subsp *hautenae*

*Salmonella enterica* subsp *indica*

- *Salmonella bongori* : qui correspond à l'ancienne sous-espèce bongori de *S. enterica*.

- *Salmonella subterranea*.

La principale (longtemps considérée comme la seule), *Salmonella enterica* comprend plus de deux-mille sérotypes, elle-même divisée en de nombreux sérovars (actuellement environ 2500 sont reconnus) sur la base de la diversité des antigènes (O) des lipopolysaccharidiques (LPS) et des protéines flagellaires (H) (enteritidis, derby, hadar, infantis, paratyphi, typhi, typhimurium, virchow, etc.) (**Popoff et al., 1994 ; Popoff, 2001 ; Brown, 1935**).

### **2.2.2.3. Mode de contamination**

La contamination se fait selon des modalités variables, dont les principales sont les suivantes :

#### **a. La contamination interhumaine**

Elle se produit à partir d'un malade ou d'un porteur sain. Les germes éliminés par les selles souillent les langes, et sont disséminés par les mains du personnel soignant, et peut-être aussi par voie aérienne. Ainsi s'explique la possibilité d'épidémies de crèches, d'hôpitaux d'enfants (**Perelman et al., 1990**). Un simple contact des doigts, par exemple avec une personne ayant manipulé des aliments contaminés peut transmettre la bactérie (**Shaffer, 2000**).

#### **b. La contamination par les aliments**

De nombreux animaux peuvent être infectés, en particulier les volailles, et transmettre les salmonelles par leur viande, les œufs... ils peuvent souiller les eaux par leurs excréments, d'où la contamination d'eau de boisson, de légumes ou de fruits lavés avec une telle eau (**Perelman et al., 1990**).

Beaucoup d'animaux, particulièrement les volailles et les porcs peuvent aussi être infectés sans présenter de signes cliniques (**Wray C. et Wray A., 2000**) ; ces animaux

jouent un rôle important dans la diffusion de l'infection entre les différents élevages (FAO/WHO, 2002 ; Wray C. et Wray A., 2000).

**c. Animaux familiers**

Dans les dernières années, beaucoup de cas de salmonellose chez les enfants ont été associés à des reptiles (lézards, tortues ou iguanes) qui leur servaient d'animaux familiers. D'habitude, la contamination s'effectue en touchant ces animaux, mais ce n'est pas toujours le cas, un contact indirect peut suffire à causer la contamination (Friedman et Torigian, 1998).

**2.2.2.4. Le développement de la maladie**

**a. Phase de l'adhésion des salmonelles**

Les germes pénètrent par voie digestive. La durée d'incubation est généralement de 1 à 2 jours et dépend de la dose ingérée, de la santé de l'hôte et des caractéristiques de souche de *Salmonella* (Brown, 1935).

Ce sont des bactéries entéro-pathogènes invasives (Bonjean-Tremolet, 1978), pénétrant l'intestin surtout à la terminaison de l'iléon, mais aussi au niveau du cæcum, après adhésion à la bordure en brosse à leurs récepteurs (RME, receptor-mediated endocytosis) (figure 8).

**b. Invasion des entérocytes**

Cette phase, cliniquement silencieuse, commence quinze minutes après l'infection, c'est le temps nécessaire pour que les salmonelles sécrètent les molécules impliquées dans l'invasion (Santos *et al.*, 2002). Elle débute par un effacement des microvillosités, une ondulation de la membrane plasmique de la cellule hôte, la formation d'une vacuole et un réarrangement du cytosquelette (accumulation d'actine) (figure 8) (Sansone, 1992).

**c. Dissémination systémique**

Après avoir franchi la barrière épithéliale, les salmonelles sont phagocytées par les macrophages de la lamina propria, leurs multiplication à ce niveau entraînent une réaction inflammatoire à polynucléaires neutrophiles, libérant des médiateurs (prostaglandines probablement) qui stimulent la sécrétion d'électrolytes et d'eau ainsi que la motilité intestinale, d'où la diarrhée (Wilmes-Reisinberg *et al.*, 1996).

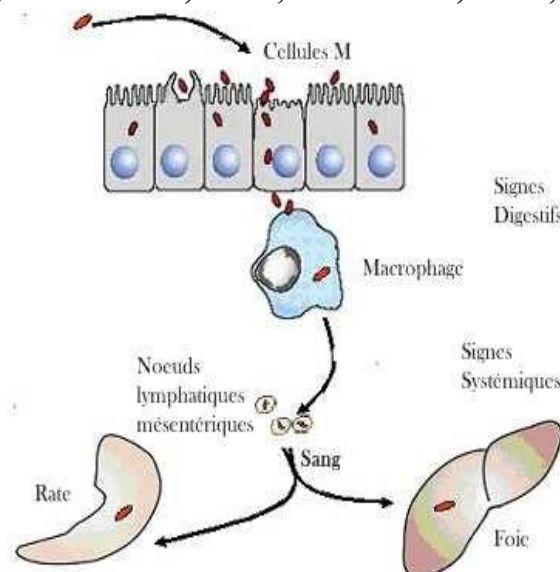
Les bactéries sont transportées jusqu'aux nœuds lymphatiques, d'après Yrlid (2001),

les cellules dendritiques transporterait également les salmonelles jusqu'à ces nœuds lymphatiques. Leur dissémination peut s'arrêter là avec destruction de la bactérie. Inversement, les salmonelles peuvent gagner, via le système réticuloendothélial, le foie et la rate où elles se multiplient (figure 8).

Ces deux étapes nécessitent l'assimilation de certains composants, systèmes de sécrétion de type HI 1 et 2 (TTSS), qui sont codées par des loci de l'ADN chromosomique, désigné comme îlots de pathogénicité de *Salmonella* (SPI) 1 et 2 (**Parkhill et al., 2001 ; Chiu et al., 2005 ; Mc Clelland et al., 2001**).

En dehors de la colonisation épithéliale intestinale et processus d'invasion qui est régi par SPI 1, une autre fonction importante est d'attirer les leucocytes phagocytaires au site d'invasion de *Salmonella* (**Gewirtz et al., 1999 ; Hensel et al., 1998 ; Hersh et al., 1999 ; Jones et Falkow, 1996**).

Pour une infection systémique, SPI2 est l'élément essentiel, permettant à *Salmonella* prolifèrent à l'intérieur des macrophages et de s'étendre à différents organes sensibles (**Bispham et al., 2001 ; Everest et al., 1999 ; Hensel et al., 1995 ; Shea et al., 1996**).



**Figure 8 :** Représentation schématique des différentes étapes de la pathogénie après infection orale par *Salmonella* sp (**Millemann, 2005**).

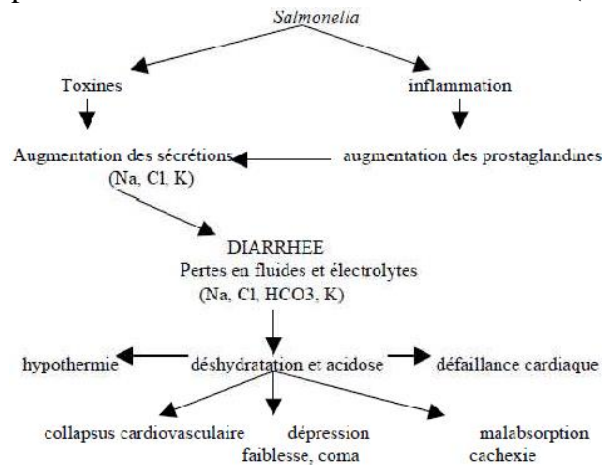
#### **d. Genèse des signes cliniques**

La physiopathologie des salmonelloses est assez mal connue.

##### **- La diarrhée**

Les troubles diarrhéiques les plus fréquents lors de salmonellose, sont assez mal expliqués dans leurs mécanismes intimes (figure 9). Les phénomènes inflammatoires

peuvent être particulièrement sévères dans certains cas comme le prouvent les lésions observées à l'autopsie. Ces lésions semblent liées au caractère invasif des salmonelles et au recrutement dans la paroi intestinale de cellules inflammatoires (**Amélie, 2006**).



**Figure 9:** Pathogénie de la diarrhée (**Millemann, 2005**).

#### **- Le choc**

Le choc est expliqué par l'action du LPS à activité endotoxinique. Il est relayé par une cascade de médiateurs (cytokines, lipides vasoactifs, amines vasoactives, complément, système de la coagulation...) (**Schelcher et Valarcher, 1997**). En phase d'état, une diminution de la pré-charge, liée à une redistribution du volume intra vasculaire, conduit à une chute de la pression artérielle avec hypoperfusion et hypoxémie tissulaire (**Amélie, 2006**).

Les conséquences respiratoires sont une hypertension pulmonaire et une augmentation du gradient en oxygène artério-alvéolaire. La réponse rénale est caractérisée par une anurie avec diminution de la réabsorption d'eau (**Amélie, 2006**).

#### **- L'avortement**

Deux hypothèses expliqueraient les avortements salmonelliques. La première hypothèse s'appuie sur la multiplication des bactéries dans le placenta ayant pour conséquence la naissance prématurée d'un veau porteur de salmonelles. La seconde hypothèse est fondée sur la production d'endotoxines par les salmonelles (**Foley et Schlafer, 1994**).

Les endotoxines induiraient la production de prostaglandines lutéolytiques ayant pour conséquence une concentration en progestérone insuffisante pour maintenir la gestation (**Foley et Schlafer, 1994**).

# **Chapitre IV**

## **Matériel et Méthodes**

## **Objectif**

Ce travail a été réalisé au laboratoire de recherche de Microbiologie et Biologie Végétale de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Mostaganem.

Cinq souches de bactéries lactiques et une souche pathogène ont été utilisées. Dont la réalisation des objectifs suivants :

- ✓ Le premier but est l'isolement et l'identification des bactéries utilisées ;
- ✓ Le deuxième but est de mettre en évidence l'effet antagoniste *in vivo* et *in vitro*, par l'action de bactériocines, des 5 souches de bactéries lactiques vis-à-vis de la souche pathogène; ce qui nous a conduit à travailler dans des conditions expérimentales éliminant l'effet conjugué des acides organiques (notamment l'acide lactique et l'acide acétique) et du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

- ✓ Le troisième objectif est l'étude des molécules de bactériocine, produites par les souches lactiques ; une extraction, une purification partielle et une caractérisation de ces bactériocines en utilisant une analyse UV-Visible, HPLC, IR et les comparer avec une molécule de référence la Nisine.

## **1. Isolement et identification des souches utilisées**

### **1.1. Les bactéries lactiques (productrices)**

#### **1.1.1. Origine des échantillons utilisés**

La souche *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427, c'est une souche de référence qui nous a été gracieusement fournie par le professeur Françoise Berthier de la station de recherche de l'INRA-France.

Les quatre souches lactiques restantes utilisées dans ce présent travail sont isolées d'un environnement: lait cru de vache. L'échantillon de lait provient de la station d'élevage Hassi Mameche de la région de Mostaganem, de vache laitière, son alimentation est saisonnière: elle s'effectue en hiver dans les étables (fourrages et complément nutritif à base de protéines). Durant les saisons chaudes, les vaches sont dans les pâturages. Le trayon est lavé soigneusement à l'eau tiède. Les premiers jets sont éliminés, puis 100mL de lait est recueilli dans un flacon stérile qui est immédiatement étiqueté et placé dans la glacière (4°C) pour être rapidement transporté au laboratoire pour l'isolement des bactéries lactiques.

Les genres à isoler sont mis en évidence sur les milieux suivants:

- Le milieu M17 (**Terzaghi et Sandine, 1975**) soit liquide, soit solide après addition d'agar 1,6% décrits par la Fédération Internationale du Lait. Ce milieu est employé pour la recherche des *Lactococcus* sp. L'ensemencement est réalisé en surface.
- Le milieu M.R.S (**De Man, Rogosa et Sharpe, 1960**) soit liquide, soit solide ; il est utilisé pour déterminer: *Leuconostoc* sp et Lactobacilles. Pour le premier genre l'ensemencement est effectué en surface et pour le deuxième genre en profondeur.

La composition de ces milieux figure dans l'annexe.

### **1.1.2. Isolement des souches lactiques**

La souche de référence est conservée dans le glycérol a -20°C. Avant son utilisation dans les tests d'inhibition, elle a été activée par transfert sur bouillon M17 (**Terzaghi et Sandine, 1975**) et incubée 16 à 18 heures à 30°C afin d'obtenir des cellules jeunes.

Pour les souches isolées, l'échantillon du lait était réparti dans deux flacons qui étaient alors incubés, l'un à 30°C et l'autre à 45°C, jusqu'à obtention d'un coagulum sous l'effet de l'acidification due à la flore lactique endogène mésophile ou thermophile. Dès coagulation, le coagulum était homogénéisé et des dilutions décimales en eau physiologique stérile étaient réalisées en triple exemplaire (**Karam et Karam, 2006**). Un volume de 0,1mL ou 1mL de chaque dilution a été utilisé pour l'ensemencement des milieux de culture M17 et MRS solide pour avoir des colonies bien séparées. Une incubation à 37°C pendant 48 heures à 72 heures.

Trois boîtes de Pétri par dilution (de  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$ ) sontensemencées.

Sur chacune des boîtes de l'isolement, nous classons les colonies en catégories selon leur aspect macroscopique. Dans chaque catégorie, nous choisissons aléatoirement une colonie supposée représentative parmi celles, observée pour réaliser les premiers tests d'orientation.

Un examen microscopique est effectué (coloration de Gram) et recherche de catalase, les isolats à Gram + et catalase – sont repiqués de façon alterne sur milieu M17 liquide et MRS liquide puis solide jusqu'à purification. La pureté des souches a été effectuée par un triple repiquage successif d'une colonieensemencée par la méthode d'épuisement de charge (méthode de quadrants).

La pureté de la souche est vérifiée par une observation microscopique ; l'aspect des colonies (forme, couleur, taille) et l'aspect caractéristique de la culture des bactéries lactiques en milieu liquide.

### **1.1.3. Identification des souches lactiques**

Afin de classer les isolats en genre, en espèce et en sous-espèce, les tests phénotypiques, biochimiques s'avèrent nécessaires pour mener à bien cette tâche.

#### **1.1.3.1. Identification phénotypiques**

Pour une identification préliminaire des quatre bactéries lactiques isolées, nous nous sommes basés sur les techniques décrites par (**Delarras, 2007**):

- Les caractères culturels (couleur, disposition forme et aspect), les colonies obtenues sont observées à la loupe binoculaire.
- Les caractères microscopiques : la forme caractéristique des cellules microbiennes, leur arrangement, la présence ou non de spores et leur type de Gram.

#### **1.1.3.2. Identification biochimique et physiologique**

Pour une identification des quatre bactéries lactiques, nous nous sommes basés sur les tests suivants :

##### **1.1.3.2.1. Tests physiologiques**

Nous avons réalisé une caractérisation physiologique des souches par le biais de trois tests :

- La mise en évidence de l'enzyme catalase ;
- La croissance des souches dans des conditions hostiles et ;
- Le développement des colonies à différentes températures.

##### **a. Croissance à différentes températures**

On aensemencé les isolats dans du MRS/M17 liquide et on incube à 15°C, 30°C, 37°C et 45°C pendant 24 heures à 48 heures. Ces tests vont nous aider à distinguer les souches mésophiles des thermophiles (**Carr *et al.*, 2002 ; Badis *et al.*, 2004 ; Harir *et al.*, 2009**).

##### **b. Culture sur milieux hostiles**

Culture sur milieu hypersalé: M17/MRS additionné de 6,5% de NaCl, estensemencé à partir de la suspension bactérienne, l'incubation est faite à 37°C pendant 48 heures ; toute réaction positive se traduit par la présence de troubles (**Carr *et al.*, 2002 ; Guiraud, 2003 ; Mathara *et al.*, 2004 ; Harir *et al.*, 2009**).

**c. Culture sur milieu alcalin**

Du bouillon M17/MRS dont le pH a été ajusté à 9,6 à l'aide d'une solution de NaOH (N/9) estensemencé et incubé à 37°C pendant 24 heures à 48 heures (**Carr *et al.*, 2002 ; Mathara *et al.*, 2004**).

**1.1.3.2.2. La croissance sur le lait «bleu de Sherman»**

Le milieu utilisé est le lait écrémé contenu dans des tubes à essais de 9mL ; 1mL d'une solution de bleu de méthylène à 0,3% et 0,1% sont ajoutés dans chaque tube. Le milieu estensemencé avec les souches à tester et incubé à 37°C durant 48 heures (**Carr *et al.*, 2002 ; Mathara *et al.*, 2004**). Seules certaines espèces appartenant aux genres *Lactococcus* sont capables de se développer.

**1.1.3.2.3. Tests biochimiques**

Nous avons réalisé une caractérisation biochimique des souches par le biais des tests suivants:

**a. Etude de l'hydrolyse d'esculine**

Esculine est un hétéroside, son hydrolyse libère l'aglycone qui est décelé par une réaction chimique en présence de sel de fer et donne une coloration noire au milieu de culture. Ce test a été réalisé sur milieu gélosé à la bile d'esculine, la lecture des résultats est effectué après incubation des cultures à 37°C pendant 72 heures (**Carr *et al.*, 2002 ; Mathara *et al.*, 2004**).

**b. Production d'Acétoïne**

Elle est détectée par la réaction de Voges Proskawer sur le bouillon lactosé et citaté Clark et Lubs. La mise en évidence de l'acétylméthylcarbinol (ou acétoïne) est obtenue après une culture de 72 heures à 37°C. 1mL de culture est additionné de 0,5mL de réactif à l' $\alpha$ -naphtol et 1mL de NaOH à 16%. Après agitation durant 10 min une coloration rose indique la présence de l'acétoïne. Cette substance se transforme en diacétyl sous l'action de la soude et se combine avec l' $\alpha$ -naphtol en complexe rouge (**Carr *et al.*, 2002 ; Mathara *et al.*, 2004**).

**c. Etude du métabolisme azoté (recherche de l'arginine déshydrogénase (ADH))**

Le milieu utilisé pour ce test contient un indicateur de pH qui est le pourpre de

bromocrésol. Les bactéries qui possèdent l'ADH (Arginine déshydrogénase) vont acidifier le milieu en fermentant le lactose (le BCP va virer au jaune), puis en déshydratant l'arginine, elles vont ré-alkaliner le milieu et de ce fait la couleur du BCP redeviendra violette. Les bactéries qui ne possèdent pas cette enzyme vont seulement acidifier le milieu (Thomas, 1973).

#### **d. Etude du profil fermentaire**

L'étude de la fermentation de quatorze sucres suivants a été effectuée : arabinose, galactose, lactose, maltose, mannitol, raffinose, saccharose, xylose, cellobiose, melibiose, tréhalose, mellidiose, rhamnose, mannose.

La suspension bactérienne est obtenue à partir d'une préculture sur milieu MRS/M17 qui est incubé à 37°C pendant 18 heures. 2mL de la culture jeune était centrifugé à 5000tr/min pendant 5min. Le culot contenant les cellules bactériennes est ensuite lavé deux fois avec de l'eau physiologique pour éliminer les traces du milieu de culture. Ensuite, 2mL de MRS/M17 + BCP (milieu MRS sans sucre avec un indicateur de pH : le pourpre de bromocrésol à 0,004% (p/v)) sont ajoutés au culot ce qui représente l'inoculum. 14 sucres sont répartis séparément dans des tubes à hémolyse à raison de 100µL (à la concentration finale de 0,5% (p/v)) de sucre dans 1mL de MRS/M17 BCP, auxquels on ajoute 100µL de l'inoculum (Manu *et al.*, 2002 ; Guessas et Kihal, 2004).

Les conditions d'anaérobiose sont assurées par ajout d'une couche d'huile de paraffine à la surface et l'incubation se fait dans des conditions optimales 37°C, pendant 48 heures (Guessas et Kihal, 2004). Le trouble du milieu accompagne le virage au jaune de l'indicateur de pH due à l'acidification du milieu, traduit la fermentation du sucre test. Ainsi, le profil fermentaire d'une souche donnée est comparé aux profils-types donnés par la littérature, ce qui permet l'identification de la bactérie (Carr *et al.*, 2002 ; Klein et Kush, 2004 ; Bekhouche et Boulahrouf, 2005 ; De Vos *et al.*, 2009 ; Harir *et al.*, 2009).

#### **e. Le caractère homo ou hétérofermentaire**

Il est mis en évidence sur le bouillon MRS ou M17 contenant le glucose comme source de carbone, menu au préalable d'une cloche de Durham. Après l'ensemencement des souches à étudier, le bouillon est, par la suite, mis à incuber à 37°C, les tubes sont observés dans un délai de 3 à 5 jours en fonction de l'aspect du milieu après inoculation (Sperber et Swan, 1976 ; Ho, 2008), les bactéries homofermentaires (*Lactococcus*) se

développent dans le milieu en utilisant le sucre mais ne produisent pas de gaz. Au contraire, les hétérofermentaires (*Leuconostoc* et le groupe *Betabacterium* du genre *Lactobacillus*) produisent du CO<sub>2</sub> qui se manifeste par la montée du bouchon de la gélose (Garvie, 1986 ; Schillinger et Lucke, 1989 ; Harir *et al.*, 2009).

## **1.2. La souche pathogène (indicatrice)**

### **1.2.1. Origine de la souche utilisée**

Pour les essais d'activité antibactérienne, un microorganisme pathogène a été distingué. *Salmonella* sp a été isolée sur milieu SS à partir de produits biologiques infectés, provient de la collection du laboratoire de recherche et d'Analyses Vétérinaire de l'université de Tiaret.

### **1.2.2. Identification phénotypique, biochimique et physiologique**

L'identification préliminaire de l'espèce est essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques (morphologie cellulaire), l'étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques (Holt *et al.*, 1994 ; Bossis *et al.*, 2000 ; Lévy *et al.*, 1992 ; Kovacs, 1956 ; Hildebrand, 1988).

La suspension bactérienne a été préparée dans de l'eau physiologique stérile (Lelliot et Stead, 1987). La concentration de la suspension bactérienne était déterminée par photométrie, en déterminant l'absorbance des cultures à 625nm (pour une concentration de l'ordre 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> cellule/mL, une absorbance de l'ordre de 0.08 à 0.1 équivaut 0,5 Mc Farland) (Ausubel *et al.*, 1991). Les principaux tests réalisés sont:

- Coloration de Gram (Bourgault et Lamothe, 1988) ;
- Métabolisme des glucides sur milieu TSI (Joffin et Leyral, 2006) ;
- Test de catalase (Guiraud, 2003) ;
- Test d'urée-indole (Guiraud, 2003) ;
- API 20<sup>E</sup>.

La lecture des réactions est réalisée visuellement, après incubation et juste après révélation des réactions selon les réactifs additionnés:

- Pour le test de VP: une goutte de VP<sub>1</sub> + une goutte de VP<sub>2</sub> (lecture après 10 minutes) ;
- Pour le test de TDA: une goutte de chlorure ferrique (lecture immédiate) ;
- Pour le test IND: une goutte du réactif de Kovack's (lecture immédiate).

## **2. La conservation des souches**

La conservation des souches peut être de courte ou de longue durée:

- Une conservation de courte durée se fait par ensemencement d'une colonie sur une gélose solide inclinée, après incubation à 37°C pendant 24 heures, les géloses sont conservées à 4°C pour quelques semaines (**Font de Valdez, 2002**).
- Une conservation de longue durée, est faite à partir des cultures de 18 heures (milieu liquide), les cellules sont récupérées par centrifugation, une fois le surnageant est éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot. Le milieu de conservation est un milieu liquide additionné de glycérol (v/v) à 40%, soit dans du lait écrémé (10%). Les cultures sont conservées en suspension dense et en tube éppendorf à -20°C (**Font de Valdez, 2002**).

Toutes les souches isolées sont conservées et entretenues dans leurs milieux.

## **3. Effet antibactérien des bactéries lactiques**

### **3.1. Test *in vivo***

#### **3.1.1. Etude de la survie des souches lactiques dans les conditions extrêmes du tube digestif**

##### **3.1.1.1. Effet des sels biliaires et pH**

La méthode utilisée est celle de Dilmi Bouras et al. (**2002**) qui consiste à préparer deux fractions de 5mL de bouillon M17/MRS dont la première est dépourvue de sels biliaires alors que la deuxième est additionnée de 0,3%. Chaque fraction va subir un ajustement du pH (par addition du HCl) à 1.0. A ces différentes fractions sont additionnées 3% d'inoculum de chaque souche lactique pure. Ces fractions sont ensuite incubées à 37°C où la résistance des ferments est contrôlée par un dénombrement sur milieu M17/MRS en boîtes de Pétri pendant les intervalles de temps suivant : 0 heure, 2 heures, 4 heures, 24 heures.

Le taux de survie est calculé par l'équation suivante:

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

##### **3.1.1.2. Effet de l'enzyme pepsine**

Dans un tube à essai, mettre 5mL d'une culture lactique pure, ensuite ajouter 1mg/mL de Pepsine. Ces fractions ont ensuite été incubées à 37°C où la croissance des ferments est contrôlée par dénombrements sur milieu M17/MRS en boîtes de Pétri pendant les intervalles de temps suivant : 0 heure, 2 heures, 4 heures, 24 heures.

### **3.1.1.3. Adhésion *in vitro* au tissu épithélial**

Ce test consiste à étudier la capacité des ferments à effet probiotique de s'adhérer à l'épithélium intestinal et le côlon. Pour se faire, la méthode décrite par Lin et Chien (2007) qui comporte 3 étapes, est impliquée:

#### **▪ Préparation des cellules épithéliales**

Avant de mettre en œuvre le test d'adhésion, un segment du côlon d'un poulet de chair a été ouvert et lavé avec du tampon phosphate salin stérile (PBS à pH 7.2), puis tenu dans le PBS à 4°C pendant 30 min pour être laver.

Par la suite, le tissu est repris, laver 10 fois avec du PBS stérile puis laisser au repos à 4°C pendant 3 heures. Les cellules ont été récupérées en grattant la surface tapissant le côlon par une lame stérile. Des dilutions décimales sont réalisées jusqu'à  $10^{-4}$ , cette suspension cellulaire a été examinée par microscope pour s'assurer qu'elle n'était pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales est approximativement de l'ordre de  $5.10^4$  cellules/mL.

#### **▪ Préparation de ferment jeune**

Des cultures bactériennes jeunes lactiques sont centrifugées à 6000rpm/10min et le culot de chaque souche est récupéré dans 2mL du PBS suivi d'une observation microscopique (Gx100) pour que le nombre soit approximativement de  $10^8$  cellules/mL.

#### **▪ Réalisation du test**

1mL de chaque culture est mélangé avec 1mL de la dilution  $10^{-4}$  de la suspension des cellules du côlon déjà préparée. Après incubation à 37°C pendant 40 minutes, une préparation de frottis et une coloration au cristal violet 0.5% pendant 5min a été réalisée pour observer l'adhésion au microscope optique. Le test est considéré comme positif si le nombre de bactéries adhérees est supérieur à 15.

### **3.1.1.4. Test d'hydrophobicité**

L'hydrophobicité est déterminée selon la méthode décrite par Iyer et al. (2010) ; des cultures lactiques jeunes de 18 heures ont été préparées dans le bouillon M17/MRS. Le culot bactérien a été récupéré par centrifugation à 12000rpm/5min suivie de deux lavages successifs puis resuspendu dans 1.2mL de tampon phosphate de magnésium (pH 6.5).

La densité optique initiale de la suspension est ajustée approximativement à 1.0 à 450 nm (DO initiale).

Ensuite 0.6mL du xylène sont ajoutés délicatement à 3mL de la suspension bactérienne puis incubés à 37°C pendant 10 min. Ce mélange est agité en utilisant un vortex pendant 2 min.

Après 15 min, la phase aqueuse est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur et on procède à la mesure de la densité optique finale (DO finale).

La différence de la densité optique est considérée comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%) calculé par l'équation suivante :

$$\% \text{ Hydrophobicité} = \text{DO}_{\text{initiale}} - \text{DO}_{\text{finale}} / \text{DO}_{\text{initiale}} \times 100.$$

### **3.1.2. Antibiogramme**

Ce test a pour but de synthétiser un milieu de culture sélectif qui sert à réaliser un dénombrement de nos souches lactiques au cours du test *in vivo*.

Pour réaliser ce test, chaque inoculum bactérien a été standardisé dont la DO<sub>660</sub> varie entre 0.08 et 0.1 puis ensemencée par inondation de la surface de la gélose Muller-Hinton, déjà coulée et solidifiée. Les boîtes de Pétri sont laissées sécher à température de laboratoire. Chaque boîte reçoit quatre disques d'antibiotiques à savoir: Tétracycline, Pénicilline, Chloramphénicol, Erythromycine.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré (**Leroy *et al.*, 2007**).

### **3.1.3. Réalisation du test**

La seule méthode qui permet une étude correcte des interactions bactériennes de type probiotique dans le tube digestif et leur bénéfice dans le traitement ou la prévention des inflammations intestinales a été montrée dans différents modèles animaux (**Madsen *et al.*, 2001 ; Schultz *et al.*, 2002**).

L'effet antagoniste *in vivo* de nos cinq souches lactiques choisis a été étudié sur une souche pathogène *Salmonella* sp. La première partie consiste au préalable en l'étude de la flore digestive des souris testées. La deuxième partie concerne des souris infectées qui soumises à des traitements comportant les espèces lactiques pures afin de suivre leurs évolution au niveau des crottes et leurs installation au niveau des organes (estomac, intestin) et de contrôler leurs effets en vers le germe pathogène.

**3.1.3.1. La mise en lots des animaux**

La souris, *Mus domesticus* sous ordre des myomorphes, est omnivore, elle est utilisée en raison de sa petite taille, sa prolificité et sa polyvalence. Les animaux albinos (blancs aux yeux roses) utilisées dans ce protocole étaient des souris conventionnelles de souche NMRI SWISS âgées 6 semaines et fournies par le service d'animalerie de l'institut Pasteur d'Alger (figure 10).



**Figure 10** : Cage d'élevage des souris.

Les conditions d'élevage de ces souris sont les suivantes:

- Habitat: cages métaboliques en plastique d'une surface au sol de 180cm<sup>2</sup> et une hauteur de 12cm ;
- Température: maintenue entre et 20 et 24°C ;
- Aération: locale aérée par une fenêtre vitrée ;
- Eclairage: local éclairé pendant 12 heures/jour ;
- Aliment: aliment de croissance fournis par l'office national d'aliment de bétail (ONAB de Mostaganem). L'aliment est administré selon le poids des animaux: 4 à 6g/jour d'aliment pour une souris qui pèse 10 à 20g ; et 6 à 10g d'aliment pour une souris de 20 à 50g.

Pour réaliser ce travail, nous avons prévu à:

- Groupe 1: témoin de 2 souris. Les souris ne sont pas traitées par les bactéries lactiques et elles ne sont pas infectées par la souche pathogène et reçoivent aliments de bétail normal ;
- Groupe 2, 5, 7, 9, 11 : de 4 souris ; elles sont soumises à une phase d'implantation par 200µL de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427, *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Leuconostoc* sp, *Lactobacillus plantarum* respectivement pendant trois jours, 2 fois par jour;
- Groupe 3: de 4 souris, elles sont soumises uniquement à une phase d'infection par 200µL de *Salmonella* sp pendant trois jours, 2 fois par jour ;

- Groupe 4, 6, 8, 10, 12: de 5 souris, elles sont soumises à une phase d'implantation par 200µL de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427, *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Leuconostoc* sp, *Lactobacillus plantarum* respectivement pendant trois jours, 2 fois par jour puis une phase d'infection par 200µL de *Salmonella* sp pendant les trois jours qui suivent, 2 fois par jour (Hee Ji Lee *et al.*, 2009).

### **3.1.3.2. La préparation des souches et leurs milieux de dénombrement**

Une culture jeune (18 heures) de la souche indicatrice (*Salmonella* sp) et les cinq souches productrices a été préparée avant chaque utilisation sur milieu BN liquide et M17/MRS liquide.

La dose utilisée de chaque souche (indicatrice et productrice) a été mesurée par le spectrophotomètre (un taux > de 10<sup>8</sup> UFC), parce que le niveau minimum de bactéries probiotiques nécessaires pour conférer un effet bénéfique a été estimé entre 10<sup>6</sup> et 10<sup>8</sup> UFC/g contenu intestinal (Conway *et al.*, 1987).

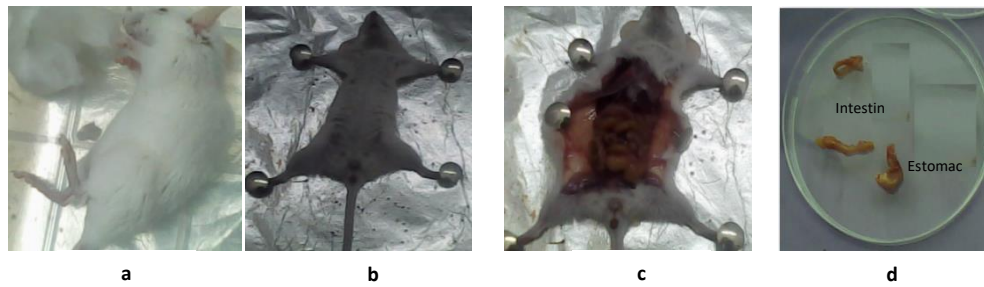
Les souches lactiques bien connues qui étaient résistantes à la Pénicilline et Chloramphénicol ont été sélectionnées sur gélose M17/MRS complétement avec ces antibiotiques. Ce milieu sélectif a été utilisé par la suite pour le dénombrement avant (au jour 0) et après le gavage (jour 4, jour 7) afin d'évaluer les niveaux de flore normale capable d'une croissance sur des milieux sélectifs (Hee Ji Lee *et al.*, 2009).

### **3.1.3.3. Le dénombrement de *Salmonella* sp et les souches lactiques utilisées**

Le dénombrement a été effectué en utilisant les crottes et les organes (Estomac, Intestin) des souris de chaque groupe aux jours 0, 4, 7 et 10, après la dernière dose de bactérie lactique (groupe 1, groupe 5, groupe 7, groupe 9, groupe 11) et la dernière dose infectante de *Salmonella* sp (groupe 1, groupe 3, groupe 4, groupe 6, groupe 8, groupe 10, groupe 12) (Hee Ji Lee *et al.*, 2009).

Les crottes de chaque groupe sont recueillies dans des tubes stériles, puis on a réalisé après chaque prélèvement des dilutions décimales dans de l'eau distillée stérile jusqu'au 10<sup>-5</sup> (Hee Ji Lee *et al.*, 2009).

Les organes cibles d'une souris de chaque groupe ont été recueillis dans des conditions stériles afin de réaliser le dénombrement (figure 11). Après chaque prélèvement, des dilutions décimales dans de l'eau distillée stérile jusqu'au 10<sup>-5</sup> ont été effectuées (Hee Ji Lee *et al.*, 2009).



**Figure 11 :** Les étapes pour recueillir les organes des souris. a : Anesthésie de la souris par le chloroforme, b : fixation de la souris, c : souris saine après dissection, d : organes d'une souris saine.

### **3.2. Test *in vitro***

Afin de détecter le spectre d'activité des espèces lactiques, nous avons testé les souches contre le germe indésirable Gram négatif *Salmonella* sp. L'activité antimicrobienne est déterminée pour chaque souche lactique sélectionnée (**Schillinger et Lucke, 1989**).

#### **3.2.1. Test d'activité sur milieu solide, méthode de diffusion en puits**

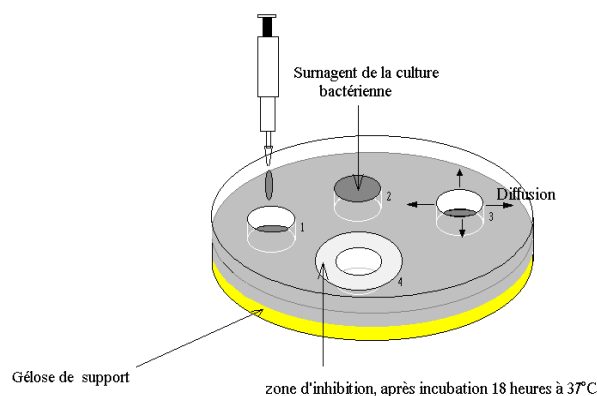
Deux méthodes sont utilisées, directe qui repose sur un contact cellulaire et indirecte qui consiste à tester le surnageant et culot de cultures bactériennes lactiques sur la cellule bactérienne indicatrice.

##### **3.2.1.1. Méthode directe**

Il s'agit de détecter des zones d'inhibition après co-culture entre les souches à tester avec la souche indicatrice. Le test est effectué selon la méthode de diffusion en puits décrite par Tagg et Mac Given (**1971**).

Les boîtes qui contiennent la gélose nutritive ont été inondées par la souche pathogène (indicatrice), puis les puits sont remplis par 60 à 80µL d'une culture bactérienne jeune (productrice), suivi par une incubation de 24 heures à 37°C.

Les boîtes sont examinées s'il y a présence ou non de zone d'inhibition, sa présence correspond à un arrêt de la multiplication de la souche indicatrice dans la partie de la gélose contenant une (des) substance(s) antimicrobienne(s) produite(s) par la souche testée (figure 12).



**Figure 12:** Méthode de diffusion en puits pour la recherche des substances antimicrobiennes.

### 3.2.1.2. Méthode indirecte

La méthode indirecte (Tahara et Kanatani 1996 ; Barefoot et Klaenhammer, 1983) permet de mettre en contact le surageant et le culot de la souche productrice des substances antimicrobiennes avec la souche test. La méthode utilisée est celle de la diffusion sur gélose à partir des puits décrite par Tagg et Mac Given (1971).

Pour se faire, les étapes ci-après ont été suivies :

#### a. Préparation de pré-culture de la bactérie test (pathogène)

Avant l'utilisation de la souche pathogène, celle-ci est cultivée à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  sur 10mL de bouillon nutritif, pendant 18 à 24 heures. La culture d'une nuit obtenue servirait d'inoculum.

#### b. Préparation du surageant actif

Ensemencer chaque souche lactique dans 1mL de bouillon MRS/M17, incubé à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24 heures, repiquer sur 10mL par le bouillon MRS/M17, ajouter 2mL d'huile de vaseline stérile pour assurer l'anaérobiose, incubé à  $37^\circ\text{C}$  pendant 18 heures.

Aspirer l'huile de vaseline avec une micropipette, centrifuger à 6000 tours/min pendant 30min. Le surageant récupéré est filtré sur une membrane Porafil de porosité  $0,45\mu\text{m}$  pour éliminer les cellules bactériennes. Le culot est lavé deux fois avec de l'eau distillée, sécher puis additionner de méthanol selon un rapport de volume 2/3. Le méthanol est utilisé pour l'extraction éventuelle de la bactériocine. Le mélange est centrifugé à 10000 trs/min pendant 20 minutes et à  $+4^\circ\text{C}$ . Le surageant obtenu est appelé extrait cellulaire (Labioui *et al.*, 2005).

On a divisé le surnageant obtenu en deux volumes, le premier a été neutralisé par NaOH 1N de façon à obtenir un pH de 6.50 et le deuxième on l'a laissé à pH initial.

### **c. Réalisation du test**

Les boîtes sont recouvertes par la souche pathogène initialement préparée (DO=0.08 à 625nm (**Ausubel et al., 1991**)), des puits ont été creusés dans des boîtes de Petri, avec trois répétitions à des temps différents, puis un volume de surnageant est mis dans ces puits (surnageant filtré, surnageant filtré et neutralisé, eau distillée stérile (témoin négatif), culot).

Laisser diffuser sur la paillasse durant 1 heure. Après incubation de 24 heures à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition (Zi) apparaissant autour des puits sont mesurés (moyenne de deux diamètres perpendiculaires). L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1mm (**Schillinger et Luke, 1989**). La détermination du diamètre d'inhibition se fait par la formule suivante :

$$\mathbf{Zi = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue} - \text{diamètre du puits (5mm)}}$$

Cette méthode a été testée avec les surnageants des souches ayant montré un pouvoir inhibiteur par la méthode directe.

### **3.2.2. Caractérisation de l'agent inhibiteur**

Les bactéries lactiques sont capables d'inhiber d'autres bactéries du même groupe ou d'autres genres par la production d'un grand nombre d'agents inhibiteurs. Parmi lesquels nous pouvons citer principalement les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène ou les bactériocines. La recherche de la nature de l'agent inhibiteur est devenue indispensable.

L'utilisation des enzymes protéolytiques, la trypsine et la pepsine, permet de déterminer la nature de la substance inhibitrice ; la sensibilité thermique de la substance a été testée par un chauffage à 100°C ; influence du pH et sels biliaries. La présence de la zone d'inhibition après chaque traitement indique la stabilité de la substance inhibitrice.

#### **3.2.2.1. Effet des enzymes protéolytiques**

Les bactéries lactiques sécrètent les bactériocines dans le milieu extracellulaire d'où l'intérêt de rechercher de ces substances dans les surnageants de culture. Les bactériocines qui sont des substances protéiques, sont dégradées par des enzymes protéolytiques (**Klaenhammer, 1993**).

Cette étape nous donnera une idée sur les séquences en AA des bactériocines, car les deux enzymes protéolytiques utilisées (pepsine et trypsine) ont des sites de coupures différents. La trypsine coupe à la droite des acides aminés basiques et la pepsine à gauche des acides aminés neutres.

**a. Préparation des enzymes (Benkerroum *et al.*, 2000 ; Chen et Hoover, 2003)**

**Trypsine**

- Préparer le tampon phosphate (0,1M, pH 6) ;
- Peser 20mg d'enzyme avec une balance de précision ;
- Dissoudre l'enzyme dans 10mL du tampon phosphate ;
- Filtrer avec un filtre de 0,02 $\mu$ m (stérilisation) ;
- Conserver à +4°C.

**Pepsine**

- Préparer une solution d'HCl (0,02M, pH 2) ;
- Peser 20mg d'enzyme avec une balance de précision ;
- Dissoudre l'enzyme dans 10mL de la solution d'HCl préalablement préparée ;
- Filtrer avec un filtre de 0,22 $\mu$ m ;
- Conserver à +4°C.

**b. Technique**

Mélanger 1mL du surnageant neutralisé avec 1mL de la solution enzymatique (Rapport volumique 1:1) pour avoir une concentration finale en enzymes de 1mg/mL. Incuber 2 heures à 37°C dans un bain marie, afin de permettre le contact avec l'enzyme (Cocolin et Rantsiou, 2007). Charger les puits avec 70 $\mu$ L des solutions suivantes : tampon, tampon avec enzyme, surnageant sans enzyme et surnageant avec enzyme des boîtes déjàensemencées par la souche pathogène. Laisser diffuser 1heure à la paillasse, puis incuber 24 heures à 37°C.

**3.2.2.2. Effet de la température**

Pour l'effet de la chaleur sur l'activité des extraits, un surnageant de chaque culture des souches bactériocinogènes a été chauffé à 100°C pendant 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 60 minutes et 75 minutes. Après refroidissement, l'activité antibactérienne a été vérifiée vis-à-vis de la souche pathogène par la méthode de diffusion en puits (Tagg et Mc

**Given, 1971**). La lecture des résultats consiste à faire la comparaison entre ceux obtenus avec le surnageant traité et le surnageant non traité (**Ten Brink *et al.*, 1994 ; Casla *et al.*, 1996**).

### **3.2.2.3. Effet du pH et sels biliaires**

La méthode utilisée est celle de Dilmi Bouras *et al.* (**2002**) qui consiste à préparer une fraction de 5mL du surnageant des bactéries productrice additionnées de 0,3% sels biliaires. Ensuite les valeurs du pH sont réajustées à: 2,5 (représente la valeur de pH de l'estomac à jeun), 4,3 (valeur du pH de l'estomac au moment juste après le repas) et 6,5 (représente le pH au niveau des intestins (proche du pH du milieu de culture) en utilisant du HCl ou du NaOH à 3N.

Après 2 heures d'incubation à 37°C, on a testé l'activité des surnageants traités vis-à-vis de la souche indicatrice par la méthode de diffusion en puits (**Tagg et McGiven, 1971 ; Vinod Kumar *et al.*, 2006**).

## **4. Extraction et purification partielle des peptides bioactifs**

La purification d'une substance quelconque, synthétisée par une cellule vivante, est une tâche difficile à réaliser, du fait qu'elle se trouve dans un milieu complexe. Ce milieu contient d'autres éléments qui peuvent être nécessaires pour son activité.

Nous avons essayé de purifier notre bactériocine, en utilisant deux méthodes: une concentration au sulfate d'ammonium, adsorption-désorption suivie par une filtration par membrane à dialyse de porosité d'environ 3,300 Da (Çpectrum Spectra/PorB) et enfin une lyophilisation.

### **4.1. Méthodes Adsorption-Désorption**

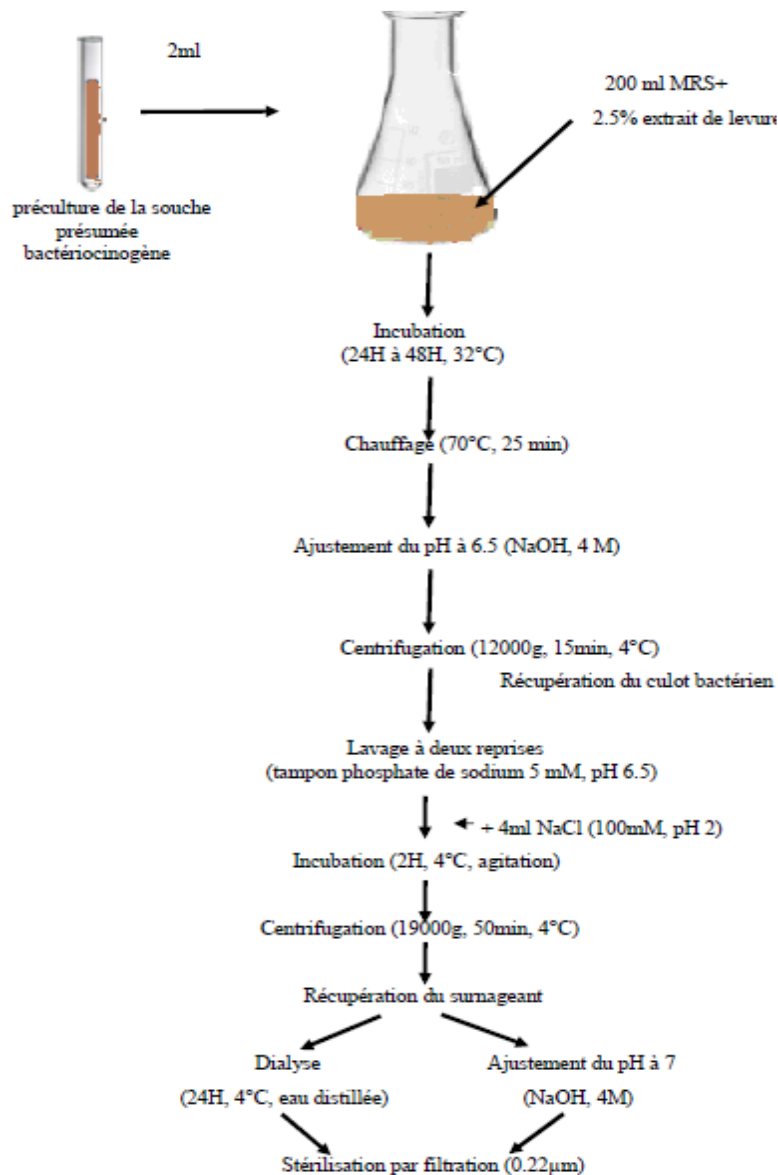
Afin d'extraire et de purifier la fraction bactériocinique, une méthode d'extraction simple, fondée sur l'emploi de (NaCl) a été développée. Cette méthode d'extraction préconisée par Yang *et al.* (**1992**) a pour principe l'adsorption et la désorption des molécules sur les cellules productrices de bactériocines.

Un volume de 200mL de bouillon MRS ou M17 supplémenté d'extrait lactique a été ensemencé par 1% d'une préculture à 37°C de la souche lactique présumée bactériocinogène. Après 24 heures d'incubation à 37°C. Un chauffage à 70°C durant 25min au bain-marie a été effectué pour détruire les cellules et désactiver les enzymes

protéolytiques puis le pH a été ajusté à 6.5 par le NaOH (4N) pour permettre l'adsorption des bactériocines à la surface des cellules.

Les cultures sont par la suite soumises à une centrifugation (6000 tours, 15 min) et le culot récupéré est lavé deux fois avec le tampon phosphate de sodium 5 mM (pH 6.5) pour éliminer les protéines du milieu de culture, puis dissout dans 4mL de NaCl (100 mM, ajusté à pH 2) avec agitation modérée à 4°C pendant deux heures, ceci pour permettre la désorption des bactériocines.

Une dernière centrifugation (6000 trs/30 min) est réalisée et le surnageant contenant les bactériocines est récupéré, dialysé contre de l'eau distillée (24 heures, 4°C), stérilisé par filtration sur membrane (0.22µm) ; les étapes de ce procédé sont montrées dans la figure 13.



**Figure 13 :** Protocole d'adsorption-désorption (Yang *et al.*, 1992).

#### **4.2. Méthode de précipitation au sulfate d'ammonium**

La précipitation au sulfate d'ammonium est la technique la plus utilisée pour la concentration des protéines destinées à la purification, le sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  est le sel de choix en le comparant à d'autres sels à effet précipitant, il permet de maintenir la structure de la protéine donc son activité, de plus il est fortement soluble et pas coûteux (**Hata *et al.*, 2010**).

Après deux pré-cultures successives en MRS ou M17 à 37°C, la souche productrice de bactériocine est cultivée 24 heures dans 1 litre de leur milieu. Un litre de surnageant est récupéré par une centrifugation à 6000rpm pendant 30min, et les protéines sont ensuite précipitées par ajout progressif de 36.1% (P/V) du sulfate d'ammonium en poudre. Après 24 heures de précipitation à 4°C, un culot est obtenu par centrifugation est dissout dans 4mL du tampon phosphate de sodium (0.1M, pH: 6). Il est solubilisé dans de l'eau pH 5 (**Guyonnet *et al.*, 2000**).

Le mélange est alors dialysé en utilisant des tubes spécifiques contenant une membrane de 3,5kDa contre de l'eau distillée pendant 24 heures à 4°C avec au moins trois changements par jour. La préparation dialysée a été concentrée par une lyophilisation pour analyser l'activité de la bactériocine (**Jiménez-Díaz *et al.*, 1993**).

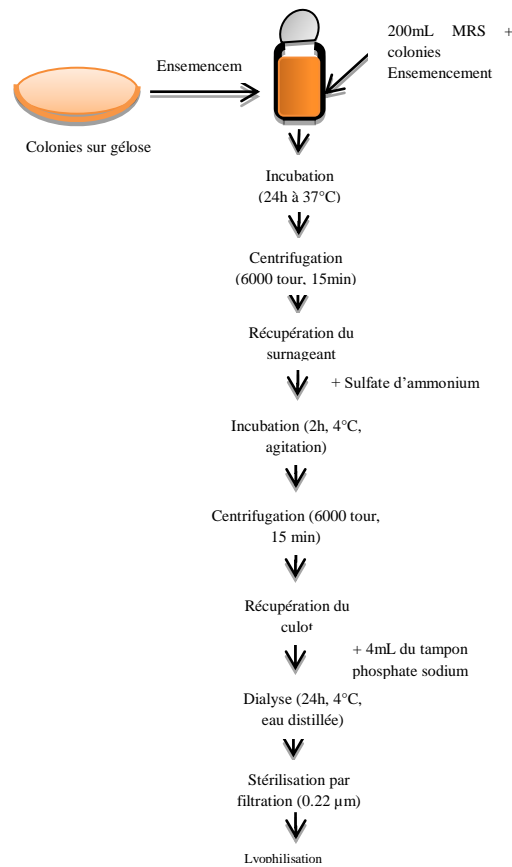
Après récupération des solutions dialysées et filtrées, on procède à une lyophilisation afin d'éliminer l'eau.

Après l'obtention du lyophilisat, il est orienté pour faire les analyses suivantes:

L'effet inhibiteur envers les deux souches pathogènes a été confirmé, en utilisant la méthode de diffusion en puits décrite par Tagg et Mc Given (**1971**).

La solution ainsi obtenue est soumise à une dialyse à 4°C contre de l'eau distillée pendant une nuit avec agitation pour éliminer le sel, stérilisée par filtration sur membrane (0.22  $\mu\text{m}$ ) puis lyophilisée afin d'éliminer l'eau puis conservée jusqu'à son utilisation (figure 14). L'effet inhibiteur envers les deux souches pathogènes a été confirmé, en utilisant la méthode de diffusion en puits décrite par Tagg et Mc Given (**1971**).

Les fractions présentant une activité bactéricides sont réunies pour l'étape suivante.



**Figure 14 :** Protocole de précipitation au sulfate d'ammonium.

## 5. Effet inhibiteur des extraits trouvés par les deux méthodes d'extraction

La révélation du spectre d'activité antimicrobienne de chaque extrait lactique obtenu par adsorption-désorption et précipitation au sulfate d'ammonium a été réalisée sur la bactérie pathogène Gram négatif *Salmonella* sp, selon la méthode de diffusion en puits qui a été préconisée par Tagg et Mac Given (1971).

Laisser diffuser sur la paillasse durant 1 heure. Après incubation de 24 heures à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition (Zi) apparaissant autour des puits sont mesurés (moyenne de deux diamètres perpendiculaires). L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1mm (Schillinger et Luke, 1989). La détermination du diamètre d'inhibition se fait par la formule suivante :

$$Zi = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue} - \text{diamètre du puits (5mm)}$$

## 6. La cinétique de croissance de *Salmonella* sp

### 6.1. En culture pure

L'étude de l'évolution de la croissance des souches utilisées (lactiques et pathogène) a été effectuée dans le milieu M17/MRS/BN à pH 6.8, incubation à 37°C. Des

prélèvements stériles ont été effectués périodiquement (chaque 20min) afin d'évaluer la croissance (DO) à 620 nm (**Allouche *et al.*, 2010**).

Ainsi, la courbe  $DO_{620nm} = f(t)$  a été tracée.

## **6.2. En culture mixte**

Un enrichissement de la souche pathogène dans le BN a été fait ; puis, la croissance bactérienne est mesurée par le spectrophotomètre à 620 nm toutes les 20min. Après la 1<sup>ère</sup> heure, 1mL de chaque extrait lactique lyophilisé trouvé par les deux méthodes d'extraction avec pH modifié (2,5, 4,3, 6,5) a été ajouté à la culture de la bactérie pathogène, puis on a continué la mesure de la DO chaque 20 min jusqu'à 72 heures, l'incubation se fait à 37°C.

Ainsi, la courbe  $DO_{620nm} = f(t)$  a été tracée.

## **7. Caractérisation des peptides bioactifs**

### **7.1. Spectroscopie UV-visible**

On a préparé une solution tampon d'acétate de sodium (0,068g/100mL d'eau distillée/pH= 5) ; en pesant 0,005g d'extrait lactique lyophilisé et en l'ajoutant dans 5mL du tampon déjà préparé. Après l'obtention d'une solution homogène, on a effectué une analyse par spectre ultraviolet de 200nm à 400nm afin de détecter la présence des peptides bioactifs.

Ainsi, la courbe  $DO = f(\lambda_{200-400nm})$  a été tracée (**Fernandez et Pizzaro, 1997 ; Delaney *et al.*, 2001 ; Mavrodi *et al.*, 2001 ; Veselova *et al.*, 2008**).

### **7.2. Analyse par HPLC**

Nous avons utilisé la technique de chromatographie liquide haute performance (CLHP) pour le dosage des peptides bioactifs. Ces molécules peuvent être séparées sur la phase stationnaire. Ces molécules sont détectées par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet. Le test est effectué par rapport à une molécule standard analysée dans les mêmes conditions.

Le lyophilisat a été repris par 250 $\mu$ L d'un tampon d'acétate d'ammonium 25mM, pH 6,5 renfermant 10% (v/v) d'acétonitrile (ACN) puis purifié par chromatographie liquide haute performance (CLHP) C18 sur une colonne Inertsil ODS2 (Interchim, 5 $\mu$ m, 250mm x 4,6mm) à l'aide d'une élution isocratique d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,1% (v/v) dans H<sub>2</sub>O 100% pendant 5 min puis d'un gradient d'acétonitrile (ACN) de 0 à 100% pendant 30

min avec un débit de 1mL/min. Les différents pics ont été détectés à 220,4nm, 226,4nm, 230,4nm, 284,4nm et 291,4nm sur une chaîne CLHP Ultimate 3000 (Dionex).

L'analyse qualitative consiste à déterminer les temps de rétention respectifs de chacun des composés élué.

### **7.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)**

La spectroscopie IR à transformée de Fourier est une méthode d'analyse basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'extrait analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans l'extrait (**Hesse *et al.*, 1997**).

Les spectres ont été enregistrés dans la plage de 400-4000cm<sup>-1</sup> avec une résolution spectrale de 4cm<sup>-1</sup> et 50 fois de balayage.

### **8. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La CMI est enregistrée comme la plus petite dilution dans laquelle aucune croissance n'est observée.

Il s'agit d'un titrage réalisé selon le test de dilution critique ; une série de dilutions en cascade au ½ du lyophilisat de chaque souche lactique a été effectuée à l'eau distillée stérile. Dans chaque tube, on a ajouté 10µL de la souche pathogène.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, on a réalisé la lecture des résultats (**Veselova *et al.*, 2008**).

### **9. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en extrait capable de tuer plus de 99,9% de l'inoculum bactérien pathogène (soit moins de 0,01% de survivants). Elle définit l'effet bactéricide de chaque extrait lactique. Des prélèvements ont été effectués à partir des tubes transparents de la CMI, puis déposés « en strie » sur gélose nutritive. Les boîtesensemencées sont incubées 24 heures à 37°C (**Veselova *et al.*, 2008**).

# **Chapitre V**

## Résultats

## **Partie 1**

La première étape de cette étude consiste à isoler, purifier et identifier les souches bactériennes utilisées. Ainsi tester l'effet antibactérien des souches productrices vis-à-vis de la souche indicatrice.

### **1. Résultats de l'isolement des souches utilisées**

#### **1.1. Les souches lactiques**

Nos souches lactiques ont été isolées et purifiées sur milieu MRS (**De Man, Rogosa et Sharpe, 1960**) et M17 (**Terzaghi et Sandine 1975**), milieux adaptés à la recherche spécifique des bactéries lactiques.

Les colonies suspectes ont été prélevées puis cultivées en milieu liquide MRS ou M17 selon leur provenance pour les enrichir suivi par un repiquage plusieurs fois sur les mêmes milieux mais solide pour la purification.

Lors de cette étude nous avons identifié les souches isolées à partir du lait cru de vache par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Les résultats du test morphologique obtenus sur la gélose, se traduisent par l'apparition des colonies bien visibles de 2 à 3mm de diamètre, de forme circulaire ou lenticulaire, bombées, de bords réguliers, de couleur blanchâtre ou laiteuse, avec une surface lisse. Une deuxième forme de colonie irrégulière, érodée, de couleur crème et de 1 à 2mm de diamètre (figure 15).

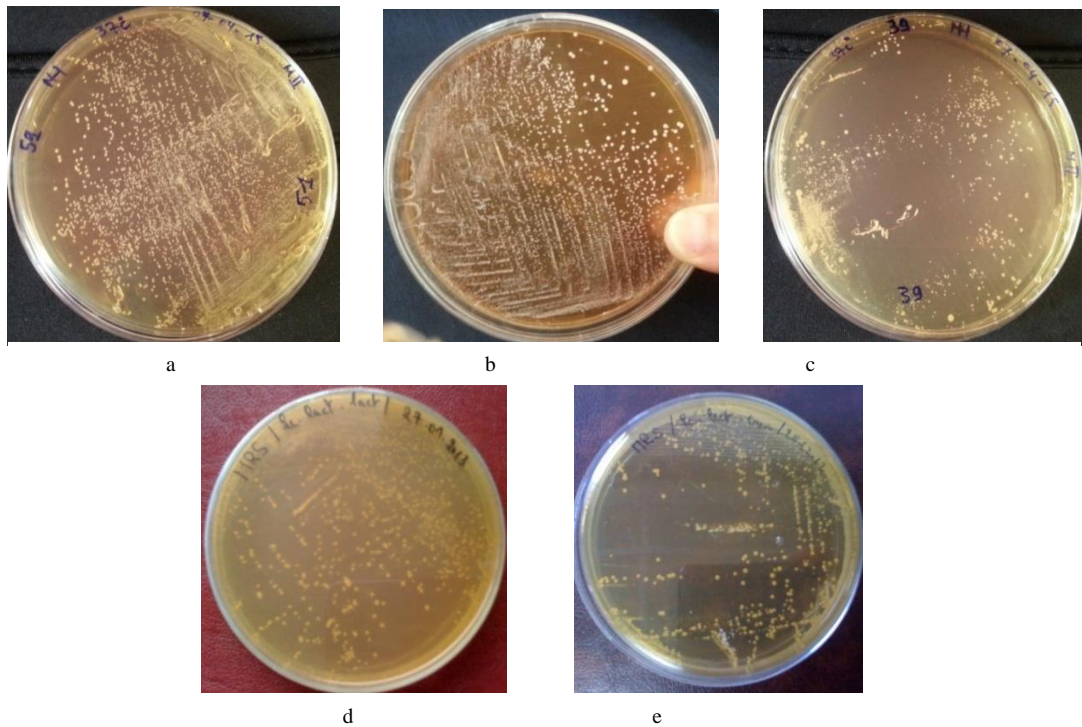
L'étude microscopique après coloration de Gram, nous a révélé que les souches sont Gram positif. Cet étude nous a permis de distinguer également la morphologie des bactéries lactiques qui peut se présenter en forme coques et bâtonnets disposées en paires, en courtes chaînettes ou isolées (figure 16).

L'identification est complétée par la recherche de catalase ; les résultats qu'on a obtenus montrent que nos souches ont une catalase négative.

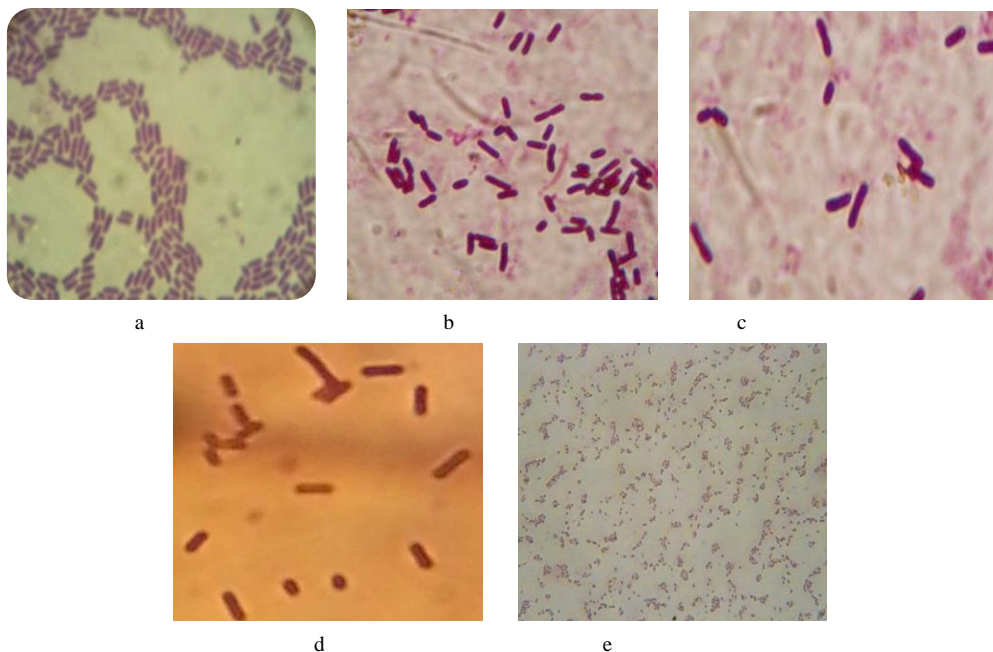
Selon l'identification phénotypique, on a trouvé 10 groupes bactériens à partir de l'échantillon coagulé à 30°C ; et on a trouvé 10 groupes bactériens à partir de l'échantillon coagulé à 45°C. Les 20 isolats possédant les caractères décrits par la littérature pour les bactéries lactiques, c'est-à-dire les bactéries sont:

- Gram positif ;
- Catalase négatif ;
- En forme de coques ou de bâtonnets disposées en paires ou en chaînes.

Comme indiqué dans le tableau 6, les isolats bactériens sont désignés selon un code composé de lettre et de numéro de G1 à G20, provenant de lait cru de vache.



**Figure 15:** Observation macroscopique de bactéries lactiques utilisées (a : *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, b : *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, c : *Lactobacillus* sp, d : *Leuconostoc* sp, e : *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427).



**Figure 16:** Observation microscopique de bactéries lactiques utilisées après coloration de Gram (Gx100) (a : *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, b : *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, c : *Lactobacillus* sp, d : *Leuconostoc* sp, e : *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427).

**Tableau 6:** Observation macroscopique et microscopique des souches lactiques utilisées.

Température de coagulation	Observation macroscopique					Observation microscopique		
	Code	Forme	Couleur	Aspect	Taille	Forme	Arrangement	Gram
30°C	G1	Circulaire	Blanchâtre	Régulier	0,5-1mm	Cocci	Paires, courtes, chaines	Positif
	G2	Lenticulaire	Crémeuse	Régulier	1-2mm	Cocci	Isolées, en paires	Positif
	G3	Circulaire	Laitieuse	Régulier	2-3mm	Cocci	Isolées, en paires	Positif
	G4	Circulaire	Blanchâtre	Régulier	3-4mm	Cocci	Paires, courtes chaines	Positif
	G5	Gluante	Translucide	Irrégulier	0,5-1mm	Cocci	Paires, courtes, chaines	Positif
	G6	Circulaire	Laitieuse	Régulier	1-2mm	Cocci	Isolées, paires	Positif
	G7	Circulaire	Blanchâtre	Irrégulier	2-3mm	Cocci	Paires, courtes, chaines	Positif
	G8	Circulaire	Crémeuse	Irrégulier	3-4mm	Bâtonnet	Isolées, paires	Positif
	G9	Circulaire	Blanchâtre	Régulier	3-4mm	Bâtonnet	Paires, courtes, chaines	Positif
	G10	Gluante	Crémeuse	Régulier	1-2mm	Bâtonnet	Isolées, paires	Positif
45°C	G11	Circulaire	Blanchâtre	Régulier	0,5-1mm	Cocci	Paires, courtes, chaines	Positif
	G12	Lenticulaire	Blanchâtre	Régulier	1-2mm	Cocci	Paires, courtes, chaines	Positif
	G13	Circulaire	Blanchâtre	Régulier	0,5-1mm	Cocci	Paires, courtes, chaines	Positif
	G14	Circulaire	Blanchâtre	Régulier	1-2mm	Cocci	Paires, courtes, chaines	Positif
	G15	Gluante	Crémeuse	Régulier	1-2mm	Cocci	Isolées, paires	Positif
	G16	Circulaire	Blanchâtre	Régulier	1-2mm	Cocci	Isolées, paires	Positif
	G17	Lenticulaire	Crémeuse	Régulier	1-2mm	Bâtonnet	Isolées, paires	Positif
	G18	Circulaire	Laitieuse	Régulier	1-2mm	Bâtonnet	Isolées, paires	Positif
	G19	Circulaire	Blanchâtre	Régulier	0,5-1mm	Bâtonnet	Isolées, paires	Positif
	G20	Gluante	Translucide	Régulier	0,5-1mm	Bâtonnet	Isolées, paires	Positif

Un total de 20 isolats lactiques obtenu a été identifié au stade du genre en se basant sur leurs caractéristiques physiologiques et biochimiques. Les résultats des tests physiologiques et biochimiques des isolats sont résumés dans le tableau 7.

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques des isolats cocci mésophiles (G1-G3): montrent qu'ils croissent à des températures de 30°C, 37°C et 15°C et ne se développent pas à 45°C ; le type fermentaire (hétérofermentaires) révèle qu'ils appartiennent au genre *Leuconostoc*. Toutes les souches sont ADH négatifs, ce qui confirme leur appartenance au genre *Leuconostoc*.

Les cocci mésophiles homofermentaires (G4-G7) qui réduisent le bleu de méthylène à 0,1% et à 0,3% et ne poussent pas à 6,5% NaCl, appartiennent au genre *Lactococcus*. Les lactocoques (G4, G5) qui ne possèdent pas l'arginine dihydrolase nous les avons apparentés à l'espèce *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* et les souches (G6, G7) qui possèdent l'arginine dihydrolase appartiennent à l'espèce *Lactococcus lactis* subsp *lactis*.

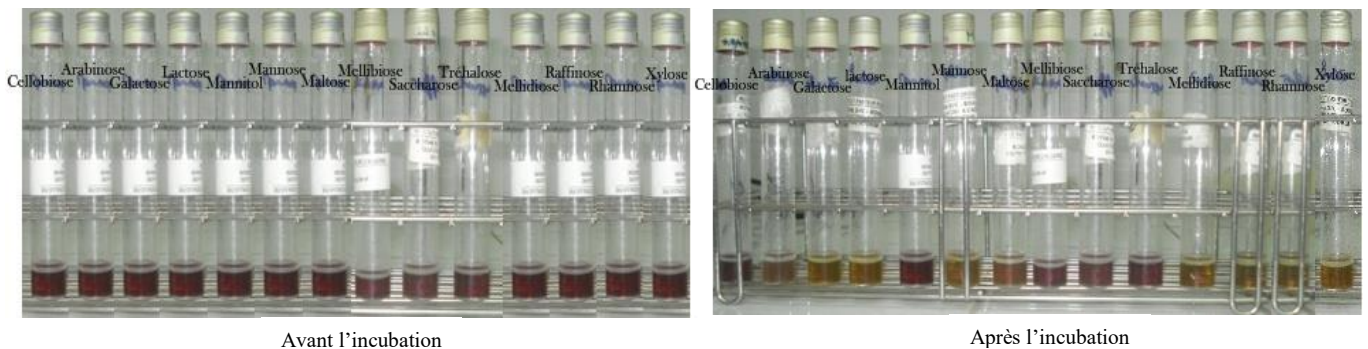
Les isolats (G11-G16) sont considérés comme étant des entérocoques parce qu'elles poussent à des températures 15°C et 45°C, dans le milieu hypersalé (6,5% NaCl), dans le milieu hyperalcalin (pH 9,6) et ne réduisent pas le bleu de méthylène à 0,3%.

Tous les isolats en forme de bâtonnets (G8-G10) et (G17-G20) sont tous homofermentaires (ne produisent pas de CO<sub>2</sub> à partir de glucose), les souches incubées à 30°C (G8-G10) sont mésophiles donc ils appartiennent au groupe *Streptobacterium* par contre ceux incubées à 45°C (G17-G20) sont tous thermophiles donc ils appartiennent au groupe de *Thermobacterium*. Les lactobacilles thermophiles sont divisés en deux groupes

ceux qui sont ADH positif (G17-G19) et celui qui est ADH négatif (G20) alors que les lactobacilles mésophiles (G8-G10) sont dépourvus de cette enzyme. La majorité des souches de *Lactobacillus* produisent de l'acétoïne en formant un anneau important sur milieu Clark et Lubs.

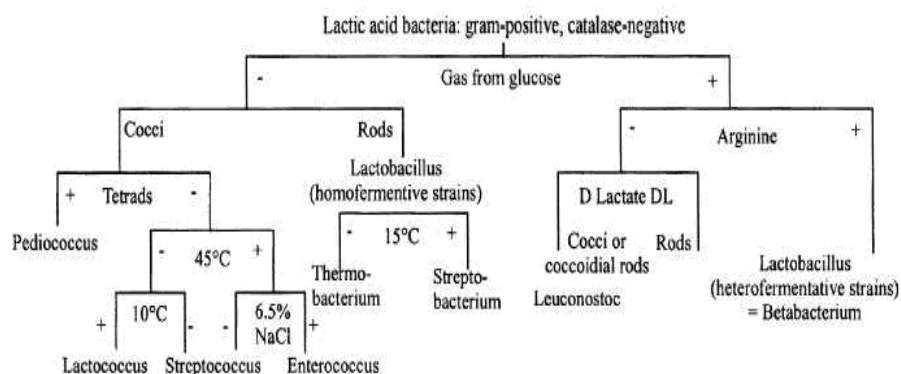
Toutes les souches isolées hydrolysent l'esculine.

Nous avons identifié les bactéries au niveau de l'espèce et même parfois de la sous-espèce, en établissant leur profil fermentaire à l'aide de galerie biochimique classique (tableau 8) en utilisant les sucres clés d'identification de chaque genre. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage de l'indicateur coloré du pourpre au jaune ce virement est attribué à la production d'une quantité plus aux moins forte d'acidité par la souche en utilisant les sucres fermentescibles (figure 17).



**Figure 17:** Le profil fermentaires des glucides de la bactérie isolée *Leuconostoc* sp.

D'après ces résultats et suivant les recommandations de Carr et al. (2002) ; d'Axelsson (2004) et de Hammes et Hortal (2006) (figure 18), on peut confirmer l'appartenance des groupes de G1 au G20 aux espèces : *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Leuconostoc* sp, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus* sp respectivement.



**Figure 18:** Schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques (Carr et al., 2002).

**Tableau 7:** Les caractères biochimiques des isolats.

Tests	Cocci												Bacille							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G8	G9	G10	G17	G18	G19	G20
Type fermentaire	Hé	Hé	Hé	Ho	Ho	Ho	Ho	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho
<b>Croissance à : 15°C</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30°C	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND
37°C	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
45°C	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	+
<b>Croissance à : 6,5% NaCl</b>	ND	ND	ND	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
pH 9,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,1% bleu de méthylène	ND	ND	ND	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0,3% bleu de méthylène	ND	ND	ND	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Hydrolyse de l' Arginine</b>	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	+	+	+	-
Esculine	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Production d'acétoïne</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+
<b>Espèce</b>	<i>Leuconostoc</i> sp	<i>Leuconostoc</i> sp	<i>Leuconostoc</i> sp	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	<i>Enterococcus</i> sp	<i>Enterococcus</i> sp	<i>Enterococcus</i> sp	<i>Enterococcus</i> sp	<i>Enterococcus</i> sp	<i>Enterococcus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> sp

ND : Non déterminé ; + : Réaction positif ; - : Réaction négati

**Tableau 8:** Utilisation des carbohydrates de carbone par les souches dans une Galerie biochimique classique.

Bactérie Sucre	<i>Lactococcus sp</i>				<i>Leuconostoc sp</i>			<i>Lactobacillus sp</i>								<i>Enterococcus sp</i>					
	G4	G5	G6	G7	G1	G2	G3	G8	G9	G10	G17	G18	G19	G20	G11	G12	G13	G14	G15	G16	
<b>Cellobiose</b>	-	V	V	V	V	ND	V	V	V	ND	V	-	-	-	-	+	+	+	+	-	
<b>Arabinose</b>	+	V	-	-	-	-	V	V	V	V	V	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	
<b>Galactose</b>	+	-	+	+	+	+	ND	ND	-	-	V	+	+	+	+	+	-	-	-	+	
<b>Lactose</b>	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+	+	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
<b>Mannitol</b>	-	+	+	+	+	+	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	ND	
<b>Mannose</b>	+	+	-	V	ND		ND	ND	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND	
<b>Maltose</b>	+	-	V	V	V	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Mellibiose</b>	-	+	-	-	-	-	-	V	V	V	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>Saccharose</b>	-	+	+	+	+	+	+	V	V	ND	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>Trehalose</b>	-	ND	V	V	ND	V	V	V	V	ND	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>Mellidiose</b>	+	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	+	V	V	+	+	V	ND	V	V	
<b>Raffinose</b>	+	+	+	+	ND	V	V	V	V	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>Rhamnose</b>	+	+	+	+	ND	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	
<b>Xylose</b>	+	ND	V	ND	ND	+	+	+	+	+	+	V	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	

ND : non déterminé ; V : variable ; + : indique que le substrat carbonaté est fermenté ; - : indique qu'il n'est pas fermenté

## **1.2. La souche pathogène**

Dans les conditions favorables de la croissance de *Salmonella* sp (37°C, 24 heures), après avoir repiqué les colonies suspectes dans une boîte de Pétri contenant la gélose SS afin d'obtenir des souches pures, les résultats obtenus se traduisent par l'apparition de petites colonies de 1,5 à 2mm de diamètre et incolores (figure 19).

D'après la coloration de Gram, on a trouvé une forme de bâtonnet à Gram négatif (figure 20).

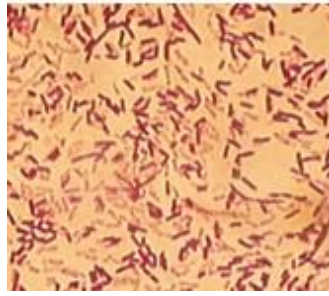
Dans le but d'identifier les caractères de genre des *Salmonella* sp, on a effectué des tests de présomption. Pour effectuer cette identification du genre nous avonsensemencé une mini galerie de 3 milieux d'identification, à savoir: le milieu Kligler-Hajna, le milieu urée-indole et le milieu «LDC». Ces résultats ont été confirmés par un API 20<sup>E</sup> (analytical profile index). Les résultats du tableau 9, figure 21, 22 et 23 montrent les caractères biochimiques recherchés.

Notre bactérie *Salmonella* sp produit du gaz H<sub>2</sub>S pendant la dégradation du thiosulfate de sodium ; les sucres qui peuvent être fermentés par cette bactérie sont: D-glucose, D-sorbitol, D-melibiose, mannitol, L-arabinose, inositol, D-saccharose, inositol, rhamnose, amygdalin. Elle possède une  $\beta$ -galactosidase, lysine décarboxylase, ornithine décarboxylase et arginine dihydrolase. Elle ne possède pas la citratase et l'uréase. Après l'ajout de quelques gouttes de KOVACS, on a observé une absence de l'anneau rouge donc notre bactérie est indole négatif. Les résultats étaient négatifs pour tous les autres tests (tryptophane désaminase, réaction de voges proskauer, gélatinase), ce qui a été constaté par Bourgeois et Larpent (1996) et Sutra et al. (1998).

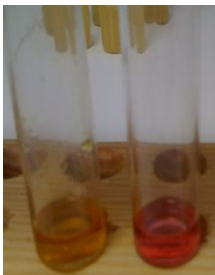
La lecture de la galerie API 20<sup>E</sup> se fait généralement au bas de chaque microtube. Nous avons comparé la couleur obtenue pour chaque cupule et inscrit le résultat sur la fiche de résultats (figure 24). Pour déterminer le code de 7 chiffres, il faut additionner les résultats des réactions, lesquelles sont regroupées par ensemble de trois microtubes. La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (tableau 20).



**Figure 19:** Observation macroscopique de *Salmonella* sp cultivé sur milieu SS.



**Figure 20:** Observation microscopique de *Salmonella* sp après coloration de Gram (Gx100).



Après Avant

**Figure 21:** Recherche de l'Uréase.



Après Avant

**Figure 22:** Recherche de LDC.



**Figure 23:** Culture de *Salmonella* sp sur milieu Hajna-Kligler.



**Figure 24:** Identification de la souche *Salmonella* sp par la galerie API 20<sup>E</sup>.

**Tableau 9:** Résultats de l'identification biochimique (Api 20<sup>E</sup>).

Test Souche	ONPG	ADH	LCD	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RAH	SAC	MEL	AMY	ARA
<i>Salmonella</i> sp	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: Réaction positif, - : Réaction négatif

## 2. Résultat de l'étude de la survie des souches lactiques dans les conditions extrême du tube digestif

Cette étape consiste à étudier la capacité de nos souches lactiques utilisées de résister aux conditions digestifs qui constitue un point essentiel dans notre étude; par conséquent, l'étude de certains paramètres de croissance (tels la résistance aux sels biliaires et le pH, la résistance aux enzymes digestives, la capacité de l'adhésion *in vitro* au tissu épithélial) peut fournir une grande information sur la physiologie de ces bactéries.

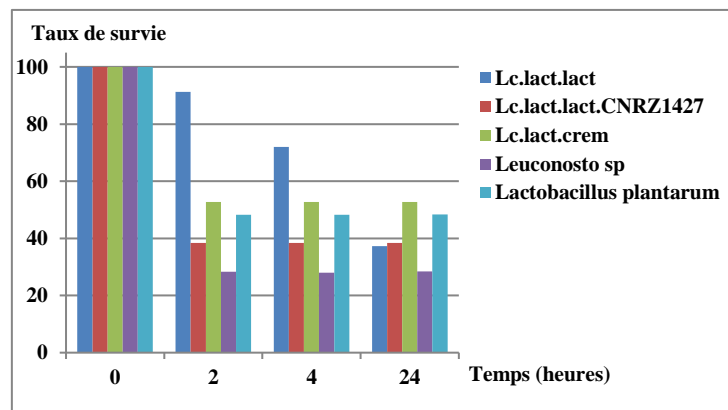
### 2.1. Effet des sels biliaires pendant 0, 2, 4 et 24 heures

Les sels biliaires sont l'une des barrières à franchir par les bactéries lactiques pour gagner leur site, de ce fait la tolérance de nos souches individuelles a été évaluée.

Les souches lactiques ont donné une absence de croissance sur le milieu M17/MRS additionné de 0,3% sels biliaires à pH=1 au temps: 2 heures, 4 heures, 24 heures en comparaison avec le résultat trouvé au temps 0 heure (annexe).

Il apparaît que les souches ont présenté une sensibilité vis-à-vis des sels biliaires en milieu acide (pH=1) (histogramme 1).

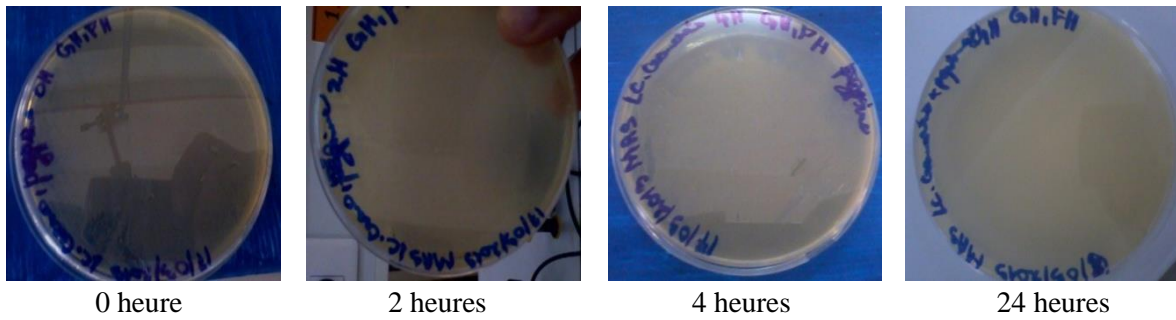
La souche *Lactococcus lactis* subsp *lactis* a montré une meilleure résistance à pH=1 à savoir (91,26 %). D'une manière générale, la résistance aux conditions acides diminue avec l'augmentation du temps jusqu'à atteindre un minimum de 28,00% de viabilité enregistrée par la souche *Leuconostoc* sp et de 38,43% de viabilité pour *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427.



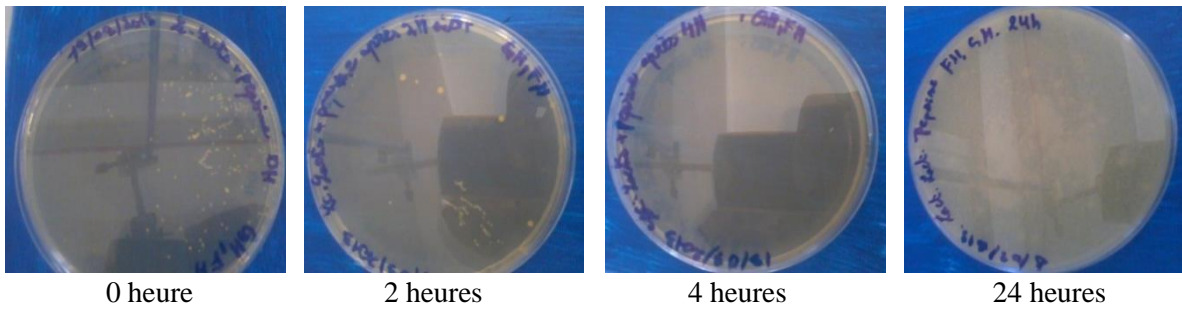
**Histogramme 1:** Effet des sels biliaires et pH1.

### 2.2. Effets de l'enzyme Pepsine

La souche *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* n'a pu croître sur milieu M17 pendant 0, 2, 4, 24 heures qui on comparaison avec la souche *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 qui donne une présence de croissance sur le milieu M17 pendant les deux premières heures et une absence après 4 heures et 24 heures d'incubation. Les autres bactéries ne présentent aucune croissance (figure 25, 26).



**Figure 25:** Effet de pepsine sur la croissance de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*.



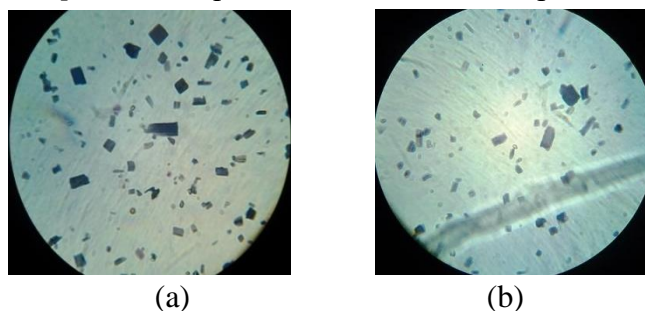
**Figure 26:** Effet de pepsine sur la croissance de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427.

### 2.3. Adhésion *in vitro* au tissu épithélial

La tolérance au faible pH, la tolérance à la bile et le suc pancréatique ne suffit pas pour prédire la survie d'une souche lors de son passage à travers l'appareil digestif, l'étude de l'adhésion *in vitro* au tissu épithélial est aussi importante (Vizoso pinto *et al.*, 2006).

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

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 27, il apparaît que les souches ont présenté une adhésion aux cellules épithéliales du côlon de poulet de chair, à l'exception de la souche *Lactobacillus plantarum* qui a montré une faible capacité d'adhésion.



**Figure 27:** Test d'adhésion de *Lactobacillus plantarum* (a) et *Leuconostoc* sp (b) au tissu épithélial du côlon.

## 2.4. Test d'hydrophobicité

Ce test permet d'évaluer l'hydrophobicité de la surface cellulaire de nos souches pures vis-à-vis du xylène qui peut refléter le potentiel de colonisation des ferments aux mucus intestinale. La répartition des cellules entre la phase aqueuse et le xylène résulte de l'interaction hydrophobe entre les microorganismes et les hydrocarbures.

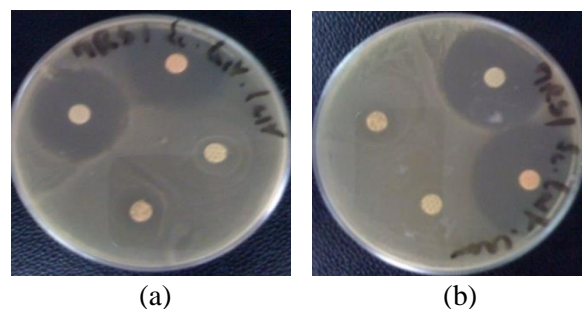
Les pourcentages obtenus de l'adhérence de nos souches pures au xylène indiquent l'hydrophobicité de leur surface. Les résultats de ce test sont illustrés par les valeurs suivantes :

- Hydrophobicité % = 79% (Pour *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427) ;
- Hydrophobicité% = 45%. (Pour *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*) ;
- Hydrophobicité% = 40%. (Pour *Lactococcus lactis* subsp *lactis*) ;
- Hydrophobicité% = 48%. (Pour *Leuconostoc* sp) ;
- Hydrophobicité% = 50%. (Pour *Lactobacillus plantarum*) ;

Ces résultats montrent que les souches mises au test présentent une bonne hydrophobicité, cela témoigne une bonne sélectivité des surfaces membranaires. La valeur la plus faible (40%) est enregistrée avec la souche *Lactococcus lactis* subsp *lactis* et la plus élevée est celle du ferment *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 (79%).

## 3. Antibiogramme

Les résultats du test d'antibiogramme ont révélés que les souches (*Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc* sp) (figure 28) ont montré une résistance aux Pénicilline et Chloramphénicol et une sensibilité aux : Tetracycline (20mm/36mm/19mm/22mm/20mm) et Erythromycine (24mm/40mm/20mm/39mm/20mm) respectivement.



**Figure 28:** Antibiogramme de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 (a) et *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* (b).

#### **4. Test *in vivo***

##### **4.1. Le dénombrement de BAL aux jours 0, 4 et 7**

Le dénombrement de nos souches au jour 0 a été réalisé sur milieu M17/MRS+Pénicilline et M17/MRS+Chloramphénicol pour les souris de chaque groupe dans les crottes et les organes (Estomac, Intestin).

Après 24 heures d'incubation, on a observé une présence d'un nombre important de colonies dans les crottes et les deux organes : Estomac et Intestin sur milieu M17/MRS pour les 12 groupes, on comparaison avec le milieu M17/MRS+Pénicilline et M17/MRS + Chloramphénicol où on a enregistré 0 UFC/g de chaque échantillon pour les 12 groupes.

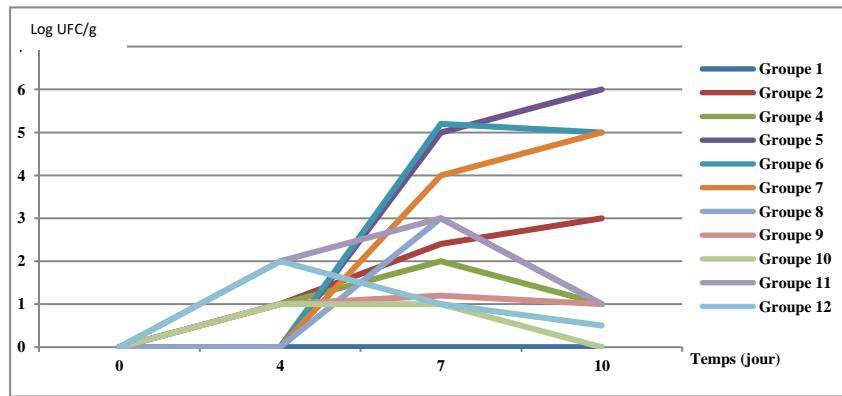
D'après les résultats de l'analyse bactériologique enregistrés, nous avons noté une présence de la flore lactique interne dans les souris de chaque groupe ; ainsi que le milieu M17/MRS additionné l'antibiotique qui est un milieu efficace et sélectif pour faire un dénombrement de nos souches lactiques utilisées dans les étapes suivantes (dénombrement au jour 4 et 7).

Les bactéries lactiques utilisées doivent d'abord résister aux hostilités digestives lors de leur transit intestinal ; c'est la possibilité que peuvent présenter ces BAL coloniser les muqueuses de tractus digestifs et qui est liée à leur capacité d'adhésion et d'implantation (**Charteris *et al.*, 1998**).

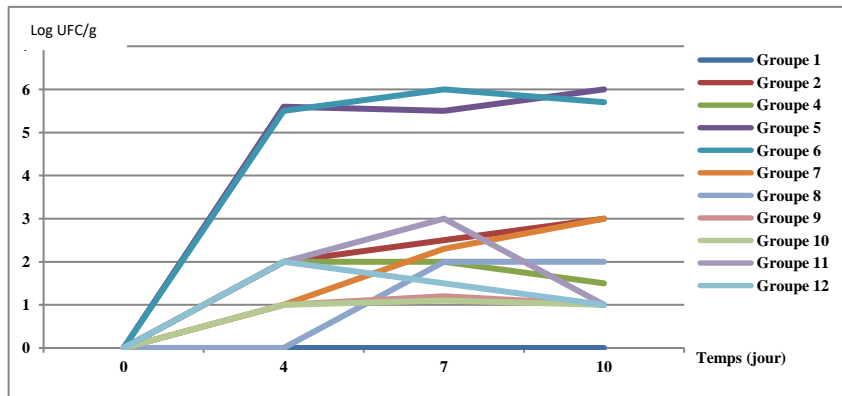
C'est pour cette raison qu'on a utilisé ce milieu sélectif (M17/MRS+antibiotique) pour le dénombrement et la détection de l'implantation de nos souches lactiques au cours du temps pour chaque groupe.

Après le dénombrement sur milieu M17/MRS+antibiotique (Pénicilline, Chloramphénicol), il a été observé une évolution du nombre d'UFC/g d'échantillon (crottes, Intestin, Estomac) au cours du temps (jour 0, 4, 7) par rapport au groupe témoin.

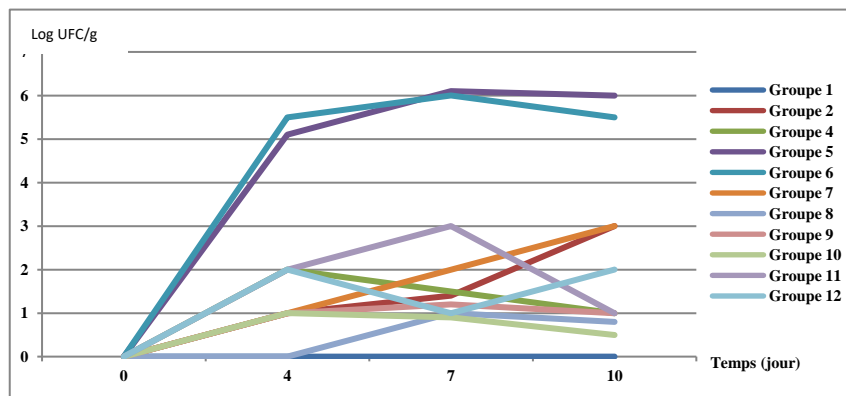
D'après l'expérience, nos observations indiquent que les souches lactiques utilisées ont été trouvées dans l'estomac, l'intestin, les crottes avec un degré d'implantation élevé par rapport au nombre représenté chez le groupe 1 (figure 29).



Crotte



Intestin



Estomac

**Figure 29:** Evolution de la flore lactique au cours du temps.

#### 4.2. Confirmation de l'axénie des souris utilisées

L'absence de microorganisme dans les crottes et au niveau des organes (Estomac, Intestin) a été le critère de confirmation de l'axénie des souris utilisées dans cette expérience.

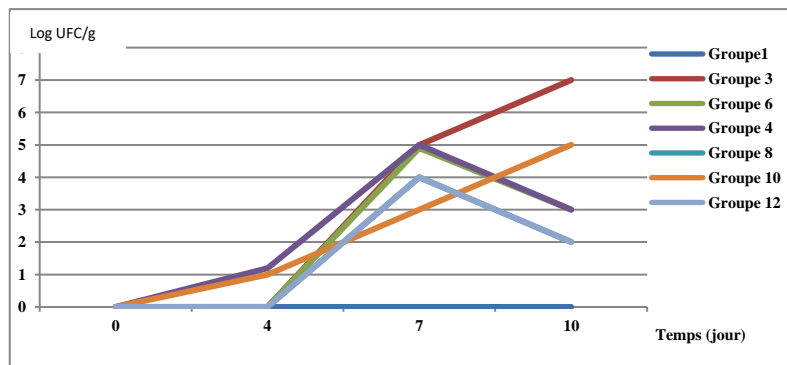
L'analyse bactériologique des crottes et des organes (Estomac, Intestin) avec leurs contenus pour les souris de tous groupes avant toute expérimentation (au jour 0) ne révèle aucune présence de *Salmonella* sp.

**4.3.Dénombrement aux jours 4, 7 et 10**

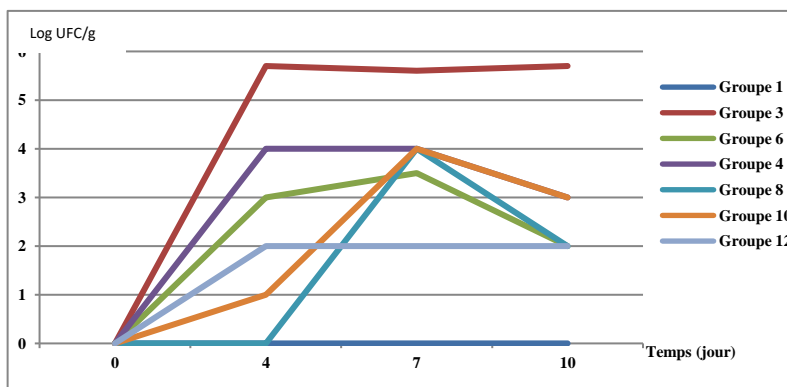
D'après les résultats obtenus dans le groupe 3, on a observé un accroissement en nombre d'UFC/g d'échantillon (crottes, Estomac, Intestin) au cours du temps (jour 4, 7) (figure 30).

Il a été constaté que le nombre de cette bactérie pathogène a diminué après le gavage dans les échantillons : Intestin, Estomac, crottes au cours du temps : jour 4, 7, 10 (figure 30).

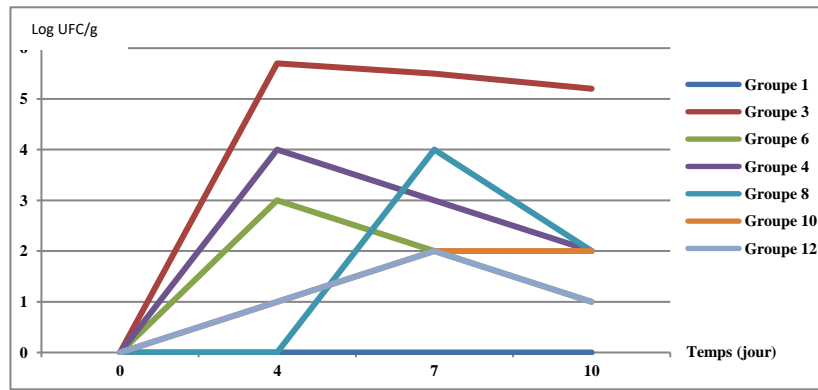
Au niveau des crottes nous avons constaté la présence de *Salmonella* sp durant le traitement, une partie de ce germe potentiellement pathogène ne se fixe pas sur la paroi intestinale, ce qui suggère son élimination avec les crottes (figure 30)



**Crotte**



**Intestin**



**Estomac**

**Figure 30:** Evolution de *Salmonella* sp au cours du temps après le dénombrement sur milieu SS.

**5. Résultat de l'effet inhibiteur des isolats**

Les résultats sont exprimés en (mm), par mesure de la distance entre la limite de la colonie bactérienne et le début de la zone d'inhibition de la souche pathogène. L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1 mm (**Schillinger et Lucke, 1989**). L'action bactériostatique est exprimée par la réapparition des colonies dans la zone d'inhibition. L'absence des colonies indique une action bactéricide (**Thomson et al., 1996**).

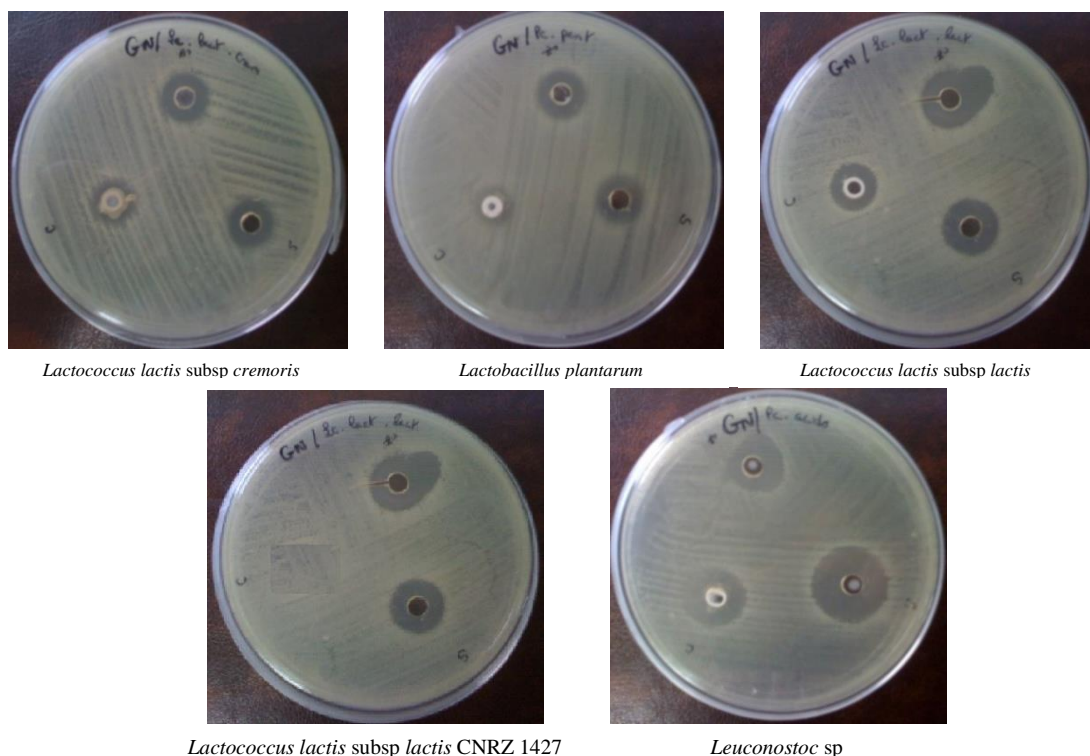
La détection des souches productrices de substances antimicrobiennes a été réalisée par confrontation sur milieu solide et les cinq souches retenues ont montrées une activité inhibitrice vis-à-vis de *Salmonella* sp (figure 31, tableau 10). Les zones d'inhibition sont claires avec des bordures bien distinctes, avec des plages d'inhibition variables (entre 5 et 15mm) suivant la souche lactique testée.

Les différentes souches de *Lactococcus* sp présentent un spectre d'activité très proche vis-à-vis du germe cible testé. Les longueurs des zones d'inhibition variables de 10 à 13mm. La souche *Leuconostoc* sp a le diamètre d'inhibition le plus important (15mm). Le reste des souches lactiques sélectionnées, présentent un spectre d'activité très proche de 5mm à 9mm.

Dans ce test, des zones d'inhibition ont été observées autour des puits, que ce soit dans le cas de l'utilisation des cultures de bactéries ou des surnageant de culture de bactéries (figure 31, tableau 10), et ceci malgré de nombreuses répétitions.

La partie cellulaire (culot) présente un résultat positif sur la croissance de la souche pathogène utilisée. En effet, les zones d'inhibition sont petites comparativement aux zones d'inhibitions observées précédemment (figure 31, tableau 10). Le culot de la souche

*Lactobacillus plantarum* présente une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée vis-à-vis de la bactérie pathogène avec un diamètre de zone d'inhibition de 5mm. La souche *Leuconostoc* sp présente une nette inhibition dont le diamètre de la zone d'inhibition est de 10mm (figure 31). Les meilleures zones d'inhibition ont été trouvées avec les souches lactiques : *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 9mm, 7mm, 15mm respectivement.



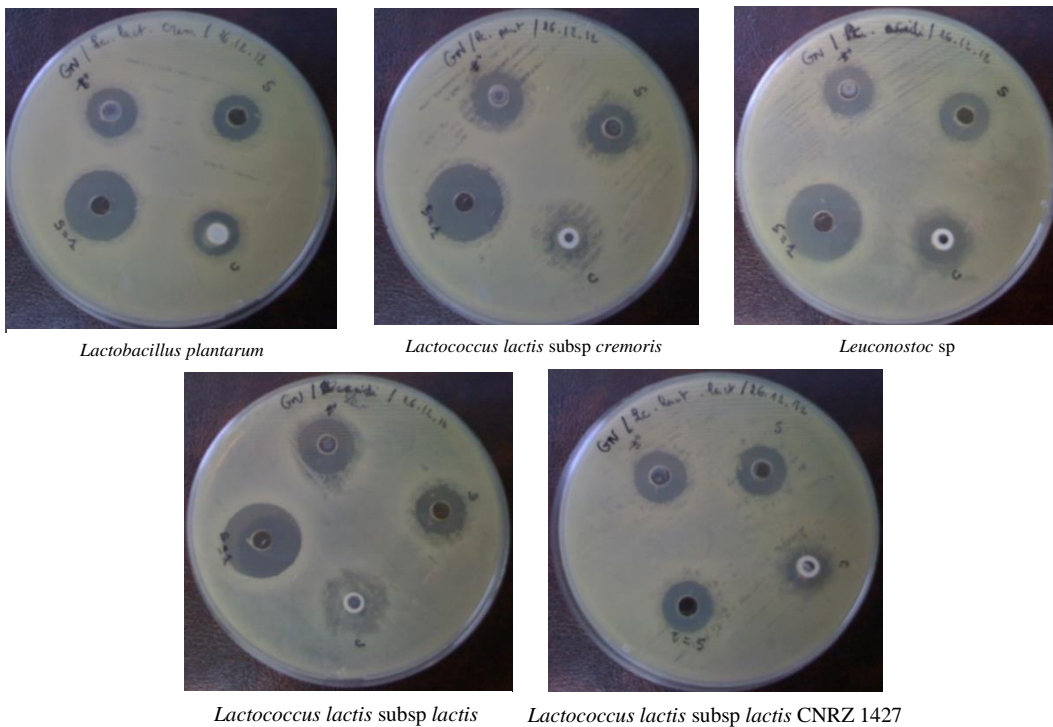
**Figure 31:** Activité antibactérienne des souches lactiques, surnageant et culot vis-à-vis de *Salmonella* sp (S : surnageant ; C : culot ;  $\text{B}$ : bactérie elle-même).

**Tableau 10:** Le diamètre des zones d'inhibition de *Salmonella* sp.

Souches		<i>Salmonella</i> sp
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	La bactérie elle même	13
	Surnageant	13
	Culot	9
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	La bactérie elle même	10
	Surnageant	12
	Culot	8
<i>Leuconostoc</i> sp	La bactérie elle même	15
	Surnageant	14
	Culot	10
<i>Lactobacillus plantarum</i>	La bactérie elle même	5
	Surnageant	6
	Culot	5
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427	La bactérie elle même	9
	Surnageant	8
	Culot	7

**6. Résultat de caractérisation de l'agent inhibiteur**

Le criblage pour la production de substances antagonistes a été réalisé dans des conditions excluant toute inhibition éventuelle qui pourrait être due à l'acidité ou à la production du peroxyde d'hydrogène ou aux peptides bioactifs. L'addition de NaOH (0,1N) et l'incubation en condition d'anaérobiose ont servi à éliminer les effets inhibiteurs des acides organiques et peroxyde d'hydrogène. On observe la présence des zones d'inhibition, qui nous a conduits à conclure que les cinq bactéries lactiques sont caractérisées comme productrices de substances inhibitrices du genre bactériocine vis-à-vis de la bactérie pathogène testée *Salmonella* sp (figure 32, tableau 11). Le diamètre des zones d'inhibitions relevées, varie de 7 à 20mm, la plus faible activité observée pour la souche *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 à 7mm et la meilleure observée pour les deux souches de *Lactococcus* sp à 20mm ; *Lb. plantarum* et *Leuconostoc* sp ont donné des zones d'inhibition remarquables de 14 mm et 10 mm respectivement.



**Figure 32:** Effet des surnageants neutralisés sur la croissance de *Salmonella* sp (S : surnageant ;

C : culot ; B : bactérie elle-même, S+7).

**Tableau 11:** Le diamètre des zones d'inhibition de *Salmonella* sp.

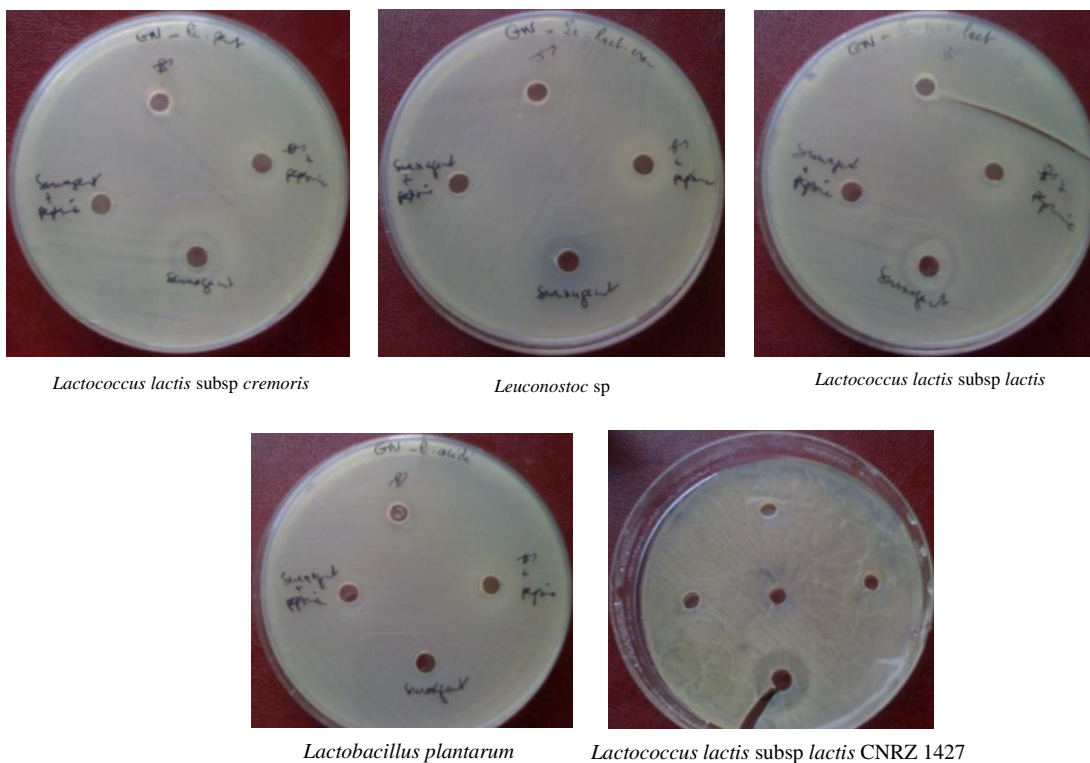
Souches	La croissance de <i>Salmonella</i> sp au	
	Surnageant à pH1	Surnageant à pH7
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	13	20
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	12	20
<i>Leuconostoc</i> sp	14	10
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6	14
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427	8	7

**7. Caractérisation chimique de l'agent inhibiteur**

**7.1. Effet des enzymes protéolytiques**

La confirmation de la nature peptidique d'une substance produite par une souche lactique est réalisée en utilisant la pepsine et la trypsine (Chen et Hoover, 2003 ; Makhloufi *et al.*, 2011).

Pour les cinq souches lactiques, on a remarqué que l'activité antibactérienne des surnageants vis-à-vis de la souche pathogène *Salmonella* sp a disparu après l'action des enzymes protéolytiques en comparaison avec le surnageant non traité. La figure 33 et le tableau 12 montrent les résultats obtenus. La trypsine altère complètement l'activité antagoniste des substances inhibitrices contenues dans les surnageants, la pepsine affecte l'activité inhibitrice de toutes les cultures lactiques testées.



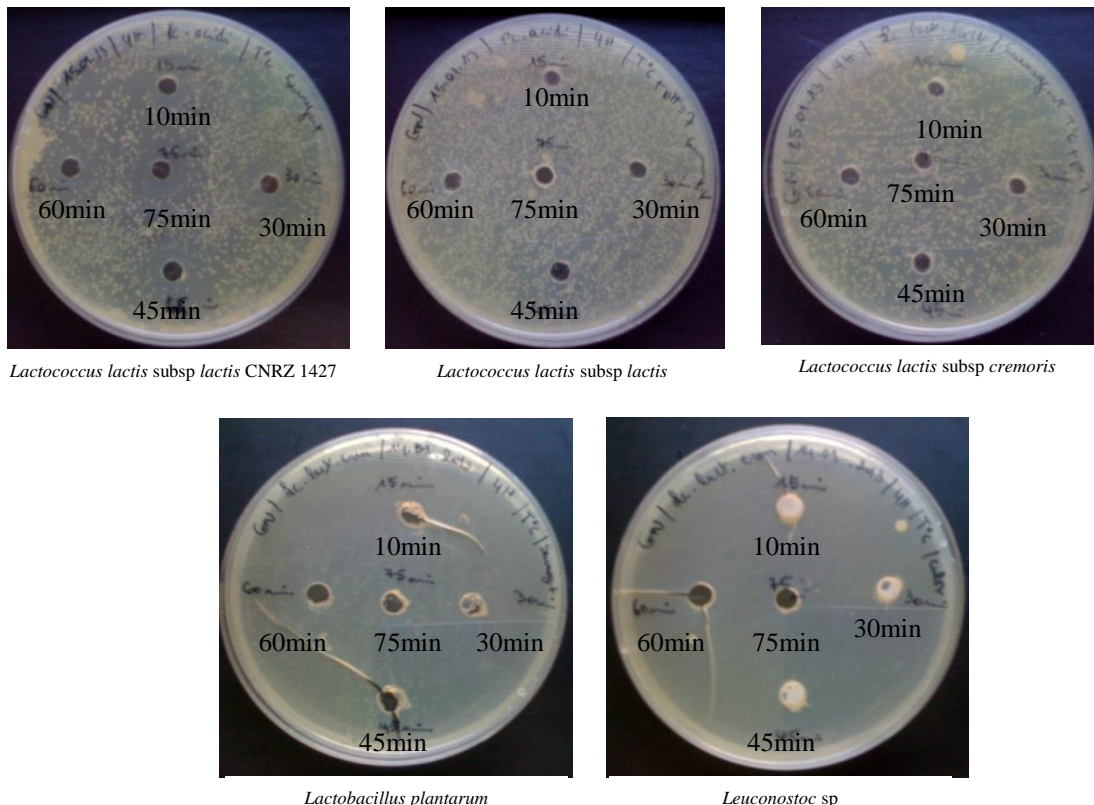
**Figure 33:** Effet des surnageants lactiques traités par les enzymes protéolytiques sur la croissance de *Salmonella* sp.

**Tableau 12:** Le diamètre des zones d'inhibition de *Salmonella* sp en mm.

Souches	La croissance de <i>Salmonella</i> sp au :		
	Surnageant à pH1	Surnageant traité par la pepsine	Surnageant traité par la trypsine
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	13	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	12	0	0
<i>Leuconostoc</i> sp	14	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427	8	0	0

**7.2. Effet de la température**

Après élimination de l'effet de l'acide lactique et du peroxyde d'hydrogène; en traitant les surnageants à 100°C pendant une période de temps 75 minutes, on a remarqué l'apparition d'une zone d'inhibition dont le diamètre est de l'ordre de 10mm jusqu'à 15mm pour la souche *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427. Quel que soit le temps de traitement thermique à 100°C, le surnageant perd son activité antibactérienne de chaque culture lactique suivante : *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc* sp ce qui indique la présence de substances inhibitrices de nature protéique produite (tableau 13, figures 34).



**Figure 34:** Effet des surnageants traités par différentes températures sur la croissance de *Salmonella* sp.

**Tableau 13:** Le diamètre des zones d'inhibition de *Salmonella* sp en mm.

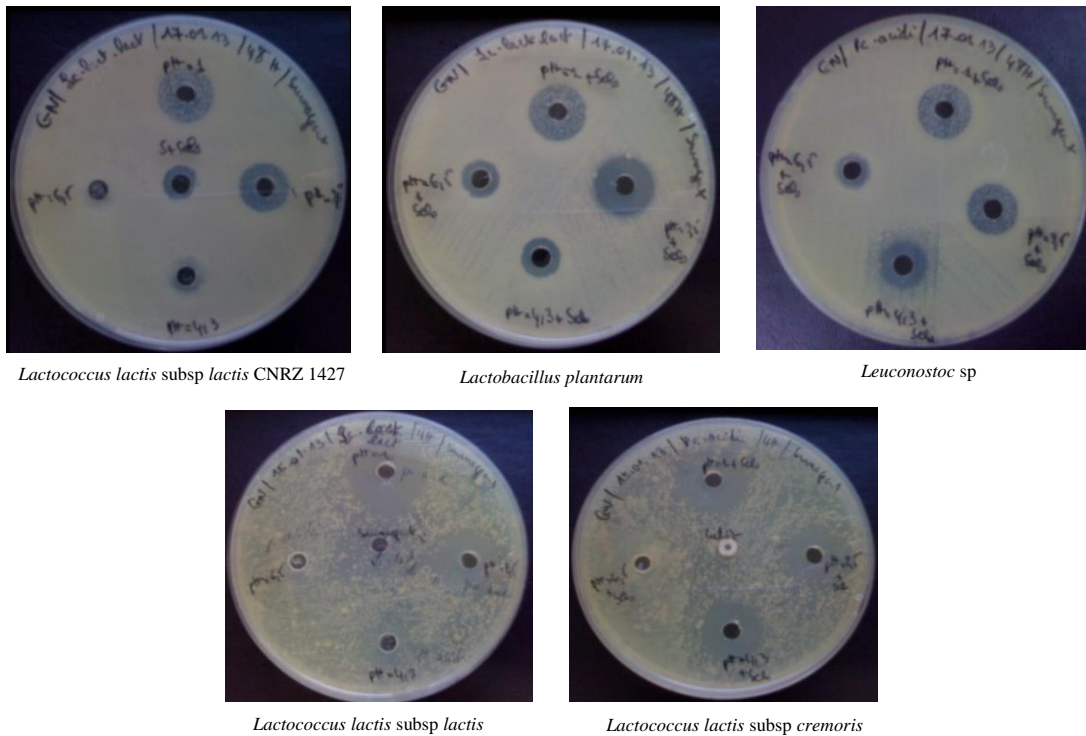
Souches	Le diamètre de zone d'inhibition de <i>Salmonella</i> sp + Surnageant traité par la température 100°C					
	0 minute	15 minutes	30 minutes	45 minutes	60 minutes	75 minutes
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	13	0	0	0	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	12	0	0	0	0	0
<i>Leuconostoc</i> sp	14	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6	0	0	0	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427	8	4	5	4,5	4	3

### 7.3. Effet du pH et sels biliaires

En général, la bactérie *Salmonella* sp est très sensible aux surnageants des bactéries lactiques utilisées (figure 35). D'après les résultats présentés dans la figure 27, à pH 2,5 les zones d'inhibition sont variables de 2 à 3mm. Alors qu'à pH 4,3 le diamètre des zones est variable entre 5 à 7mm ; à pH 6.5, on remarque une activité inhibitrice très importante de 5mm à 10mm en comparaison avec un surnageant à pH non changé.

A pH 2,5 la bactérie pathogène montre une bonne résistance aux surnageants et elle se développe normalement sauf le cas de la souche *Lactobacillus plantarum* on observe une présence d'une zone d'inhibition avec un diamètre de 5mm.

Le diamètre de la zone d'inhibition augmente progressivement avec l'augmentation du pH (2.5, 4.3, 6.5). En présence de sels biliaires et à pH optimal (6.5), les deux souches de *Lactococcus lactis* présentent un très bon effet inhibiteur sur la croissance de *Salmonella* sp, le diamètre des zones d'inhibition est très élevé par rapport aux autres bactéries lactiques utilisées.



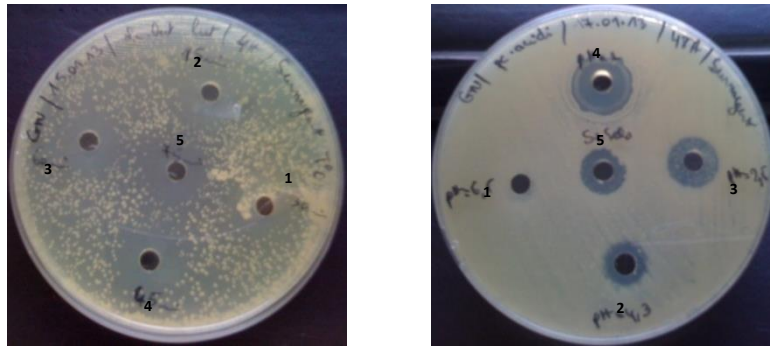
**Figure 35:** Effet des surnageants traités avec différentes valeurs de pH et sels biliaires sur la croissance de *Salmonella* sp.

## **Partie 2**

### **8. Résultat de l'effet des extraits**

L'activité antibactérienne a été évaluée afin de mettre en évidence un éventuel pouvoir antagoniste, d'une façon générale les extraits ont présenté un effet inhibiteur vis-à-vis de *Salmonella* sp qui s'avère par la présence d'une zone d'inhibition autour des puits.

D'après ces résultats, les deux extraits de la souche *Lactobacillus plantarum* présente une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée vis-à-vis de la souche indicatrice, avec des diamètres des zones d'inhibition de 5mm (figure 36). Les autres extraits des autres souches présentent une nette inhibition dont les diamètres sont mentionnés dans le tableau 14.



Extraits obtenus par précipitation au sulfate d'ammonium    Extraits obtenus par adsorption-désorption

**Figure 36:** Effet antibactérien des extraits lactiques (1: *Lactobacillus plantarum*, 2: *Leuconostoc* sp, 3: *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, 4: *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, 5: *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427).

**Tableau 14:** Le diamètre de la zone d'inhibition de *Salmonella* sp.

Les souches productrices	Le diamètre de la zone d'inhibition en présence de l'extrait lactique trouvé par la méthode	
	Adsorption-désorption	Précipitation au sulfate d'ammonium
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	15mm	21mm
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	19mm	25 mm
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5mm	5mm
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427	13mm	15mm
<i>Leuconostoc</i> sp	15mm	15mm

### 9. Résultat de l'étude de la cinétique de croissance des souches utilisées en culture pure

Après une incubation des souches à 37°C, la croissance bactérienne est suivie par la mesure de la densité optique chaque 20 minute. Le résultat de la cinétique de croissance est présenté dans la figure 37 ; la croissance est exprimée en  $DO=f(t)$ .

La concentration initiale des souches de *Lactococcus*: *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* est 0,300 ; la concentration de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* va augmenter à partir de la 6<sup>ème</sup> heure d'incubation (1,518) et va atteindre sa valeur maximale au bout de 72 heures (1,720).

La concentration initiale de la souche de *Lactobacillus plantarum* est de 0,279 et la concentration maximale est enregistrée après 72 heures d'incubation avec une valeur de 2,762.

La concentration initiale de *Leuconostoc* sp, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 et *Salmonella* sp est 0,169, 0,126 et 0,115 respectivement et la concentration maximale est enregistrée après 48 heures d'incubation avec une valeur de 2,714, 2,786, 2,774 respectivement.

La courbe de croissance des souches bactériennes étudiées montre que les principales phases de croissance (latence et exponentielle) apparaissent durant la période d'incubation de 72 heures ; cependant, certaines particularités ont été notées:

- Une croissance faible et perturbée chez la souche *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* ;
- La souche *Salmonella* sp a atteint la phase de déclin après 48 heures d'incubation ;
- La majorité des souches, leur croissance maximale est enregistrée après 48 heures d'incubation.

A partir de l'analyse des cinétiques de croissance, il est intéressant de relever que les cinq souches lactiques sélectionnées présentent le même profil cinétique au début de la phase de latence, et elles atteignent respectivement leur phase exponentielle au bout de 24 et 48 heures d'incubation avec des densités optiques variables selon l'espèce.

Les résultats de ce test sont représentés dans le tableau 15, la concentration bactérienne est estimée en (DO à 620nm) chez toutes les souches utilisées, dont la vitesse de croissance est calculée selon l'équation suivante :

$$\mu = \frac{\text{Log } N_t - \text{Log } N_0}{\text{Ln } 2 \times T}$$

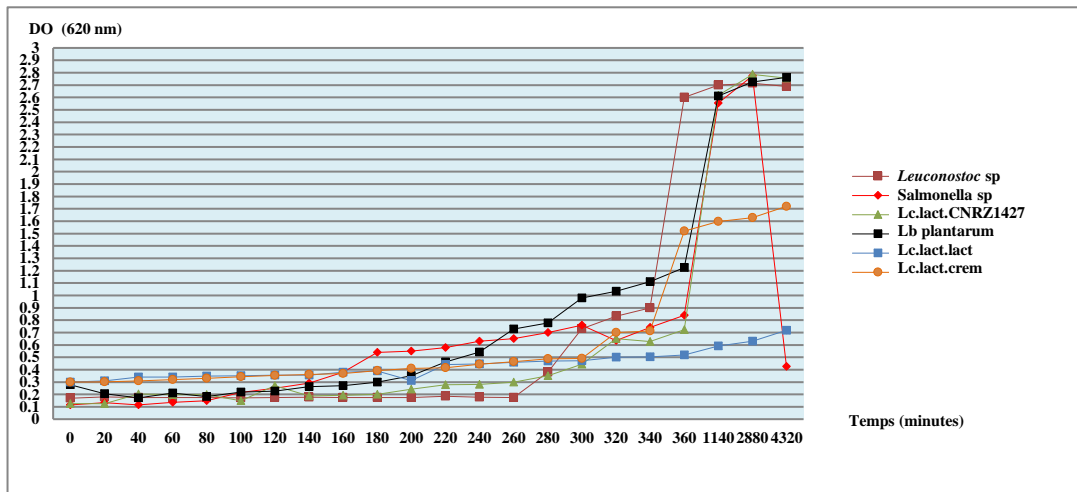
Sois  $N_t$  : la concentration en microorganismes à  $t=72$  heures ;

Sois  $N_0$  : la concentration en microorganismes à  $t=0$  heures ;

Sois  $T$  : la période de temps.

**Tableau 15:** Cinétique de croissance en culture pure.

Culture pure	La concentration bactérienne		La vitesse de croissance spécifique
	t= 0 heure	t= 72 heures	
<i>Salmonella</i> sp	0,115	0,425	0,011
<i>Lactococcus lactis</i> susp <i>lactis</i>	0,300	0,717	7,574
<i>Lactococcus lactis</i> susp <i>cremoris</i>	0,300	1,720	0,015
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,279	2,762	0,019
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427	0,126	2,754	0,026
<i>Leuconostoc</i> sp	0,169	2,688	0,024



**Figure 37:** La cinétique de croissance des souches utilisées.

## 10. Résultat de la croissance de *Salmonella sp* en culture mixte

### 10.1. En présence de l'extrait lactique obtenu par la méthode d'adsorption-désorption

Le suivi de la croissance de *Salmonella sp* en culture mixte a été étudié sur bouillon nutritif.

D'après la figure 38 a, pendant les 72 heures d'incubation, on observe une croissance importante de la souche *Salmonella sp* en culture mixte avec l'extrait de *Leuconostoc sp* (pH 2,5) la DO atteint la valeur 2,479 en comparaison avec sa courbe en culture pure (DO=2,774). On observe une croissance faible de *Salmonella sp* en culture mixte avec l'extrait (pH 2,5) des deux souches *Lactobacillus plantarum* et *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 où la valeur de DO atteint 2,172 et 1,763 respectivement ; en revanche la culture mixte avec l'extrait (pH 2,5) des deux souches *Lactococcus sp* (*Lactococcus lactis* subsp *cremoris* et *Lactococcus lactis* subsp *lactis*) la croissance diminue (les valeurs de DO maximales sont : 0,923 et 0,900 respectivement).

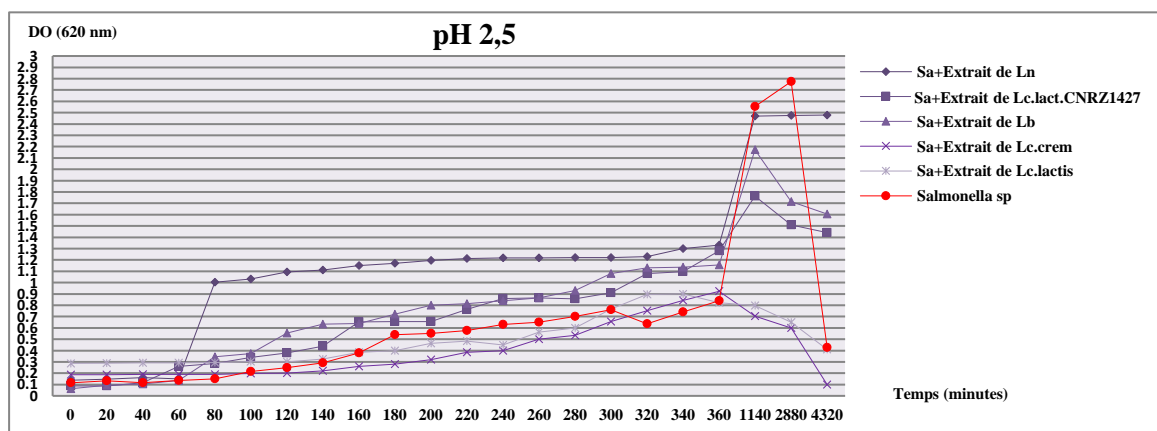
D'après la figure 38 b, on remarque une chute de la DO après la première heure d'incubation le moment d'ajout de l'extrait de *Leuconostoc sp* (pH 4,3) de 0,830 à 0,287 puis va reprendre après la deuxième heure et atteint la valeur 1,255. La croissance de *Salmonella sp* en culture mixte avec l'extrait de *Lactobacillus plantarum* (pH 4,3), on observe une croissance progressive où la valeur maximale de DO enregistré (2,100) plus proche à la valeur maximale de DO en culture pure (2,774). On observe aussi que la valeur de DO de *Salmonella sp* en culture mixte avec l'extrait de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* (pH 4,3) très basse (0,982). Les résultats restent identiques après de l'ajout de l'extrait de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (pH 4,3) (DO=0,923). Par contre, la croissance

de *Salmonella* sp en culture mixte avec l'extrait de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 (pH 4,3) ne commence à augmenter qu'à partir de la 6<sup>ème</sup> heure, où on a enregistré une valeur maximale de DO de 1,276.

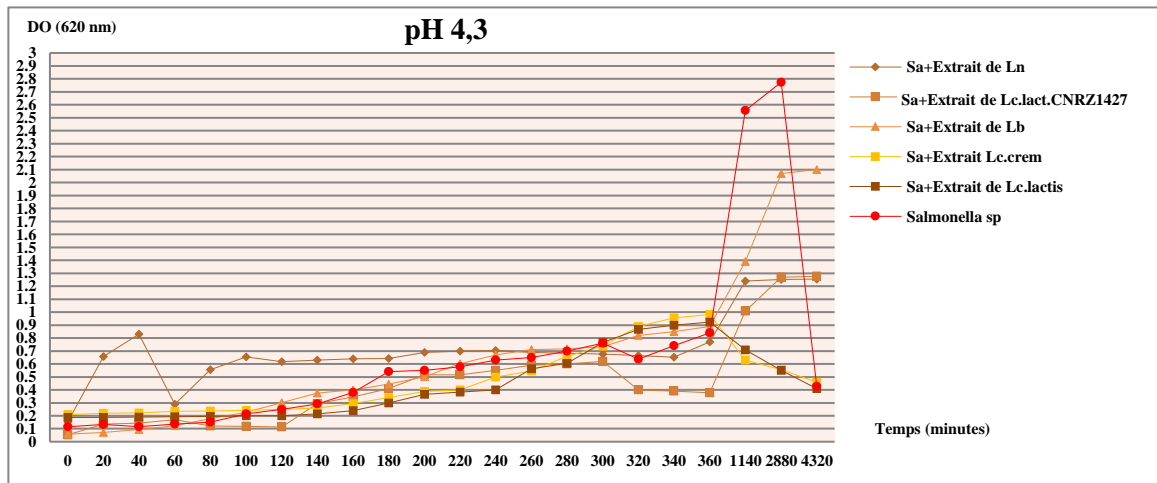
La figure 38 c représente les résultats de la croissance de *Salmonella* sp en culture mixte avec l'extrait des souches lactiques (pH 6,5). L'extrait des deux souches *Lactococcus* sp (pH 6,5) inhibe la croissance de *Salmonella* sp pendant 72 heures d'incubation où on observe une croissance plus agressive en présence de l'extrait de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* (pH 6,5) (DO=0,982) qu'à la présence de l'extrait de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (pH 6,5) (DO=0,923). En général, on note une croissance perturbée de *Salmonella* sp en culture mixte avec l'extrait de *Lactobacillus plantarum* (pH 6,5) (DO=1,011). L'effet inhibiteur de l'extrait (pH 6,5) de *Leuconostoc* sp et de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 est faible où on a enregistré des valeurs maximales de DO de 1,500 et 1,720 respectivement plus proche à la valeur maximale en culture pure (2,774).

D'après les résultats trouvés, on peut affirmer qu'en présence de l'extrait de chaque souche lactique, les valeurs de DO de la souche *Salmonella* sp décroissent progressivement au début de la phase exponentielle et se stabilisent au cours de la phase stationnaire. En présence de l'extrait des deux souches *Lactococcus lactis* subsp *lactis* et *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, l'activité inhibitrice est très élevée et elle est légèrement faible et plus proche en présence de l'extrait des souches suivantes : *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 et *Leuconostoc* sp.

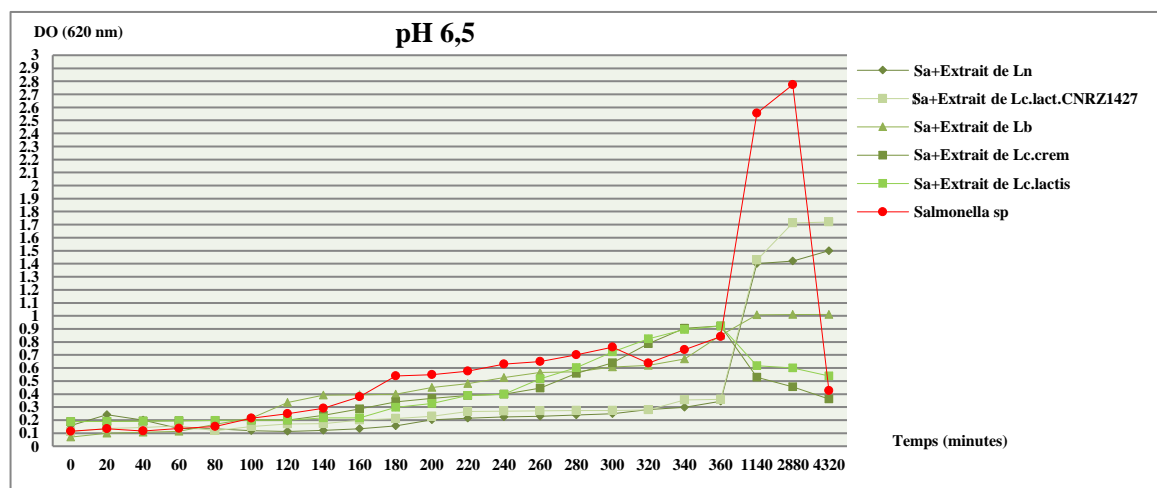
Le taux de croissance de *Salmonella* sp en culture mixte est apparu plus lent par rapport à sa croissance en culture pure. On peut dire donc que la diminution de la croissance de cette bactérie pathogène due à l'inhibition par la production des bactériocines (tableau 16).



a



b



c

**Figure 38:** La croissance de *Salmonella* sp en présence de l'extrait lactique trouvé par Adsorption-Désorption.

**Tableau 16:** Cinétique de croissance en culture mixte avec l'extrait trouvé par Adsorption-Désorption.

En culture mixte	Concentration bactérienne						La vitesse de croissance spécifique		
	t= 0 heure			t= 72 heures			pH 2,5	pH 4,3	pH 6,5
	pH 2,5	pH 4,3	pH 65	pH 2,5	pH 4,3	pH 65			
<i>Salmonella</i> sp	0,115	0,115	0,115	0,425	0,425	0,425	<b>0,568</b>	<b>0,568</b>	<b>0,568</b>
<i>Salmonella</i> sp + extrait de <i>Lactococcus lactis</i> susp <i>lactis</i>	0,286	0,187	0,189	0,410	0,410	0,539	<b>0,156</b>	<b>6,832</b>	<b>9,117</b>
<i>Salmonella</i> sp + extrait de <i>Lactococcus lactis</i> susp <i>cremoris</i>	0,187	0,208	0,189	0,100	0,460	0,360	<b>0,272</b>	<b>6,892</b>	<b>5,610</b>
<i>Salmonella</i> sp + extrait de <i>Lactobacillus plantarum</i>	0,063	0,058	0,070	1,605	2,100	1,010	<b>1,405</b>	<b>0,031</b>	<b>0,109</b>
<i>Salmonella</i> sp + extrait de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427	0,087	0,052	0,112	1,440	1,276	1,720	<b>1,218</b>	<b>0,027</b>	<b>0,023</b>
<i>Salmonella</i> sp + extrait de <i>Leuconostoc</i> sp	0,138	0,153	0,159	2,479	1,254	1,500	<b>1,254</b>	<b>0,018</b>	<b>0,019</b>

## **10.2. En présence de l'extrait lactique obtenu par la méthode précipitation au sulfate d'ammonium**

Après avoir préparé la solution de la souche pathogène *Salmonella* sp, on l'a incubé à 37°C, après on a mesuré la croissance bactérienne via la densité optique. Après la première heure, on a ajouté l'extrait lactique à différentes valeurs de pH (2.5, 4.3, 6.5). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 39 (a, b, c).

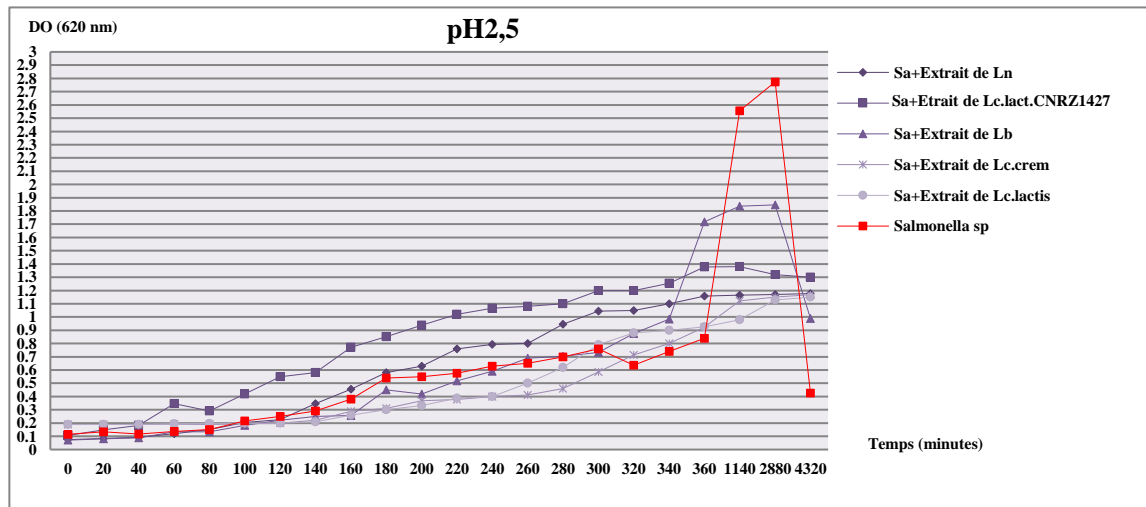
D'après les résultats obtenus on observe une croissance très faible de *Salmonella* sp une fois qu'on a ajouté l'extrait lactique où il présente un fort pouvoir inhibiteur pendant toute la période de 72 heures.

En présence de l'extrait de *Lactobacillus plantarum* (pH 2,5), la croissance était moyenne et atteint son maximum après 48 heures d'incubation où on a enregistré la valeur de DO=1,846 ; à l'exception qu'en présence de l'extrait (pH 2,5) de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* (1,167) et *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (1,149) qui montre une résistance élevée au pH bas ; la croissance était faible. La croissance de *Salmonella* sp est plus ou moins importante en présence de l'extrait (pH 2,5) de chacune des souches *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 (1,380) et *Leuconostoc* sp (1,177).

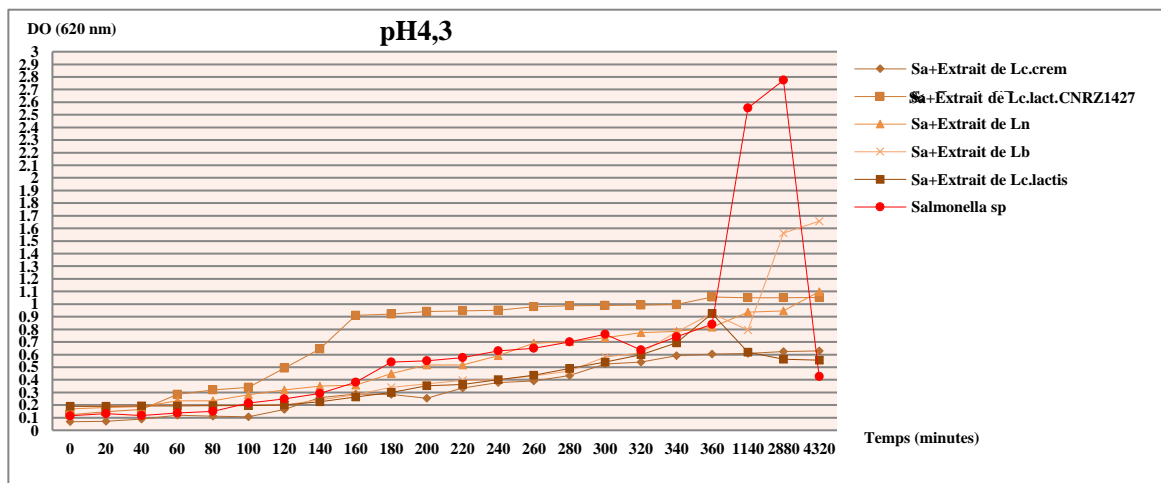
La croissance de *Salmonella* sp est plus ou moins faible en présence de chaque extrait lactique à pH 4,3 (figure 39 b).

La neutralisation des extraits (pH 6,5) entraîne une diminution agressive de la croissance de *Salmonella* sp (figure 39 c). En général, la croissance de *Salmonella* sp est très sensible aux extraits moins acides (pH 6,5), le nombre de cellules reste faible et stable durant les 72 heures d'incubation où il atteint, par exemple, en présence de l'extrait de : *Lactobacillus plantarum* 0,990, *Leuconostoc* sp 0,710, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 0,421, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* 0,727, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* 0,632.

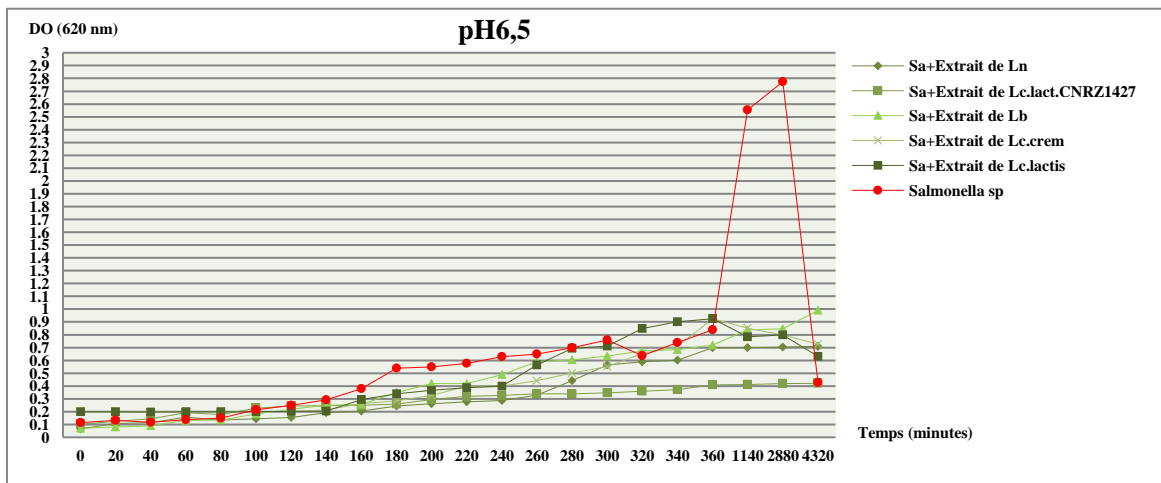
Le taux de croissance de *Salmonella* sp en culture mixte avec l'extrait lactique trouvé par la précipitation au sulfate d'ammonium est apparu plus lent par rapport à sa croissance en culture pure et mixte avec l'extrait trouvé par la méthode adsorption-désorption. On peut dire donc que la diminution de la croissance de cette bactérie pathogène due à une inhibition par la production des bactériocines (tableau 17).



a



b



c

**Figure 39:** La croissance de *Salmonella* sp en présence de l'extrait lactique trouvé par précipitation au sulfate d'ammonium.

**Tableau 17:** Cinétique de croissance en culture mixte avec l'extrait trouvé par précipitation au sulfate d'ammonium.

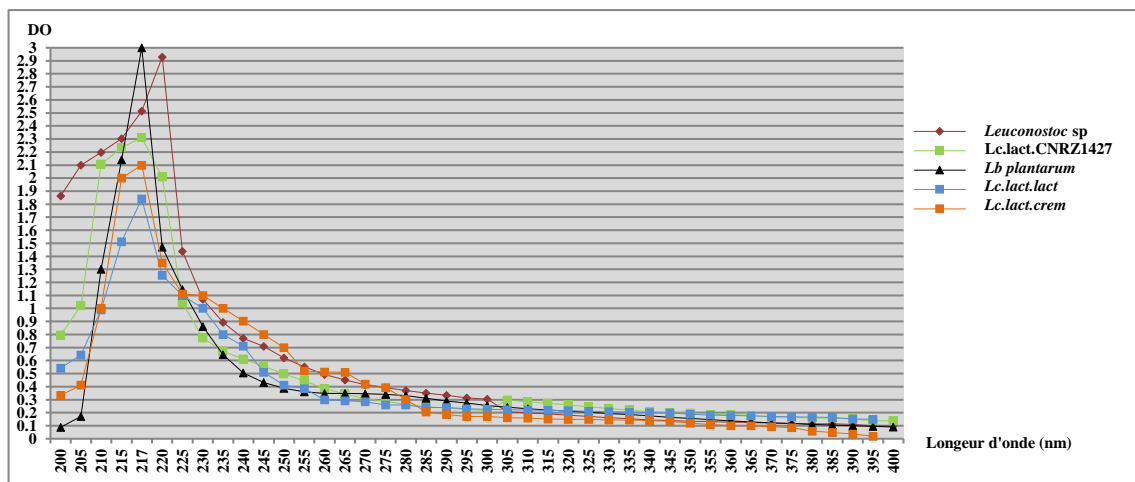
En culture mixte	Concentration bactérienne						La vitesse de croissance spécifique		
	t= 0 heure			t= 72 heures			pH 2,5	pH 4,3	pH 6.5
	pH 2,5	pH 4,3	pH 65	pH 2,5	pH 4,3	pH 65			
<i>Salmonella</i> sp	0,115	0,115	0,115	0,425	0,425	0,425	<b>0,568</b>	<b>0,568</b>	<b>0,568</b>
<i>Salmonella</i> sp + extrait de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	0,189	0,190	0,199	1,149	0,556	0,632	<b>0,015</b>	<b>9,357</b>	<b>0,01</b>
<i>Salmonella</i> sp + extrait de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	0,189	0,170	0,199	1,167	1,099	0,726	<b>0,015</b>	<b>0,016</b>	<b>0,011</b>
<i>Salmonella</i> sp + extrait de <i>Lactobacillus plantarum</i>	0,070	0,190	0,070	0,990	1,657	0,99	<b>0,064</b>	<b>0,018</b>	<b>0,064</b>
<i>Salmonella</i> sp + extrait de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427	0,107	0,123	0,101	1,300	1,052	0,420	<b>0,021</b>	<b>0,018</b>	<b>0,012</b>
<i>Salmonella</i> sp + extrait de <i>Leuconostoc</i> sp	0,074	0,068	0,066	1,177	0,629	0,71	<b>0,024</b>	<b>0,019</b>	<b>0,020</b>

## 11. Résultat de la caractérisation de la substance inhibitrice

### 11.1. Test UV-Visible

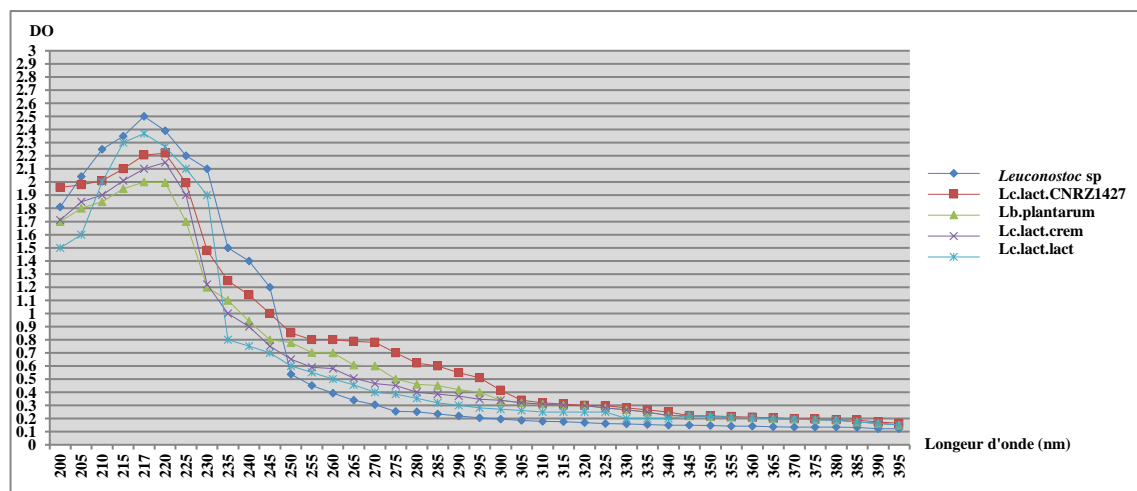
On a réalisé une extraction de la substance inhibitrice (peptide bioactif) par la méthode : précipitation au sulfate d'ammonium ensuite une analyse par l'UV de 200 jusqu'à 400nm ; la figure 40 représente le résultat obtenu.

On observe la présence d'une absorbance maximale de 3,00 à 218nm, 2,93 à 220nm, 2,31 à 217nm, 2,100 à 220nm, 1,841 à 220nm pour les extraits des souches suivantes : *Lactobacillus plantarum* ; *Leuconostoc* sp ; *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 ; *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* et *Lactococcus lactis* subsp *lactis* respectivement.



**Figure 40:** Résultat de l'analyse par le spectrophotomètre des extraits obtenus par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium.

Après extraction de la bactériocine par la méthode d'adsorption-désorption décrite par Yang et al. (1992), on a réalisé une analyse par le spectrophotomètre UV de 200 jusqu'à 400nm. La figure 41 représente le résultat obtenu de l'extrait de chaque souche lactique utilisée. On observe la présence d'une absorbance maximale de : 2,500, 2,370, 2,220, 2,150, 2,000 ; aux longueurs d'onde : 217nm, 217nm, 225nm, 225nm, 220nm; des extraits des souches suivantes *Leuconostoc* sp, *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Lactobacillus plantarum* respectivement.



**Figure 41:** Résultat de l'analyse par le spectrophotomètre des extraits obtenus par la méthode d'adsorption-désorption.

## 11.2. Test HPLC

La détection du standard injecté : Nisine par un spectrophotomètre UV, permet d'obtenir un pic qui résulte de l'absorption (AU) de cette molécule en fonction du temps de rétention (RT) (figure 42).

La détection des peptides bioactifs par chromatographie liquide haute performance dans les extraits trouvés à partir des cinq cultures bactériennes lactiques qui ont montré un effet inhibiteur, a permis d'obtenir des pics résultant de l'absorption (AU) en fonction du temps de rétention (RT) (figure 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52).

Le phénomène de plusieurs pics observés peut être dû à la présence de certaines substances (impuretés, substances du milieu de culture, substances présentes au préalable dans la colonne, autres substances antibactériennes ...etc.).

Afin de déterminer les bactériocines responsables de cette inhibition, une comparaison est faite par le calcul de la différence entre le temps de rétention du pic standard et celui du pic très proche (en termes de valeur de RT).

Selon la figure 33, le RT du pic de la Nisine est de 8.619 min à 220.4nm, 8.632 min à 226.4nm, 8.639 min à 230.4nm, 8.660 min à 284.4nm et 8.670min à 291.4nm ; nous avons obtenu les résultats qui sont représentés par le tableau 18.

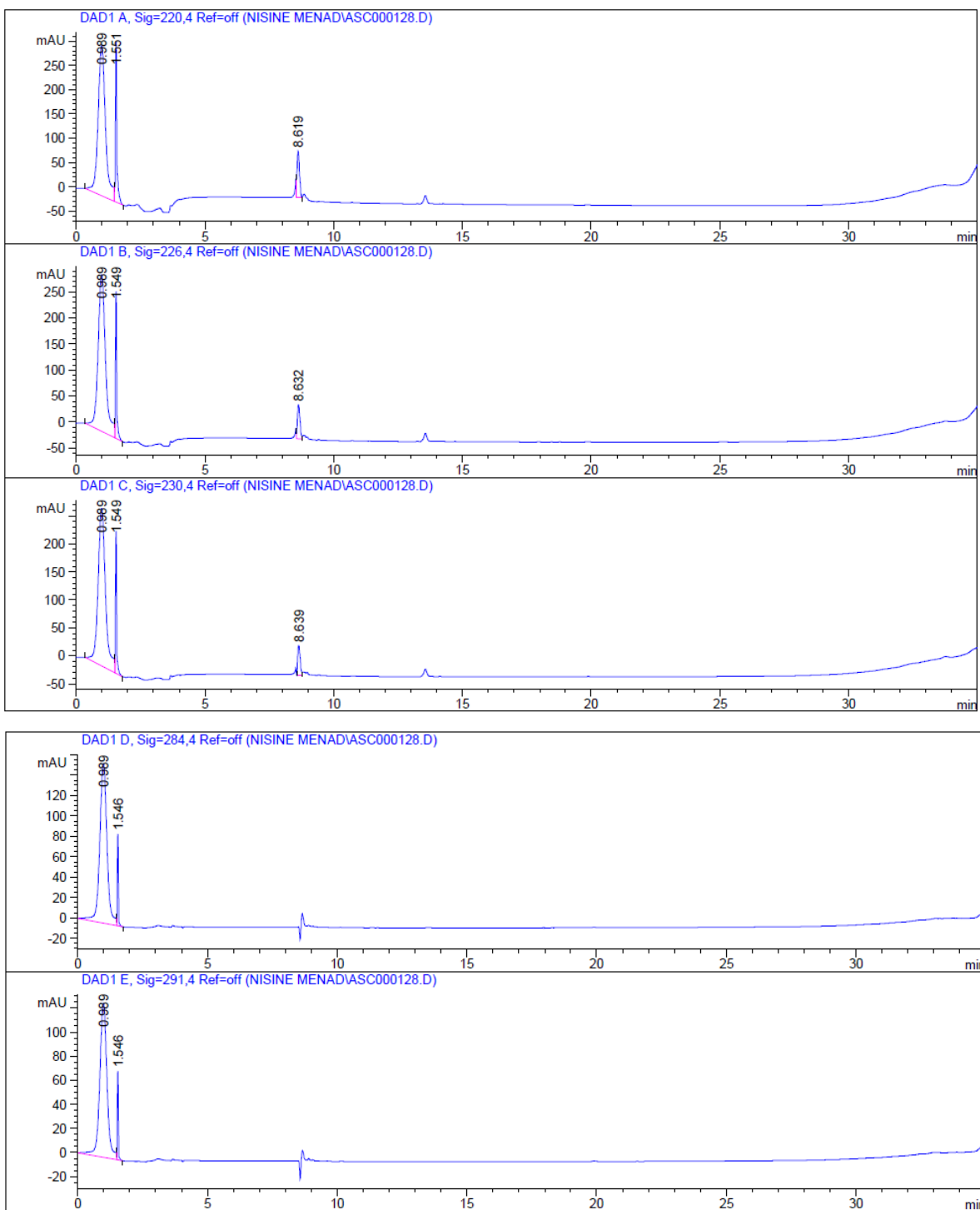
L'analyse qualitative des extraits, a donné des petites différences (D) par rapport au temps de rétention (RT) de la Nisine, molécule standard pour toutes les cultures bactériennes choisies et par les deux méthodes d'extraction (tableau 19). Ces résultats démontrent que l'inhibition de la souche pathogène *Salmonella* sp peut être due à la présence d'une bactériocine.

**Tableau 18 :** Analyse qualitative des extraits trouvés par la méthode d'adsorption-désorption.

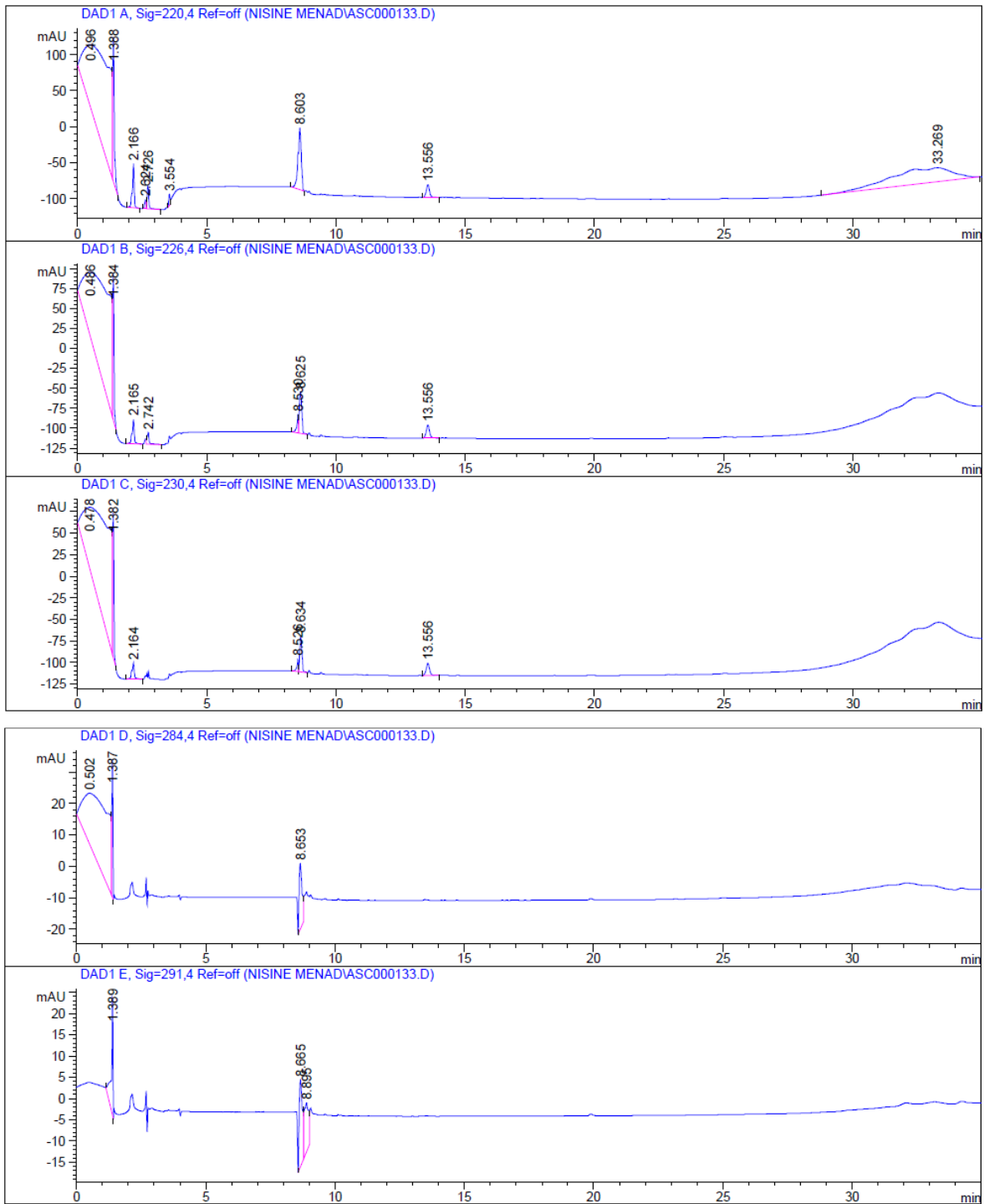
Longueur d'onde Echantillon	RT (min) de l'extrait trouvé par la méthode d'Adsorption-Désorption					D (différence en min)				
	220.4nm	226.4nm	230.4nm	284.4nm	291.4nm	220.4nm	226.4nm	230.4nm	284.4nm	291.4nm
Nisine	8,619	8,632	8,639	8,660	8,670					
Extrait de <i>Leuconostoc</i> sp	8,603	8,625	8,634	8,653	8,665	0,016	0,007	0,005	0,007	0,005
Extrait de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	8,660	8,665	8,665	8,658	8,661	0,041	0,033	0,026	0,002	0,009
Extrait de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	8,607	8,624	8,631	8,640	8,648	0,012	0,008	0,008	0,02	0,022
Extrait de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427	8,600	8,627	8,636	8,660	8,671	0,019	0,005	0,005	0	0,001
Extrait de <i>Lactobacillus</i> sp	8,721	8,588	8,585	8,538	8,795	0,102	0,044	0,044	0,122	0,125

**Tableau 19 :** Analyse qualitative des extraits trouvés par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium.

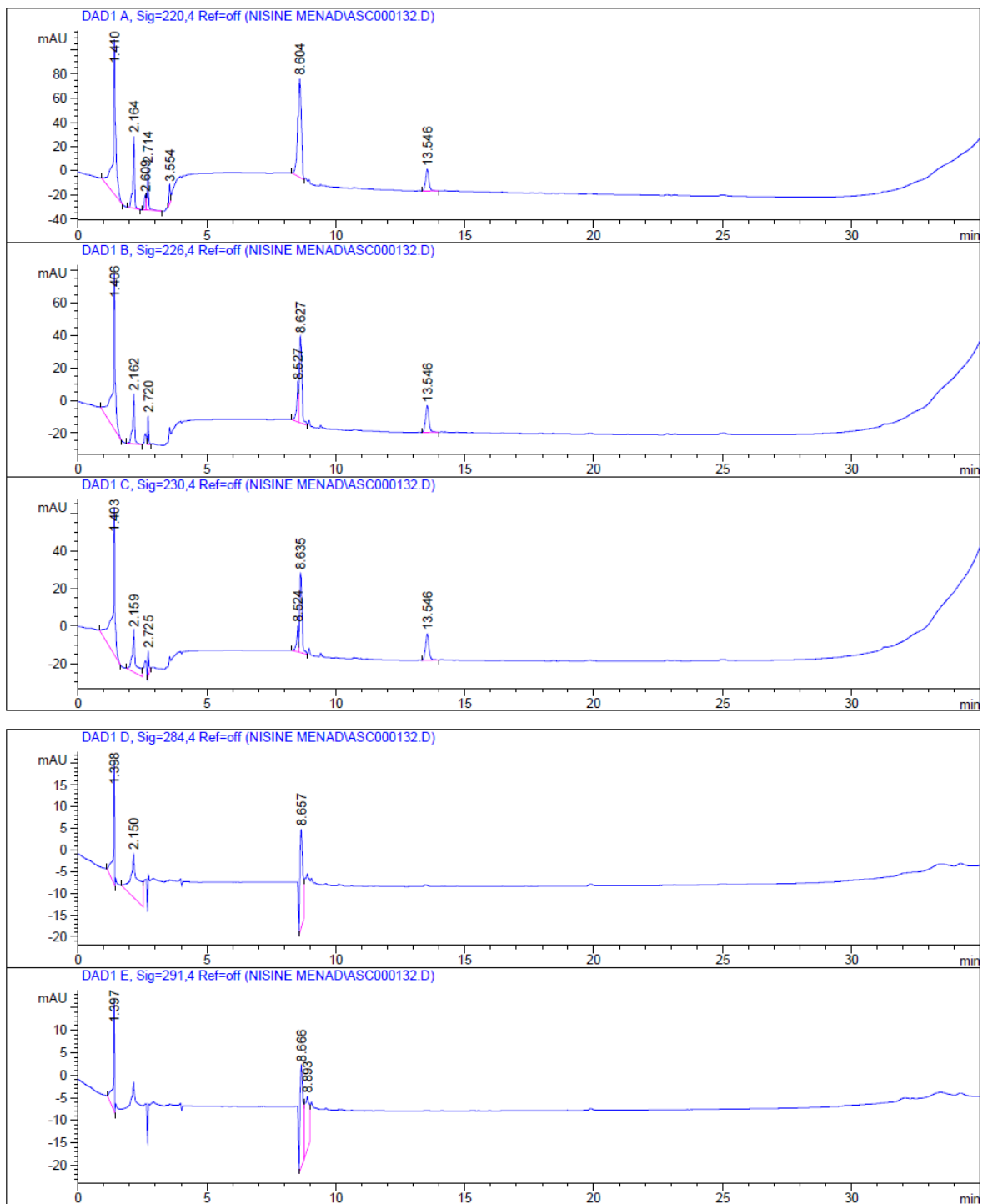
Longueur d'onde Echantillon	RT (min) de l'extrait trouvé par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium					D (différence en min)				
	220.4nm	226.4nm	230.4nm	284.4nm	291.4nm	220.4nm	226.4nm	230.4nm	284.4nm	291.4nm
Nisine	8,619	8,632	8,639	8,660	8,670					
Extrait de <i>Leuconostoc</i> sp	8,604	8,627	8,635	8,657	8,666	0,015	0,005	0,004	0,003	0,004
Extrait de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	8,636	8,646	8,649	8,658	8,661	0,017	0,014	0,01	0,002	0,009
Extrait de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>	8,603	8,624	8,633	8,685	8,666	0,016	0,008	0,006	0,025	0,004
Extrait de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> CNRZ 1427	8,625	8,653	8,657	8,666	8,669	0,006	0,021	0,018	0,006	0,001
Extrait de <i>Lactobacillus</i> sp	8,663	8,657	8,656	8,660	8,663	0,044	0,025	0,017	0	0,007



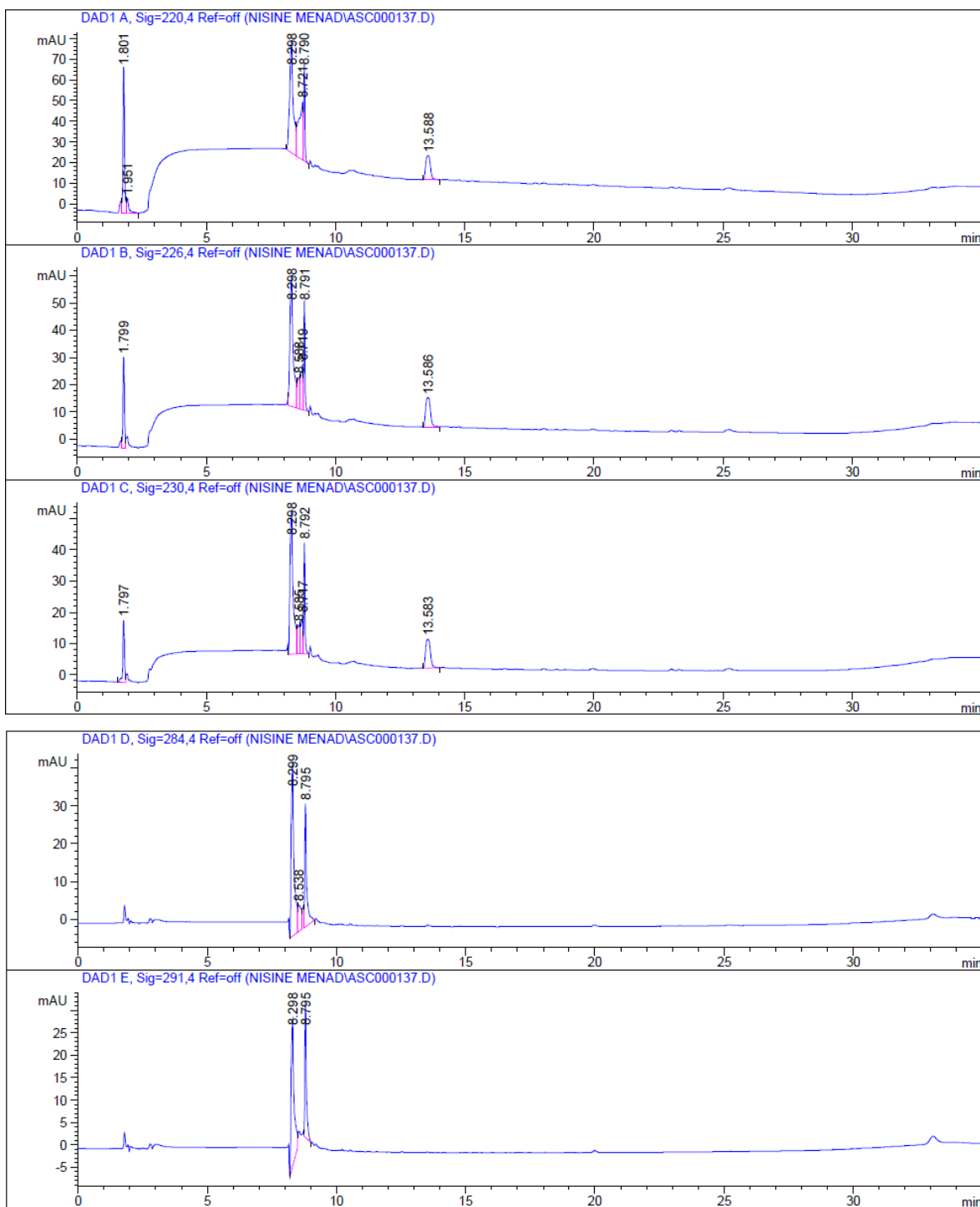
**Figure 42:** Résultat de HPLC de la Nisine.



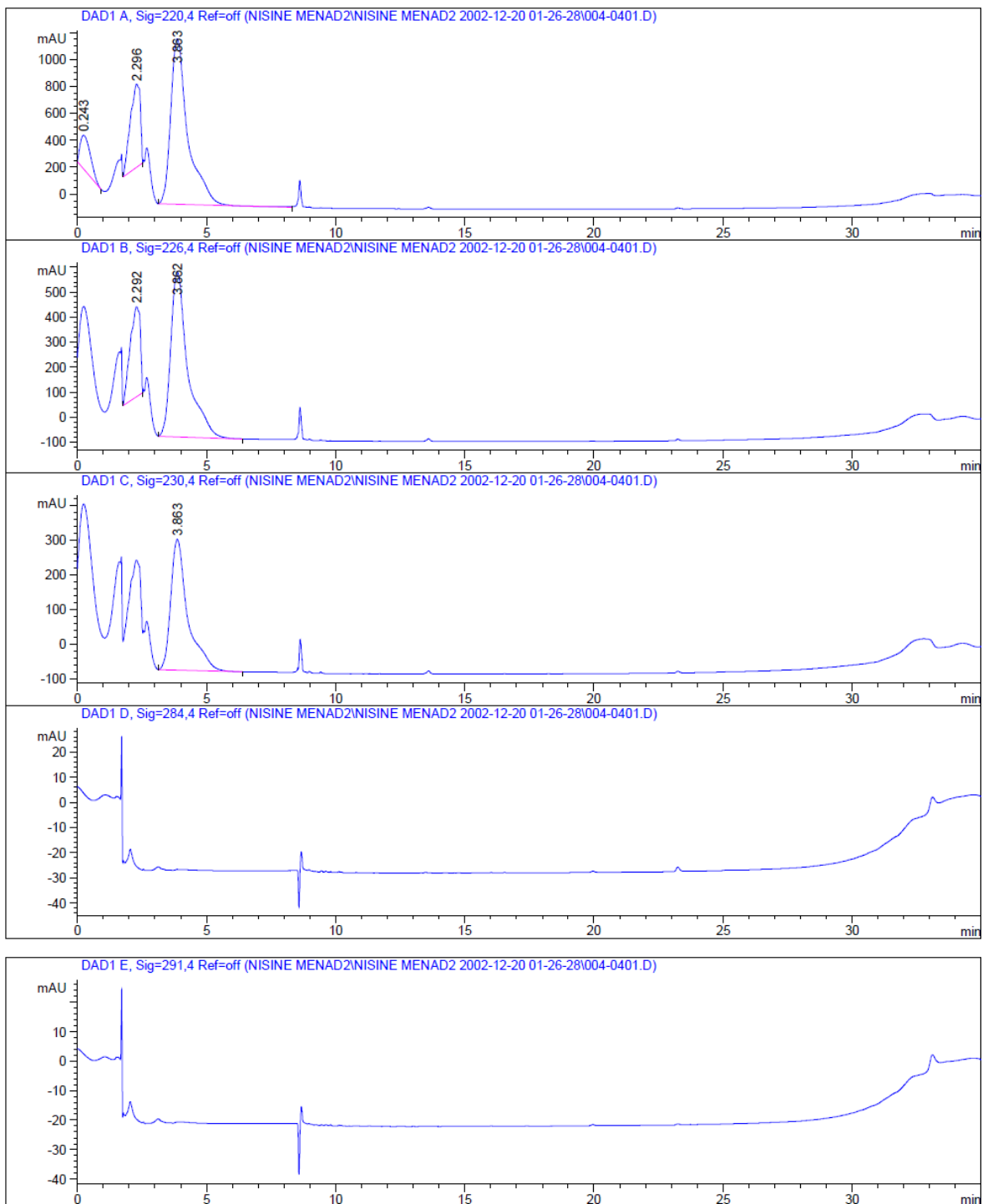
**Figure 43:** Résultat de HPLC de l'extrait de la souche *Leuconostoc* sp obtenu par adsorption-désorption.



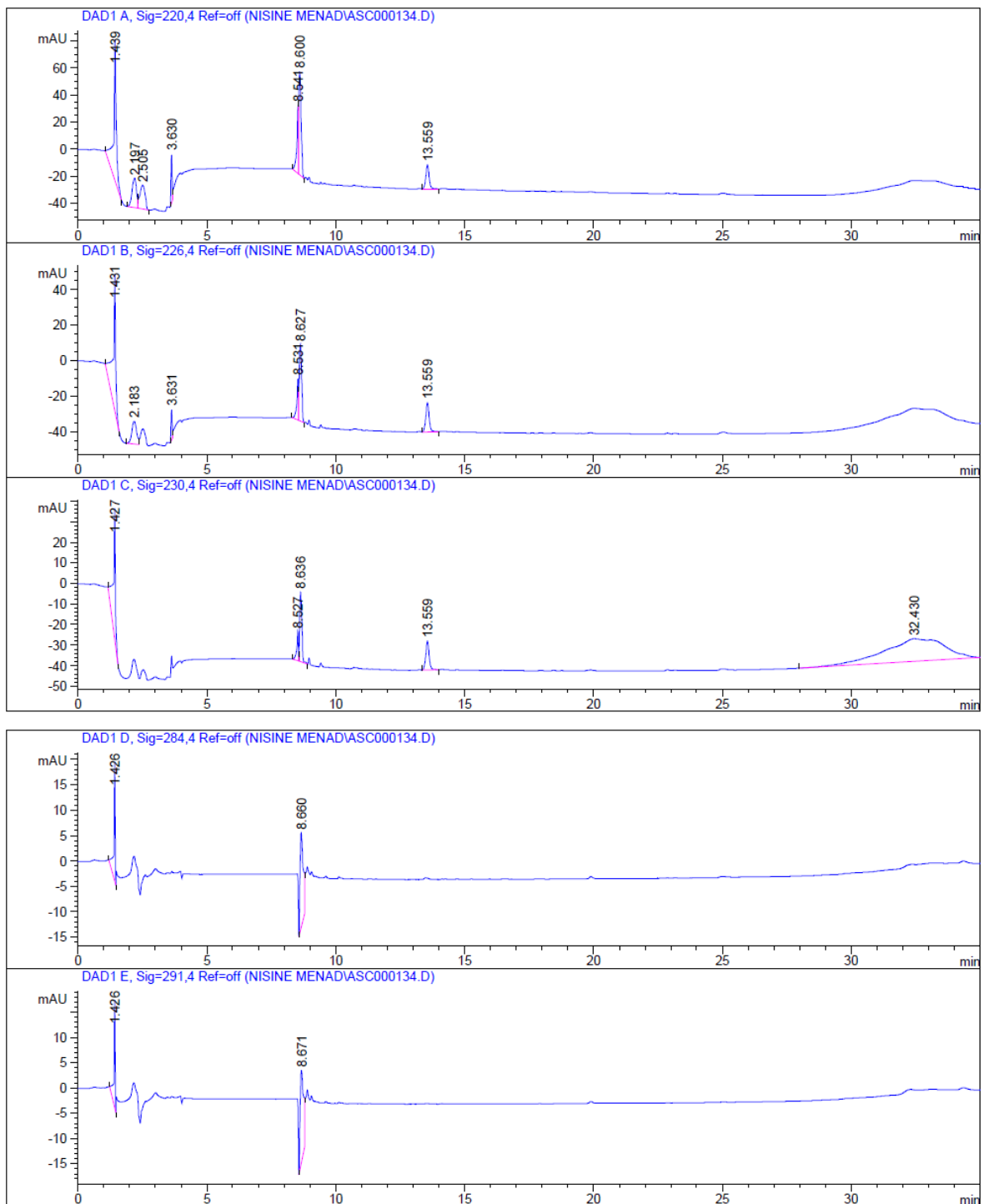
**Figure 44:** Résultat de HPLC de l'extrait de la souche *Leuconostoc* sp obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium.



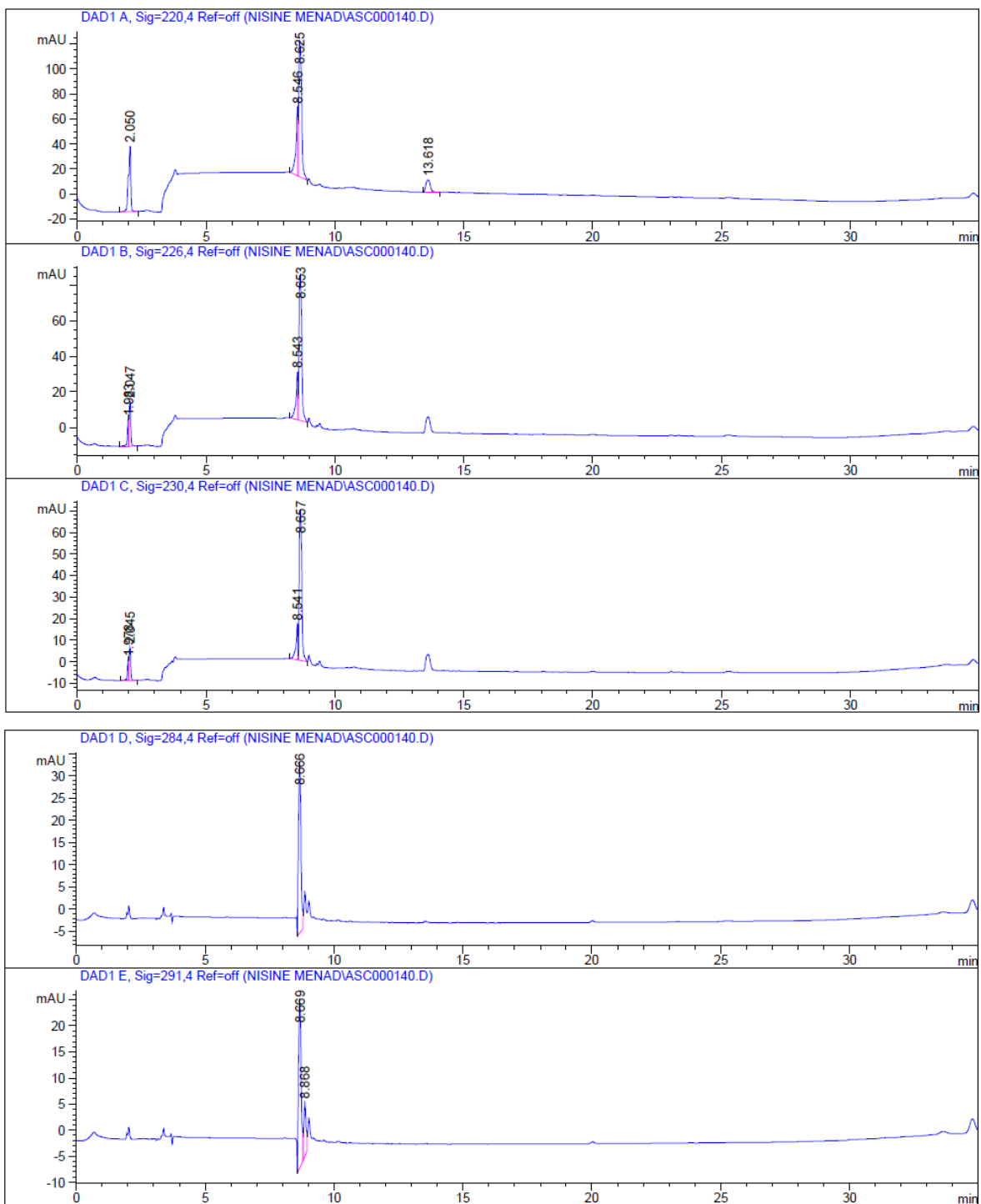
**Figure 45:** Résultat de HPLC de l'extrait de la souche *Lactobacillus plantarum* obtenu par adsorption-désorption.



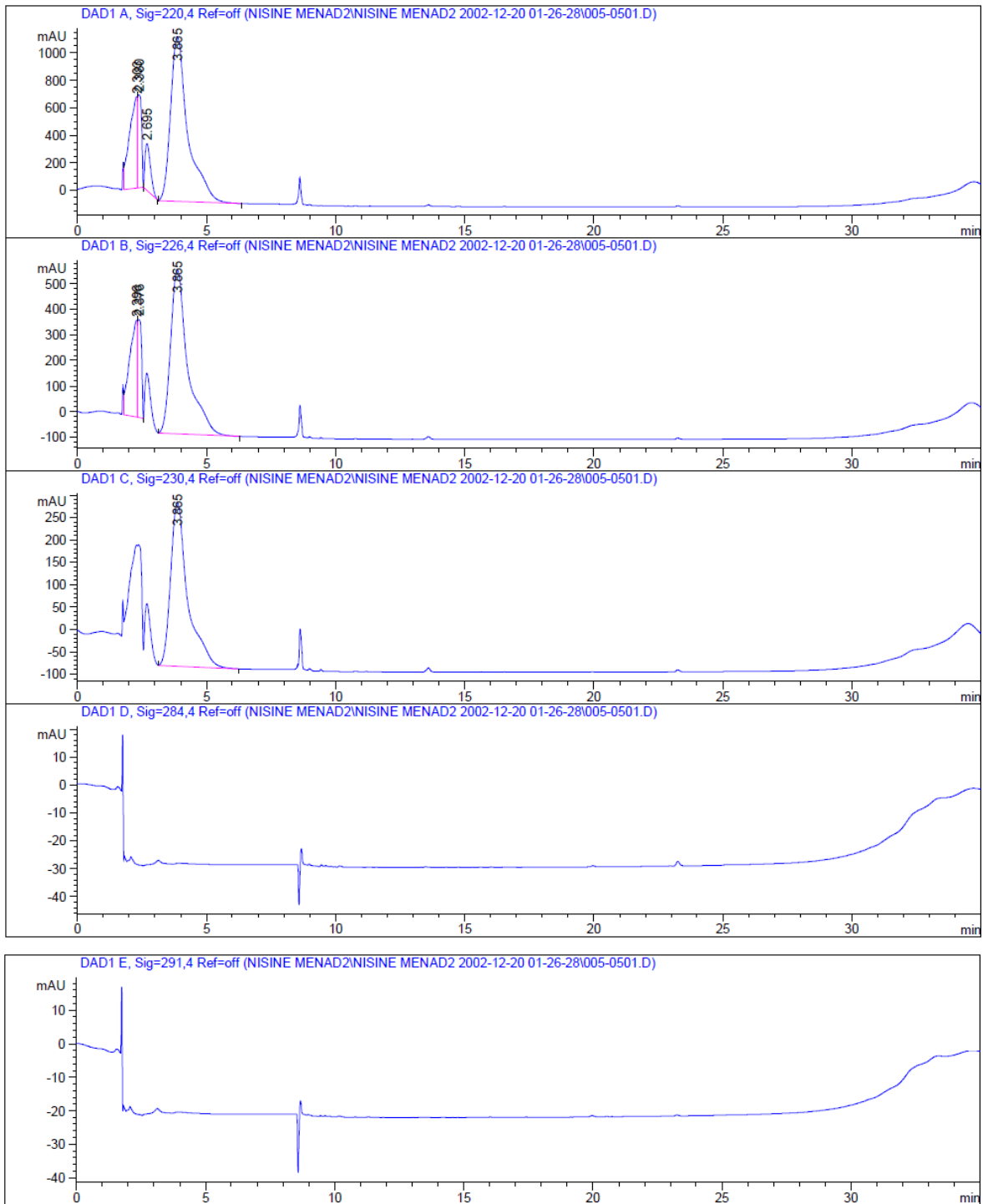
**Figure 46:** Résultat de HPLC de l'extrait de la souche *Lactobacillus plantarum* obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium.



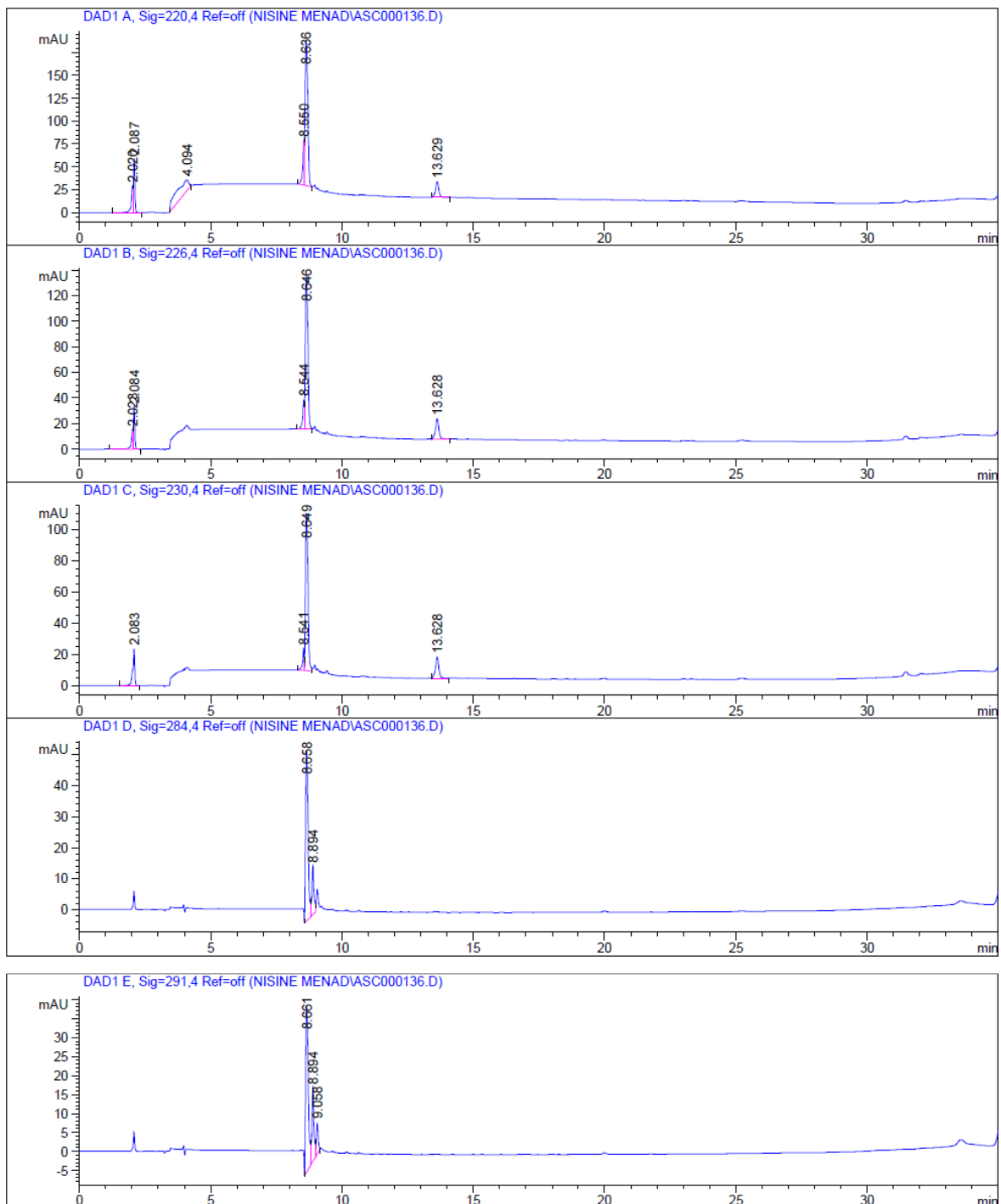
**Figure 47:** Résultat de HPLC de l'extrait de la souche *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 obtenu par adsorption-désorption.



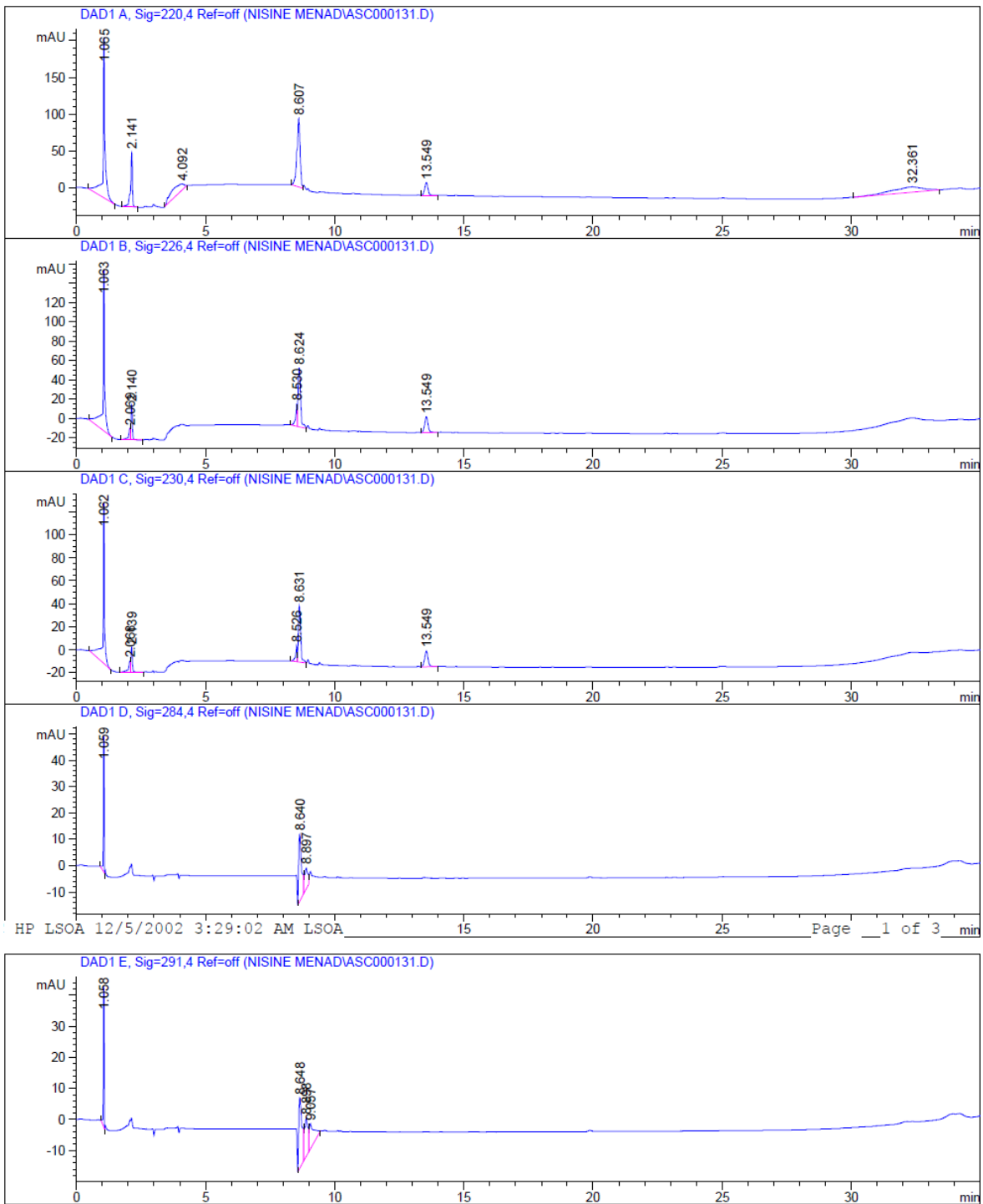
**Figure 48:** Résultat de HPLC de l'extrait de la souche *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium.



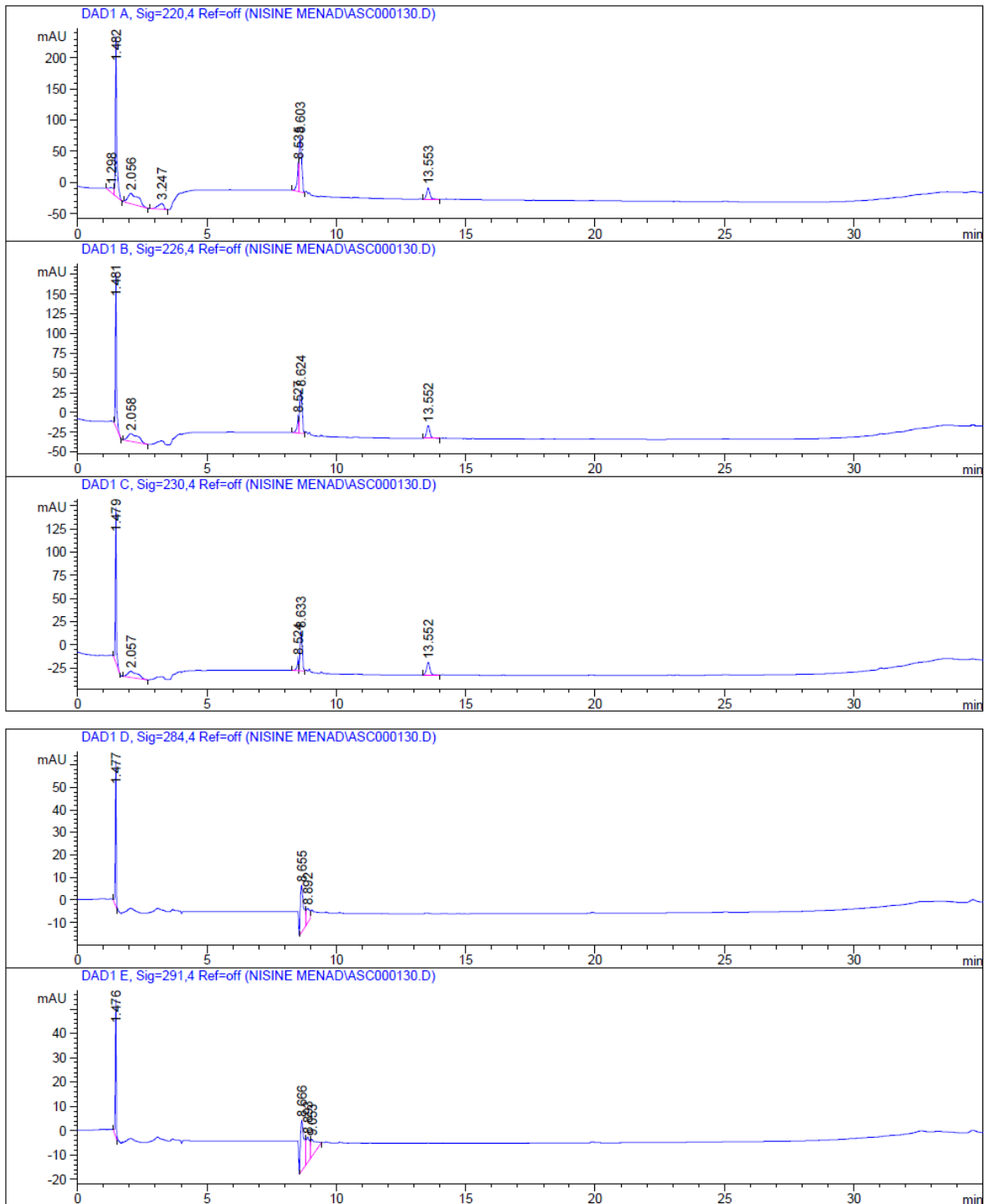
**Figure 49:** Résultat de HPLC de l'extrait de la souche *Lactococcus lactis* subsp *lactis* obtenu par adsorption-désorption.



**Figure 50:** Résultat de HPLC de l'extrait de la souche *Lactococcus lactis* subsp *lactis* obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium.



**Figure 51:** Résultat de HPLC de l'extrait de la souche *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* obtenu par adsorption-désorption.

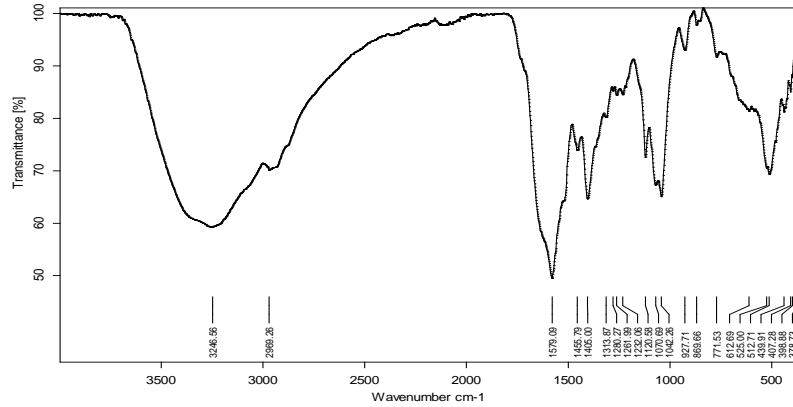


**Figure 52:** Résultat de HPLC de l'extrait de la souche *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium.

### 11.3. Test Infrarouge

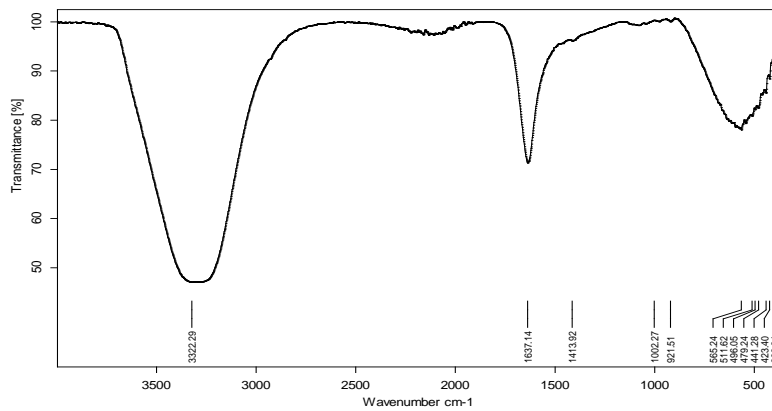
Les spectres IRTF des différents échantillons représentés sur la figure 53. En ce qui concerne les spectres des extraits sont pratiquement identiques, on observe la présence des bandes caractéristiques aux:

- Groupement hydroxyle O-H au nombre d'onde de  $3000\text{cm}^{-1}$  à  $3500\text{cm}^{-1}$ .
- Vibrations d'élongation des C-H des chaînes carbonés saturées, situées entre  $2800\text{cm}^{-1}$  à  $3000\text{cm}^{-1}$ .
- Une présence des bandes situées entre  $1600\text{cm}^{-1}$  et  $1400\text{cm}^{-1}$  correspond à l'eau.



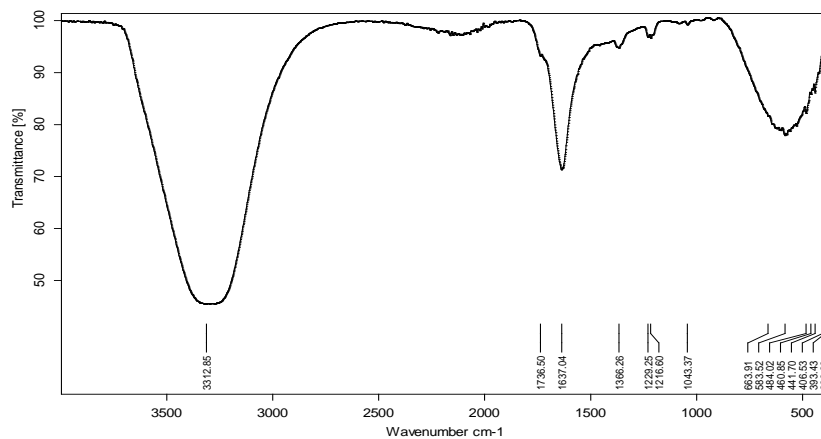
C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\menad\MEAS\17.0 7 ATR platinum Diamond 1 Ref 10/04/2014

Seite 1 von 1



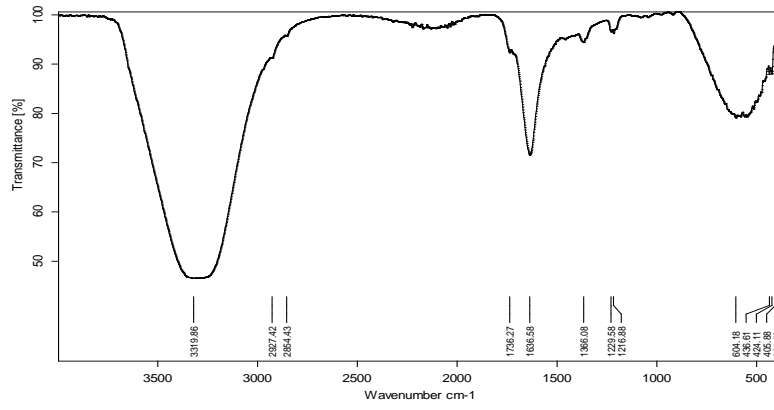
C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\menad\MEAS\11.0 11 ATR platinum Diamond 1 Ref 10/04/2014

Seite 1 von 1



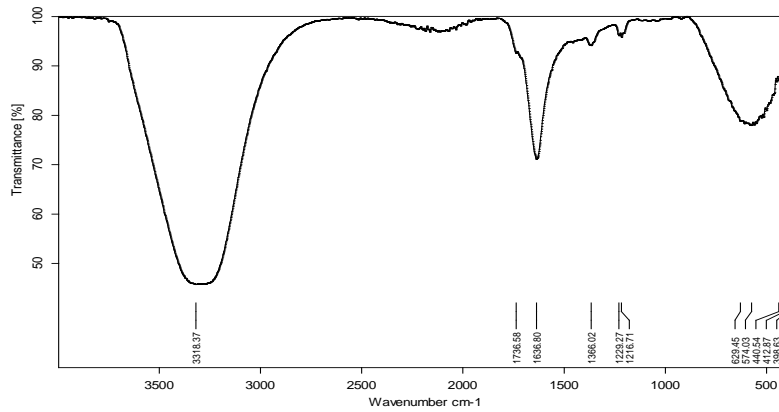
C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\menad\MEAS\22.0 22 ATR platinum Diamond 1 Ref 10/04/2014

Seite 1 von 1



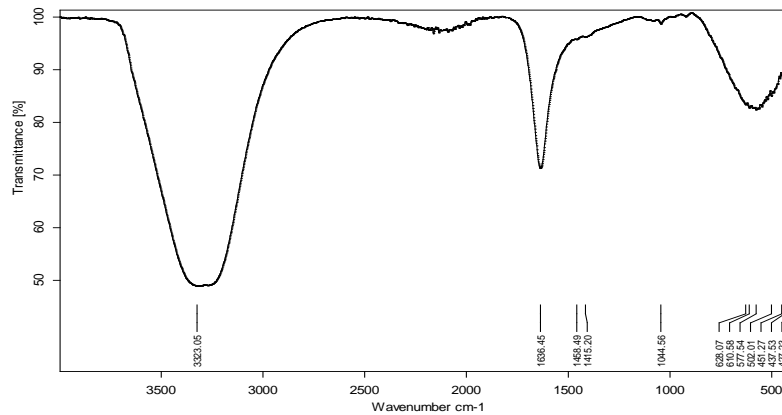
C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\menadi\MEAS\328.0 28 ATR platinum Diamond 1 Ref 10/04/2014

Seite 1 von 1



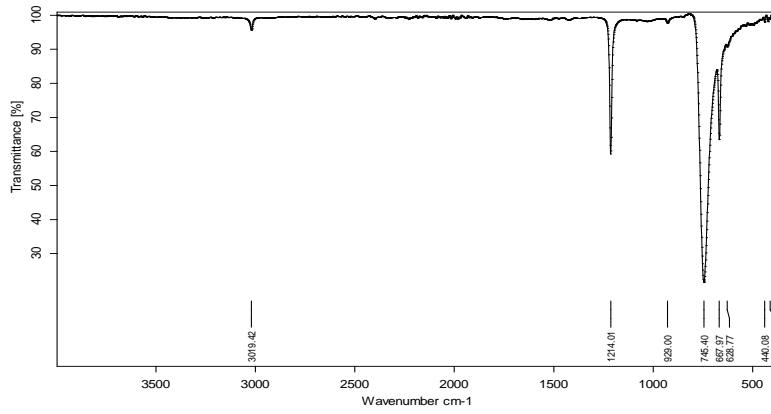
C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\menadi\MEAS\335.0 35 ATR platinum Diamond 1 Ref 10/04/2014

Seite 1 von 1



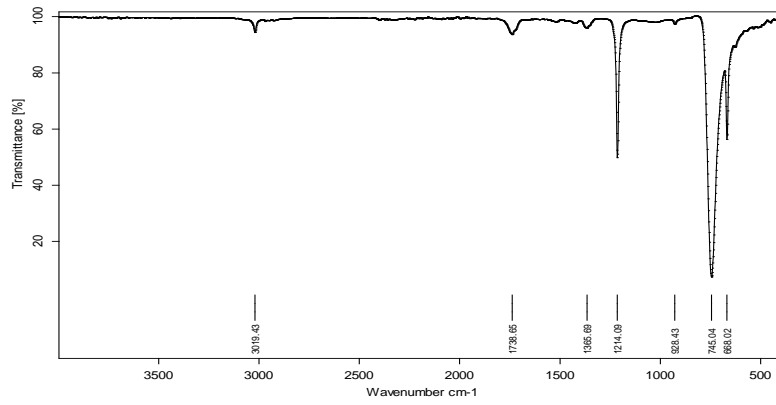
C:\Program Files\OPUS\_65\MEAS\40.0 40 ATR platinum Diamond 1 Ref 10/04/2014

Seite 1 von 1



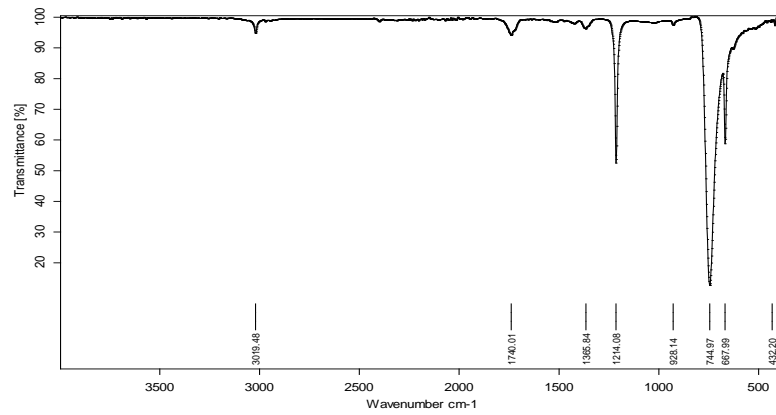
C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\menad\MEAS\59.0 59 ATR platinum Diamond 1 Ref 10/04/2014

Seite 1 von 1



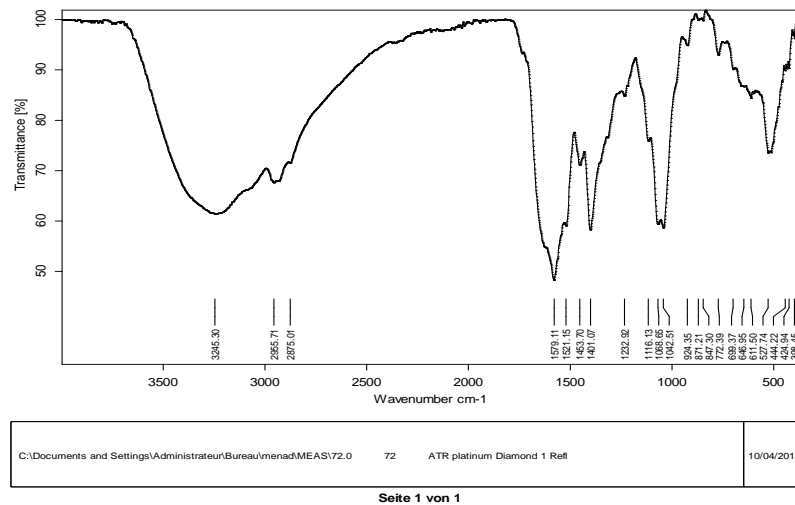
C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\menad\MEAS\61.1 61 ATR platinum Diamond 1 Ref 10/04/2014

Seite 1 von 1



C:\Documents and Settings\Administrateur\Bureau\menad\MEAS\67.0 67 ATR platinum Diamond 1 Ref 10/04/2014

Seite 1 von 1



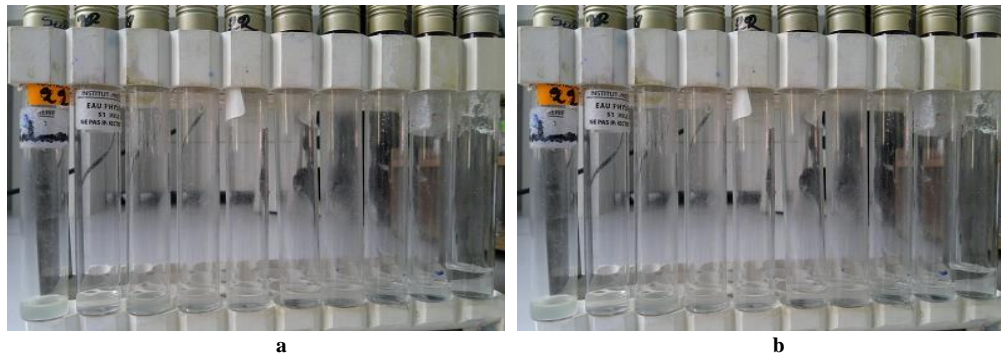
**Figure 53:** Résultat de l'IRTF des extraits lactiques.

## 12. Résultat de la détermination des concentrations minimales inhibitrices des peptides bioactifs

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont variables selon les espèces bactériennes et les souches (**Ennahar et al., 2000**). Les spectres d'inhibition des bactériocines s'établissent à partir des extraits bactériociniques.

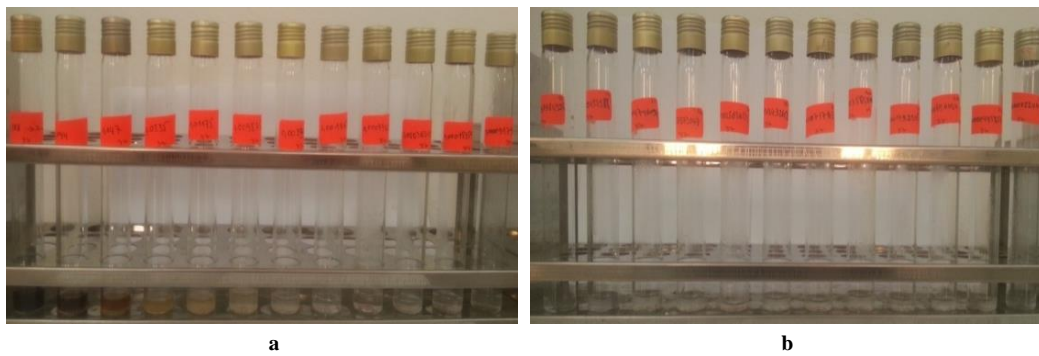
Dans notre cas, l'activité anti-*Salmonella* a commencée à partir des concentrations : 0.004g/mL ; 0.009g/mL ; 0.008g/mL ; 0.013g/mL ; 0.020g/mL pour les extraits obtenus par la méthode d'adsorption-désorption des souches : *Leuconostoc* sp, *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 respectivement (figures 54a, 55a, 56a, 57a, 58a). Et pour le cas des extraits obtenus par la méthode précipitation au sulfate d'ammonium, les CMI sont : 0.005g/mL ; 0.006g/mL ; 0.010g/mL ; 0.011g/mL ; 0.020g/mL des souches : *Leuconostoc* sp, *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 respectivement (figures 54b, 55b, 56b, 57b, 58b).

On remarque que l'activité antibactérienne de l'extrait de la souche *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* est plus prononcée que celle de la souche *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, alors que l'activité de l'extrait de la souche *Lactobacillus plantarum* a disparu, celle de la souche *Leuconostoc* sp persiste. De plus, le pouvoir inhibiteur d'une molécule antimicrobienne est inversement proportionnel à sa CMI (**Sebti, 2002 ; Izquierdo, 2009**).



**Figure 54:** La CMI de l'extrait de *Leuconostoc* sp.

**a :** méthode d'Adsorption-Désorption ; **b :** méthode de précipitation au sulfate d'ammonium



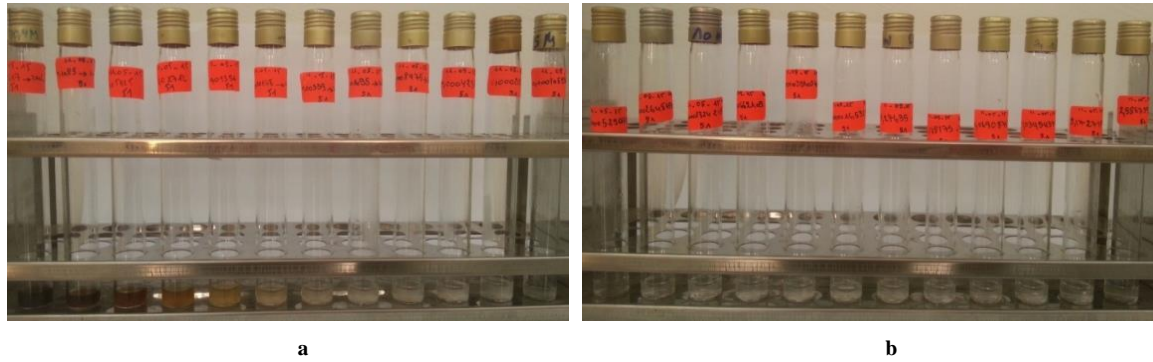
**Figure 55:** La CMI de l'extrait de *Lactobacillus plantarum*.

**a :** méthode d'Adsorption-Désorption ; **b :** méthode de précipitation au sulfate d'ammonium



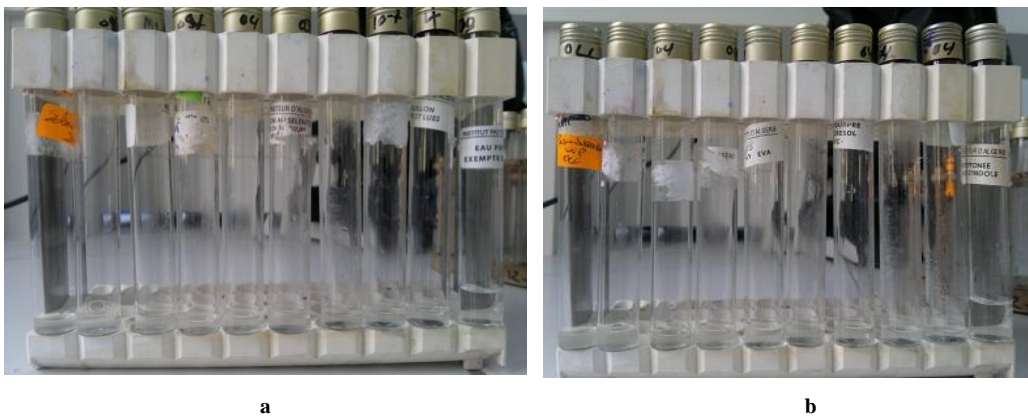
**Figure 56:** La CMI de l'extrait de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427.

**a :** méthode d'Adsorption-Désorption ; **b :** méthode de précipitation au sulfate d'ammonium



**Figure 57:** La CMI de l'extrait de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*.

**a :** méthode d'Adsorption-Désorption ; **b :** méthode de précipitation au sulfate d'ammonium

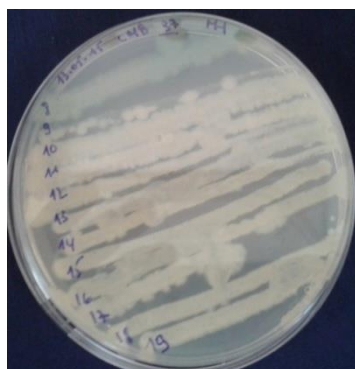


**Figure 58:** La CMI de l'extrait de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*.

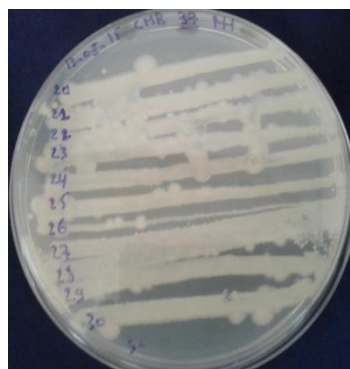
**a :** méthode d'Adsorption-Désorption ; **b :** méthode de précipitation au sulfate d'ammonium

### 13. Résultat du CMB

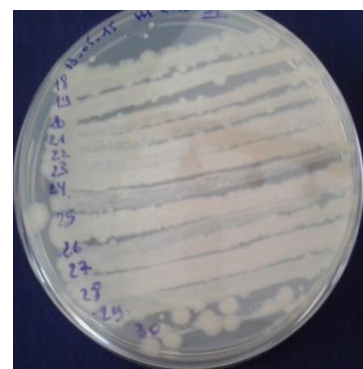
Le résultat que nous avons obtenu pour les souches *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 et *Lactococcus lactis* subsp *lactis* et *Leuconostoc* sp montre une inhibition totale de la souche pathogène (*Salmonella* sp) mais pour les autres dilutions (*Lactococcus lactis* subsp *cremoris*) on a noté que l'effet inhibiteur est nul alors que les dilutions (*Lactobacillus plantarum*) ont un effet d'inhibition faible (figure 59).



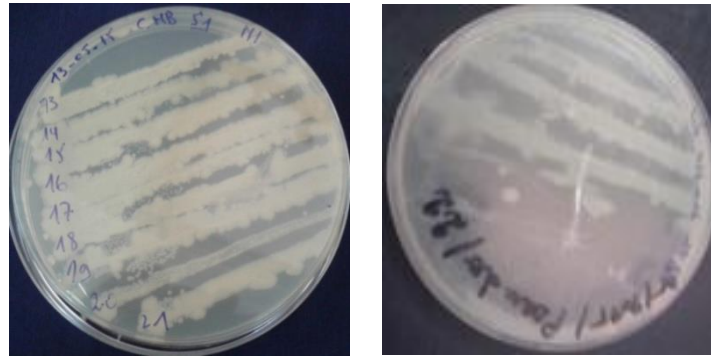
Extrait de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*



Extrait de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*



Extrait de *Lactobacillus plantarum*



Extrait de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427

Extrait de *Leuconostoc* sp

**Figure 59:** CMB des extraits lactiques trouvés par la précipitation au sulfate d'ammonium.

# **Chapitre VI**

## **Discussion**

### **1. Isolement et identification des souches utilisées**

Les laits algériens pourraient constituer une source intéressante d'isolement de bactéries lactiques pourvues de propriétés industrielles importantes et en plus possédant une biodiversité de l'information génétique.

Dans le cadre de ce travail, nous avons essayé d'apporter notre contribution à l'étude des bactéries lactiques isolées de lait cru de vache provenant d'une petite ferme située dans la région de Mostaganem (Hassi Mameche).

Quatre souches de bactéries lactiques ont été isolées du lait cru de vache. Elles ont été cultivées sur milieu MRS et M17. Du fait des exigences nutritionnelles des bactéries lactiques, les milieux de culture doivent être très riches en sucres, en matières azotées et surtout en facteurs de croissances (**Pilet *et al.*, 2005**). La présence de divers genres dans le lait de vache était prévisible car des bactéries lactiques ont été trouvées dans la microflore du lait étudié.

Selon les analyses microscopiques, les 4 souches sont Gram positive et catalase négative. Ces observations permettent de classer nos bactéries au groupe de bactéries lactiques (**Joffin et Leyral, 1996**).

Schillinger et Lucke (**1989**) ont été les premiers à proposer une clef d'identification des bactéries lactiques basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques et biochimiques typiques des différentes espèces. Néanmoins cette clef permettait uniquement d'orienter l'identification et non une identification précise.

L'identification du genre est d'abord orientée par la morphologie, puis par le type fermentaire (production de CO<sub>2</sub> à partir du glucose) et les conditions physiologiques de croissance (**Pilet *et al.*, 2005**). Les résultats de ces tests ont permis une pré-identification de plusieurs genres dont: 04 espèces réparties essentiellement sur: *Lactobacillus* sp, *Lactococcus* sp, *Leuconostoc* sp. Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus par Holt et al. (**1994**).

L'identification des souches au niveau de l'espèce a été établie par l'étude du profil fermentaire à l'aide des galeries biochimiques classiques. Les espèces de bactéries lactiques détectées dépendent essentiellement de la nature du lait cru et des conditions d'analyse (**Saidi *et al.*, 2002**). L'identification des souches a été réalisée en suivant les recommandations de Carr et al. (**2002**) ; Axelsson (**2004**) et Hammes et Hortel (**2006**).

Les résultats ont montrés que, parmi les cocci isolées, la majorité appartenait au genres *Enterococcus* sp et *Lactococcus* sp ; pour différencier les entérocoques, des lactocoques (qui est impossible sur milieu sélectif) nous nous sommes basés sur l'incapacité

des souches de *Lactococcus* de se développer à pH 9,6 et en présence de 6,5% de NaCl (**Wouters et al., 2002**).

Parmi les *Lactococcus*, deux sous-espèces sont principales: la sous espèce *lactis*, et la sous espèce *cremoris*, bien qu'elles montrent différentes caractéristiques, elles ont plusieurs attributs biochimiques en commun (**Pritchard et Coolbear, 1993 ; Desmazeaud et Cogan, 1996**). Des souches de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* ont été obtenus à partir des échantillons de lait cru algérien (**Saidi et al., 2002 ; Badis et al., 2003**), marocain, chinois, yougoslave et ukrainien (**Samaržija et al., 2001**). *Lactococcus lactis* sp est probablement l'espèce de bactéries lactiques la plus isolée à partir de produits laitiers (**Cogan et al., 1997**).

Selon l'aspect macroscopique, il a démontré que les lactocoques se développent sur le milieu M17 de petites colonies à contour régulier de couleur blanchâtre, lisses et légèrement bombées. Microscopiquement, ce sont des Gram positif, de forme cocci sphérique, associées en paires, groupées en chaînettes plus aux moins longues (**Teuber et Geis, 2006**). Selon les auteurs Teuber et Geis, (**2006**) ; Stiles et Holzapfel, (**1997**), les Lactocoques sont des bactéries homofermentaires, ne poussent pas à 45°C, et en présence de 6,5% NaCl. Cependant, au cours de cette étude, nous avons isolé des lactocoques (du groupe G6 et G7) qui ne pouvaient pas se développer dans le bouillon contenant 6,5% de NaCl et n'ont pas été capables d'hydrolyser l'arginine, donc les isolats appartiennent à l'espèce *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. Les isolats du groupe G4 et G5 ont été arginine positif, et ils ne pouvaient pas se développer dans le bouillon contenant 6,5% de NaCl, ce qui représente le groupe dominant des souches isolées : *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. Des résultats similaires ont été rapportés par Kacem et al. (**2003**) ; Zadi Karam et al. (**2006**).

Les bactéries lactiques hétérofermentaires fermentent le glucose avec production de gaz (CO<sub>2</sub>) (**Bourel et al., 2001**), de diacétyle à partir du citrate, avec des formes ovoïdes qui sont souvent disposées en longues chaînes (**Novel, 1993**) et qui sont incapables à hydrolyser l'arginine, ne produisent pas l'acétoïne, et développent à 37°C, représentent une croissance à 6,5% NaCl, la plupart des souches hydrolysent l'esculine (**Larpent et al., 1993 ; Larpent, 1997 ; Ogier et al., 2008 ; Bjokroth et Holzapfel, 2006**), appartiennent au genre *Leuconostoc* (G1-G3). Cette souche se développe sur milieu MRS solide et forme des petites colonies ponctiformes de couleur blanchâtre à pourtour régulier, de 1mm de diamètre (**Garvie, 1986**). La plupart d'entre eux produisent des exopolysaccharides à partir du saccharose. Les souches de *Leuconostoc* sont détectées souvent dans de nombreuses

variétés de fromages et produits laitiers fermentés (**Beukes et al., 2001 ; Randazzo et al., 2006**) bien qu'elles ont une faible activité acidifiante contribuent à la formation de l'arôme des produits laitiers en produisant du diacétyle, d'acétate et d'éthanol (**Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004**). Nos résultats sont semblables à ceux trouvés par Garvie (**1986**) et Wang et al. (**2010**) ayant prouvé que *Leuconostoc mesenteroides* est mésophile, croit dans un pH 6.8 et peut résister jusqu'à 6.5% de NaCl. Les leuconostocs sont des bactéries lactiques trouvées dans différents écosystèmes notamment les végétations vertes, les racines des plantes, le lait et les produits laitiers ainsi que le vin, elles se trouvent de même chez l'homme (sang, urée, vagin et lait maternel) (**Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004 ; Xiraphi et al., 2008**).

D'après l'observation macroscopique faite sur la souche de *Lactobacillus* développée sur milieu MRS (**Mann et Spoerry, 1974**), on a noté que les colonies sont irrégulières, érodées, de couleur crème et de 1 à 3mm de diamètre, et l'observation sous microscope après coloration de Gram, indique qu'il s'agit de bacilles apparents Gram positif (**Klein et al., 1998 ; Axelsson, 2004 ; Hammes et Hortel, 2006 ; Tabasco et al., 2009**). La souche de *Lactobacillus* fermente le glucose sans production de gaz (CO<sub>2</sub>), donc cette souche est homofermentaire (**Hammes et Hortel, 2006**). Le test de la dégradation des carbohydrates par la galerie classique a été étudié, cette souche fermente la majorité des sucres, elle ne fermente pas le xylose, l'inositol et dégrade légèrement le rhamnose. Elle est identifiée comme *Lactobacillus plantarum* (**Larpen, 1996a**). La faible proportion de ces espèces parmi nos isolats est probablement dûe au fait que les milieux utilisés ont été insuffisamment sélectifs. Des études menées sur 17 souches représentatives de bactéries lactiques de Jeotgal aliment fermenté Coréen ont montré que *Lactobacillus* sp n'est qu'un groupe mineur représenté par seulement 3 souches de la population totale (**Gyu et Hyung, 2006**).

Les anciennes études indiquent que l'espèce *Lb. plantarum* ne pousse pas à 45°C (**Axelsson, 2004 ; Hammes et Hortel, 2006**). Mais Carr et al. (**2002**) ne considère pas cette caractéristique comme clé d'identification dans son diagramme dichotomique, il exige seulement: la croissance à 15°C, ADH (-), Ribose (+), Raffinose (+) et mannitol (+).

On note une absence de genre *Pediococcus*, ce genre n'est souvent pas isolé à partir de produits laitiers, par contre il a été souvent isolé à partir de la bière, du vin, des produits végétaux (ensilages) et de saumures (anchois salé) (**Garvie, 1986**). Ces espèces microbiennes sont habituellement présentes dans les laits crus. Cette constatation appuie la théorie que, la flore microbienne des laits dépend de sa composition et à l'aridité de

l'environnement où vivent ces animaux et dépend aussi de sa composition qui varie d'un animal à un autre (**Tamime et Robinson, 1999**).

Aucun *Streptococcus thermophilus* n'a été isolé des laits examinés, ceci est probablement dû au fait que la méthode d'identification basée sur les caractéristiques morphologiques et physiologiques (**Cheriguene, 2008**).

Les produits laitiers représentent un patrimoine culturel pour la région où elles sont produites. La connaissance de la biodiversité microbienne des produits laitiers peuvent améliorer la compréhension des spécificités de ces produits.

## **2. La souche *Salmonella* sp**

L'identification de la souche pathogène commence d'abord par l'observation de l'aspect culturel des colonies sur les milieux sélectifs, et l'observation microscopique après coloration de Gram, puis le résultat des tests biochimiques.

Les colonies de *Salmonella* sp mesurent en général 1,5 à 3 mm après 24 heures à 37°C et apparaissent lors de l'isolement sous forme S. Ces caractéristiques ont été définies par Guiraud (**1998**) et par les travaux de Sutra et al. (**1998**) et Euzéby (**2006**). D'après l'observation microscopique notre souche est Gram négatif et sous forme bâtonnet, ces résultats concordent avec ceux trouvés par Euzéby (**2000**) et Sutra et al. (**1998**).

Notre bactérie *Salmonella* sp produit du gaz H<sub>2</sub>S, elle est marquée par une coloration noire de la gélose Hajna Kligler issue de sa combinaison avec les ions ferriques. Production de gaz, dans le processus fermentaire du glucose, la décarboxylation du pyruvate est à l'origine d'un dégagement de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dont la pression dans le tube décolle la gélose; la souche est ainsi dite gaz (+). Ce milieu a une couleur rouge carmin contient 2 sucres Glucose et lactose en concentrations différentes. Le lactose ne peut être utilisé qu'après la consommation totale du glucose (qui réprime l'expression de la β-galactosidase).

Le milieu urée-indole ou milieu urée-tryptophane, est un milieu orange, constitué d'urée et de tryptophane. Il permet de rechercher des activités enzymatiques du métabolisme protéique, à savoir l'uréase, la tryptophanase. L'uréase : cette enzyme hydrolyse l'urée pour donner du carbonate et de l'ammoniac responsables de l'alcalinisation du milieu qui vire au rose. La couleur jaune demeure pour les souches qui ne possèdent pas d'uréase active (uréase-). Ce milieu permet de distinguer le genre *Salmonella* du genre *Proteus*. Après addition du réactif de Kovacs, le diméthyl-amino-4-benzaldehyde qu'il contient réagit avec l'indole et forme un composé coloré en rouge (anneau rouge). Les

souches incapables de provoquer une telle réaction parce que dépourvues de tryptophanase seront dites indole (-).

La dégradation du tryptophane est marquée par l'apparition d'un anneau jaune. En effet la bactérie fermente le glucose dans un premier temps, ce qui acidifie le milieu (virage du violet au jaune). Dans un second temps, la salmonelle qui possède une décarboxylase se met en action ; et les métabolites formés à partir des aminoacides alcalisent le milieu, qui fait virer l'indicateur de pH au violet (formation de la cadavérine à partir de la lysine).

Notre bactérie est non productrice d'uréase, la couleur du milieu reste inchangé (rouge). Elle est Indole (-), la couleur est restée jaune, absence d'un anneau rouge ce qui signifie qu'elles ne produisent pas d'indole

Une identification par API 20<sup>E</sup> nous permettons de classer notre bactérie à la famille des entérobactéries, ce qui a été constaté par Bourgeois et al. (1996) et Sutra et al. (1998) ; et elle est une bactérie *Salmonella choleraesuis* subsp *orizonae*.

### **3. La résistance des bactéries lactiques aux conditions digestives**

L'effet du pH sur la croissance microbienne agit sur trois niveaux: l'activité enzymatique de la membrane, la perméabilité et la biodisponibilité de certains nutriments qui dépend de l'équilibre ionique.

Nos résultats ont été similaires aux études qui ont été faites sur l'activité probiotique des lactocoques, qui ont supposé que les lactocoques ne survivent pas lors du passage à travers l'appareil digestif, cela est dû au pH faible de l'estomac et à la présence de sels biliaires dans l'intestin (Kimoto-Nira *et al.*, 2009). D'autre part, et comme la bile est un détergent, la résistance aux sels biliaires semble être associée à la stabilité de la membrane cellulaire. Des résultats de Burns et al. (2008) ont montré que les souches de *Lactococcus lactis* sont sensibles aux sels biliaires.

L'adhésion aux cellules épithéliales humaines est un test important suggéré pour l'évaluation du pouvoir probiotique des souches lactiques (Schillinger *et al.*, 2005 ; Guglielmotti *et al.*, 2007). Cette colonisation est nécessaire pour exercer leurs effets bénéfiques par l'inhibition des bactéries indésirables et la stimulation du système immunitaire. Les probiotiques pourraient agir en limitant l'implantation des germes pathogènes par compétition au niveau des sites de fixations pour la colonisation (Robin et Rouchy, 2001). Wang et al. (2007) ont prétendu que les conclusions tirées des résultats des études *in vitro* ne puissent pas être directement appliquées aux situations *in vivo*. Ils ont été

montrés qu'il existe une relation entre la capacité d'adhérence et la colonisation provisoire de l'intestin humain.

L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est une propriété physico-chimique qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules hôtes. Ainsi, elle semble être un facteur aidant à l'adhérence, mais elle ne contribue pas à une bonne adhésion (**Roos et Jonsson, 2002 ; Guglielmottia et al., 2007**). Nos résultats sont en accord avec ceux de Ly-Chatain et al. (**2010**) qui ont trouvé une hydrophobicité de 40% pour des souches de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* et même sont similaires aux travaux de Hadeif (**2012**) qui a trouvé de 41% pour *Lactococcus lactis* subsp *lactis* et 43% pour *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*.

Les souches ont une résistance contre certains groupes des antibiotiques comme le Chloramphénicol et la Pénicilline. Ce critère d'antibio-résistance est utilisé comme marqueur de sélection. Cette résistance aux antibiotiques peut être à l'origine de problèmes si elle peut être transmise à des pathogènes chez lesquels la résistance thérapeutique pourrait avoir des conséquences néfastes. L'utilisation de différentes souches lactiques en tant que probiotiques doit faire l'objet de travaux extrêmement attentifs (**Marteau et al., 2004**). De même l'autorité Européenne de Sécurité Alimentaire, suggère que les probiotiques ne doivent pas avoir une résistance acquise aux antibiotiques (**Zago et al., 2011**).

#### **4. Test *in vivo***

Les souches lactiques administrées sont capables de modifier quantitativement la microflore intestinale chez le jeune animal au cours de sevrage et ceci est dû vraisemblablement à la capacité de survie dans des conditions acides.

D'après les résultats obtenus, nous avons noté des modifications dans le nombre de germes de flore lactique, le taux de ces germes a augmenté par rapport au jour 0. Cette observation va dans le même sens de l'idée établie qu'un apport exogène des microorganismes modifie la composition de la flore intestinale. Les résultats indiquent clairement que les souches lactiques testées s'implantent à haut niveau dans les différents organes du tube digestif, et il a été conclu que la rapidité de cette implantation est un critère de sélection de ces souches.

L'étude bactériologique des crottes, reflétant la composition de la flore intestinale et montrant une modification par rapport au témoin non inoculé, permet aussi d'apprécier la colonisation.

Il y a une trentaine d'années, il a été montré que des bactéries de la flore indigène, telles que les *Lactococcus*, étaient fortement attachées à l'estomac des souris mais d'après les résultats obtenus nos souches utilisées sont moins abondantes par rapport à la dose initiale administrée. Une grande quantité de ces bactéries ingérées y est détruite, ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Esther (2009).

La population bactérienne augmente en revanche dans les portions plus éloignées de l'intestin grêle qui est l'endroit le plus important pour la digestion et l'absorption et aussi pour l'activité des BAL ; la sécrétion pancréatique électrolytique est riche en bicarbonates, elle permet de tamponner l'acidité provenant de l'estomac et ainsi d'obtenir un pH optimal. C'est vraisemblablement pour cette raison que nos souches sont présentes (Esther, 2009).

L'étude de la survie des bactéries lactiques dans le tractus gastro-intestinal est importante pour une meilleure connaissance du devenir de ces bactéries ingérées avec l'aliment et une meilleure compréhension de l'action des BAL chez l'homme et l'animal, par ce que tous les effets des BAL seraient influencés par leur survie et gardent une certaine viabilité lors du transit intestinal. Ainsi ils doivent pouvoir passer sans dommage irréversible la barrière acide de l'estomac, puis l'effet inhibiteur éventuel des sels biliaires. Cette capacité de survie est très variable selon, genres, espèces et souches microbiennes et peut aussi être influencée par des facteurs autres, comme la dose ingérée, les caractéristiques spécifiques de l'hôte (Afssa, 2005 ; Gibson *et al.*, 2005) c'est pour cette raison qu'on a effectué un dénombrement de nos souches probiotiques utilisées pendant toute la durée de l'expérience et sur milieu sélectif (M17/MRS + antibiotique) pour confirmer qu'elles sont vivantes dans les tubes digestifs et aussi qu'elles doivent s'implanter *in vivo* dans les tubes digestifs ou bien qu'elles doivent seulement survivre durant le transit.

Le taux le plus élevé d'implantation de nos souches lactiques utilisées signifie l'action protectrice développée contre *Salmonella* sp et la colonisation du tube digestif par ces souches permet aux souris de diminuer le nombre de la souche pathogène et de modifier le cours de l'infection.

L'étude des modèles animaux a apporté la preuve que certaines bactéries lactiques pouvaient inhiber la croissance de bactéries pathogènes telles *Salmonella* sp (Silva *et al.*, 1999 ; Hudault *et al.*, 1997).

En effet, les résultats obtenus indiquent une diminution en nombre de la bactérie pathogène dans les crottes et au niveau des organes avec leurs contenus. La répression du développement de ce germe pathogène peut se faire de plusieurs façons et selon le nombre

et le type de bactéries lactiques par des mécanismes tels que certaines activités microbiennes spécifiques (production de certaines enzymes ou facteurs de croissance), des interactions microbiennes (production de composants antimicrobiens comme le peroxyde d'hydrogène, des acides organiques faibles (Lievin *et al.*, 2002) et des peptides antibactériens), des interactions avec l'épithélium intestinal (concurrence pour les récepteurs situés sur l'épithélium intestinal) et des interactions avec le système immunitaire (De Vuyst, 2004), par la sécrétion directe de bactériocines (Cotter *et al.*, 2005), la production de protéases (Castagliuolo *et al.*, 1999) dirigées contre les toxines bactériennes.

### **5. L'activité antibactérienne des souches utilisées**

Ce test a permis de recenser des souches possédant l'activité antibactérienne intéressante, pour réaliser tous ces tests, nous avons utilisé la méthode de diffusion en puits décrite par Tagg et Mc Given (1971). Un total de 5 souches bactériennes lactiques avec des effets antagoniques sur *Salmonella* sp a été détecté. Notre résultat est en accord avec ceux de Carr et al. (2002). Les travaux réalisés par Nahaïsi (1986), montrent que les ferments lactiques ont la capacité d'inhiber, *in vitro* l'action des germes pathogènes Gram positif ou négatif. Les chercheurs Van Niel et al. (2002) ont mis en évidence, *in vitro*, un puissant pouvoir bactéricide du yaourt contre *Salmonella*. Les travaux de De Vuyst et al. (2004) ont montrés que quelques bactéries lactiques peuvent détruire *Salmonella* et elles génèrent des substances antimicrobiennes qui contribuent à l'élimination de cette bactérie pathogène.

Selon Piard et Desmazeaud (1992) et Casla et al. (1996), les bactéries à pouvoir antibactérien peuvent avoir trois types d'effets : un effet bactériostatique qui se manifeste par un ralentissement ou arrêt de la croissance, ou bien un effet bactéricide qui se traduit par une perte de la viabilité avec une lyse cellulaire, ou alors un effet bactéricide sans lyse cellulaire.

Les souches ayant une activité inhibitrice la plus importante que nous avons rencontrées sont *Leuconostoc* sp (15mm), *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* (de 10 à 13mm), ne présentent pas le même spectre d'action.

Pour les deux souches de lactococcus ; la différence de l'activité inhibitrice se trouvant entre les souches d'une même espèce peut être due à une faible homologie de leurs acides nucléiques responsables des caractères héréditaires (Sutra *et al.*, 1998). Cette variation de l'effet inhibiteur des espèces de *Lactococcus* sp sur *Salmonella* sp a été remarquée par les travaux de Rodriguez et al. (2003). Cogan (1972) à proposer qu'une

bonne souche de *Lactococcus* devrait réduire le pH du lait au-dessous de 5,3 après 6 heures d'incubation à 30°C, selon ce critère notre souche de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* isolée de lait cru de vache est une bonne souche pour la prévention où la réduction de la croissance des germes indésirables. Les résultats auxquels nous sommes parvenus vont dans le même sens que ceux trouvés par Vinod Kumar et al. (2006) qui ont isolé du radis, une souche de *Lactococcus lactis* qui possède une activité antimicrobienne contre plusieurs espèces Gram négatif.

L'inhibition de *Salmonella* sp par la souche *Leuconostoc* sp est due à la production de substances antibactérienne. Des résultats semblables ont été rapportés par Noonpakdee et al. (2003). La production de bactériocines par le genre *Leuconostoc* sp est affirmé (Orberg et Sandine, 1984 ; Xiraphi et al., 2008 ; Trias et al., 2008).

L'effet inhibiteur des lactobacilles (Barefoot et Klaenhammer, 1984 ; Saidi et al., 2011) peut avoir deux origines : la première est la production d'acides organiques; en effet, les lactobacilles sont connus pour une grande résistance aux pH acides (jusqu'à un pH voisin de 3,5) contrairement aux autres genres de bactéries lactiques qui sont plus sensibles (Adams et al., 1988 ; Wong et Chen, 1988 ; Benthin et Villadsen, 1995 ; Podolak et al., 1996 ; Wilson et al., 2005). La deuxième est que les lactobacilles produisent une autre substance inhibitrice (type bactériocine) active sur de nombreuses espèces (Larsen et al., 1993 ; Anderssen et al., 1998 ; Oyetayo et al., 2003 ; Avila et al., 2005). De même, les résultats trouvés par Mamèche-Doumandji (2008), montrent que la souche lactique, *Lactobacillus acidophilus* 11 inhibe quelques espèces pathogènes Gram négatif telles que, *E. coli* et *Salmonella thyphimurium*. Lima et al. (2007) ont constaté que les souches identifiées comme étant *Lactobacillus reuteri*, *L. salivarius* ou *Lactobacillus* spp. ont inhibé *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* spp.

La présence des zones d'inhibitions en cas d'utilisation d'une culture lactique entière peut être due au métabolisme du lactose en acide lactique qui abaisse le pH et crée un environnement défavorable au développement des bactéries pathogènes (Fleming et al., 1975 ; Barefoot et Klaenhammer, 1983 ; Tabak et al., 2007), au peroxyde d'hydrogène (Barefoot et Klaenhammer, 1984) ou aux bactériocines (Klaenhammer, 1993 ; Vinod Kumar et al., 2006). Ceci suggère que les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques fonctionnelles permettent de réduire le nombre d'autres micro-organismes indésirables dans les produits laitiers ainsi d'effectuer un rôle essentiel dans la préservation de produits destinés à la consommation humaine (Joffraud et al., 2006).

L'activité inhibitrice a été détectée dans le milieu solide par la méthode de puits. A partir de cette observation, on peut dire que la production de l'agent inhibiteur est activée lorsque les souches productrices cibles entrent en contact. L'utilisation de filtrats concentrés est donc nécessaire pour la suite de l'étude.

Dans le cas d'utilisation des filtrats de culture, la présence d'une activité antibactérienne observée pour les cinq souches lactiques utilisées peut s'expliquer par la présence d'un agent inhibiteur dans les filtrats. Cette activité antimicrobienne était plus faible dans les extraits cellulaires (culots). Par contre, la fraction extracellulaire correspondant au surnageant présente un fort pouvoir antibactérien. La présence de l'effet inhibiteur dans le surnageant suggère que la substance inhibitrice se trouve exclusivement dans le milieu de culture, donc c'est une substance extracellulaire. Des résultats similaires ont été trouvés par Ammor et al. (2006). Ce résultat concorde avec les travaux réalisés par Labioui et al. (2005) ; Elmoualdi et al. (2006).

Plusieurs études actuelles montrent que les fractions bactériennes cellulaires n'ont aucun effet sur la croissance des souches cibles, par contre la fraction extracellulaire contient des substances responsables de cette interaction (Achemchem et Abrini, 1997 ; Labioui et al., 2005). Les mêmes constatations ont été faites par Labioui et al. (2005), qui ont montré que la substance inhibitrice des souches lactiques testées (*Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*) se trouve dans le surnageant.

L'activité antibactérienne des souches lactiques peut être due à la production de plusieurs agents antibactériens. L'acide lactique et l'acidification du milieu inhibent plusieurs types de bactéries. Aussi, ces souches produisent aussi le diacétyle, qui possède aussi un pouvoir d'inhibition. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, libéré par les souches lactiques inhibe les bactéries qui ne possèdent pas des défenses contre le stress oxydatif (la catalase, par exemple) (Ouwehand et Vesterlund, 2004).

## **6. Caractérisation de l'agent inhibiteur**

L'activité bactéricide de nos souches se retrouve exclusivement dans le milieu de culture. On a donc formation de substances extracellulaires (Limonet et al., 2004a et b). Ces dernières sont différentes des acides organiques et du peroxyde d'oxygène. En effet, la neutralisation du surnageant n'entraîne pas de réduction du diamètre d'inhibition. La suppression de l'effet de l'acide lactique et du peroxyde d'oxygène favoriserait plutôt l'activité des substances antibactériennes.

A la lumière des résultats trouvés, nous pouvons conclure que les substances antibactériennes produites par les différentes espèces lactiques sont probablement des bactériocines et exercent un effet fortement inhibiteur de la croissance de la bactérie *Salmonella* sp.

Les bactériocines agissent en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des dérèglements des fonctions cellulaires (**Biswas et al., 1991**).

## **7. Caractérisation chimique de l'agent inhibiteur**

Certaines propriétés chimiques des extraits lactiques permettent de donner une idée sur leur classification. Il s'agit plus particulièrement de la thermorésistance (**Dortu et Thonart, 2009**) et l'acidité ou la basicité.

Les barrières physiologiques qui peuvent influencer l'action des bactériocines sont représentées principalement par le pH et les enzymes digestives protéolytiques. Afin d'étudier l'action de ces dernières sur l'activité des bactériocines dans le tube digestif, nous avons testé les cinq souches qui ont donné des zones d'inhibitions dans tous les cas.

Il faut aussi garder en tête que la production de bactériocines peut-être affectée par une série de facteurs. Parmi ceux-ci on peut citer la composition du milieu de culture, y compris le carbone, l'azote et les sources de phosphates et des agents inhibiteurs, le pH optimal, l'aération et la température de croissance (**Daba et al., 1993**).

## **8. Effet de la température**

Pour un traitement à 100°C pendant 75 min, la souche *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427 a une zone d'inhibition importante, ce qui conduit que la ou les molécules inhibitrices sont thermostables. Ces spécifications font penser qu'on a affaire à des bactériocines thermorésistantes qui sont de la classe I ou II (**Dortu et Thonart, 2009 ; Parente et al., 1996**). L'extrait des quatre souches restantes : *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc* sp a perdu son activité antibactérienne après le traitement thermique, en effet, la substance inhibitrice probablement est une bactériocine thermosensible appartenant à la classe III (**Dortu et Thonart, 2009**).

Selon Klaenhammer (**1994**), Parente et al. (**1994**), les bactériocines présentent une sensibilité aux traitements thermiques qui varient en fonction de leur poids moléculaire et de leur structure. Ainsi, les bactériocines de faible poids moléculaire sont généralement thermorésistantes, tel est le cas de la nisine, de la lactostrepsine, de la lacticine, à l'exception

de la diplococcine qui est inactive à 100°C (**Piard et Desmazeaud, 1992**) alors que celles qui sont de haut poids moléculaire sont thermolabiles ; la bactériocine issue d'un streptocoque lactique mésophile est sensible à un chauffage de 100°C et 121°C pendant 15 minutes (**Gomez et al., 2007**).

Nos résultats vont dans le même sens que ceux trouvés par Mamèche-Doumandji (**2008**), ayant démontré que la substance inhibitrice produite par la bactérie lactique *Lactobacillus acidophilus* 11 reste stable pendant 30 minutes à des températures de 70°C jusqu'à 90°C. Un résultat similaire a été obtenu par Amrouche (**2005**), montrant que l'activité antagoniste d'une souche de *Lc. lactis* décroît rapidement après un traitement de 100°C pendant 30 minutes. Une étude réalisée par Davey et Richardson (**1981**), montre que la diplococcine produite par *Lc. lactis* se montre beaucoup plus sensible à la chaleur, perdant jusqu'à 75 % de son activité après une minute à 100°C. La Lactococcine 972 produite par la souche *Lc. lactis* ssp *lactis* est sensible à un traitement de 15 minutes à 50°C.

Il ne s'agirait donc pas d'un lantibiotique, puisque ces derniers résistent mieux à la chaleur, comme la diplococcine, qui est toujours active suite à un traitement d'une heure à 100°C (**Davey et Richardson, 1981**). D'autres y sont moins résistantes, comme la lactococcine 972, dont l'activité est sensible à un traitement de 15 minutes à 50°C (**Martinez et al., 1995 et 1996**).

Il ne s'agirait donc pas d'un lantibiotique, puisque ces derniers résistent à un traitement de 121°C. Certaines bactériocines ne faisant pas partie des lantibiotiques résistent mieux à la chaleur, comme la diplococcine, qui est toujours active suite à un traitement d'une heure à 100°C (**Davey et Richardson, 1981**). D'autres y sont moins résistantes, comme la lactococcine 972 dont l'activité est sensible à un traitement de 15 minutes à 50°C (**Martinez et al., 1996**).

## **9. Effet des enzymes protéolytiques**

Les tests supplémentaires à savoir l'effet des enzymes protéolytiques, confirment la nature protéique de la substance inhibitrice (**Tagg et al., 1976**). Il est bien établi à présent que toutes les bactériocines sont de nature protéique, ou du moins contiennent un peptide qui est responsable de leur fonction bactéricide (**Coventry et al., 1996a et 1996b ; Lima et al., 2002 ; Savadogo et al., 2006**), elles doivent être sensibles au moins à une enzyme. En conséquence, la sensibilité aux enzymes protéolytiques est le critère principal dans leur caractérisation (**El Shafei et al., 2000 ; Cintas et al., 2001**).

D'après nos résultats la sensibilité des surnageants aux enzymes protéolytiques est variable, le halo d'inhibition disparaît. L'activité antimicrobienne est entièrement détruite sous l'action des enzymes protéolytiques, ceci suggère que la partie biologiquement active de la substance inhibitrice est de nature protéique ou contiendrait des groupements protéiques, les réponses obtenues après l'action des enzymes protéolytiques (trypsine et pepsine) nous permettra d'identifier les substances antibactériennes comme étant des bactériocines (**Callewaert et de Vuyst, 2000 ; Aslim et al., 2005**).

Chaque surnageant perd son activité antibactérienne après le traitement avec l'enzyme pepsine et trypsine. La lactococcine est inactivée par l' $\alpha$ -chymotrypsine, la ficine, la pronase et la protéinase K; par contre l' $\alpha$ -amylase et la trypsine n'affectent pas son activité (**Piard et al., 1993 ; Rincé et al., 1994**). La nisine est inactivée par l' $\alpha$ -chymotrypsine, la pancréatine et la subtilopeptidase alors qu'elle n'est pas inactivée par la pepsine, trypsine et la carboxypeptidase (**Steen et al., 1991**). Les travaux de Kojic et al. (**1991**) montrent que la bactériocine 550 produite par *Lc. lactis* ssp *lactis* 550, est sensible à la pepsine, trypsine,  $\alpha$ -chymotrypsine, pronase E et la protéinase K. La diplococcine est sensible à l' $\alpha$ -chymotrypsine, la pronase et la trypsine mais elle résiste à l'action de la pepsine (**Davey et Richardson, 1981 ; Cocolin et al., 2007 ; Oyetayo et al., 2003 ; Avila et al., 2005 ; Mami et al., 2008 ; Achemchem, 2004**).

Gomez et al. (**2007**), trouvent que la bactériocine-like est sensible à l'action de la plupart des enzymes testées (protéases,  $\alpha$ -chymotrypsine, trypsine, pronase E, papaine). Seulement 40% de son activité a été récupérée après traitement à la pepsine. Nos résultats sont en accord avec les travaux réalisés sur les espèces de *Lactobacillus* (**Alexandre et al., 2002 ; Deegan et al., 2006 ; Piard et Desmazeand, 1991 ; Ouwehand et Vesterlund, 2004**).

Nos résultats confirment les résultats d'Achemchem et Abrini (**1997**) qui ont trouvé, que sur 100 isolats de bactéries lactiques, 31 ont une activité inhibitrice sensible au moins à l'une des trois enzymes digestives (trypsine, chymotrypsine et pepsine A). A partir de cette étude, nous pouvons conclure que les substances responsables de l'interaction sont des bactériocines.

Cependant, plusieurs facteurs peuvent avoir un effet sur l'activité antimicrobienne comprenant l'interaction entre la bactériocine et les constituants des cellules ou du milieu de croissance, de la pureté et de la concentration de l'enzyme et de la technique employée pour déterminer la sensibilité enzymatique (**Nes et al., 1996**).

Trois critères sont indispensables pour qu'une substance antibactérienne soit définie en tant que bactériocine (**Klaenhammer, 1988**).

1. La présence d'une partie biologiquement active de nature protéique ;
2. Un spectre d'activité limité aux espèces taxonomiquement proches, ou occupant la même niche écologique ;
3. Un mode d'action bactéricide.

## **10. Effet du pH et sels biliaires**

Une des caractéristiques importantes d'une substance inhibitrice sécrétée par les probiotiques est sa capacité de survivre dans des conditions difficiles d'acidité simulant celles du jus gastrique ; ce dernier pouvant varier entre pH 1 après un jeûne et pH 4.5 à la suite d'un repas (**Maragkoudakis et al., 2006**).

La survie de ces extraits aux conditions drastiques du tube digestif représente, par conséquent, un premier objectif de cette utilisation de ces substances pour tuer les germes pathogènes.

L'étude a révélé que la molécule antibactérienne n'est pas altérée par la variation de pH allant de : 2,5 à 4,3 et 6,5.

La diminution de la croissance de *Salmonella* sp à pH 2,5 est due à la sensibilité de souche à la concentration élevée en sels biliaires (0,3%) ou due à l'effet de l'acidité du milieu. A pH 2,5 la bactérie pathogène montre une sensibilité marquée au surnageant de la souche *Lactobacillus plantarum*, le surnageant des espèces de lactobacilles sont connus pour leur grande résistance aux pH acides (**Wilson et al., 2005 ; Wong et Chen, 1988 ; Podolak et al., 1996 ; Benthin et Villadsen, 1995**). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Bradly (**1992**) qui ont trouvé que seulement 0,01 % d'inoculum de *Salmonella* sp exposée à l'effet des extraits lactiques acidifié à pH 1, survivent. A ce titre, les travaux de Barefoot et Klaenhammer (**1984**), révèlent que le fonctionnement de bactériocines est fortement dépendant du pH initial, du milieu de production; ceci suggère que le pH du milieu facilite à la fois la sécrétion et la solubilité de la bactériocine dans le milieu de production.

Les substances anti-microbiennes produites par les cinq souches bactériennes sélectionnées répondent aux critères retenus par Klaenhammer (**1988**) et Tagg et al. (**1976**), et peuvent donc être considérées comme des bactériocines.

En effet, l'étude entreprise par Yang et al. (**1992**), a montré que la production de bactériocine par les bactéries lactiques est fortement dépendante: des souches, de la

composition du milieu de culture, du pH final du milieu, du temps d'incubation, de la température optimale de croissance et surtout elle nécessite l'utilisation des milieux simples et économiques.

La sensibilité de *Salmonella* sp aux variations du pH des extraits lactiques est due à leur matériel génétique et à leur incapacité à produire une réponse adaptative au stress acide comme le montre Kim et Dunn, (1999) ; Even et al. (2002).

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion des repas gras. Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité (Ammor et Mayo, 2007 ; Gu et al., 2008).

### **11. La cinétique de croissance des souches en culture pure**

A partir de l'analyse des cinétiques de croissance, il est intéressant de relever que les six souches utilisées présentent le même profil cinétique au début de la phase de latence, et elles atteignent respectivement leur phase exponentielle au bout de 6 heures d'incubation avec des densités optiques variables selon l'espèce.

De l'analyse de l'ensemble de représentations graphiques de cultures pures de *Salmonella* sp, on note que l'espèce bactérienne cultivée en culture pure sur le bouillon nutritif, traduit fidèlement une courbe typique de croissance bactérienne avec ces trois 03 phases, exponentielle, stationnaire et de déclin.

Une légère diminution des souches utilisées est observée après 72 heures d'incubation, cela peut être dû à l'épuisement des éléments nutritifs du bouillon de culture.

### **12. Extraction de la substance inhibitrice**

Certaines substances inhibitrices ont été caractérisées comme étant des protéines antimicrobiennes et appelées bactériocines. Les bactéries lactiques sont connues pour leur aptitude à produire des composés antibactériens leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. Parmi les substances synthétisées, des peptides, dénommés bactériocines qui sont produits puis exportés à l'extérieur des cellules productrices.

Ces bactériocines font l'objet depuis une dizaine d'années d'un nombre croissant d'études, ainsi qu'en témoigne l'abondante littérature scientifique s'y rapportant (Jack et al.,

**1995**). En arrière-plan de ces nombreux travaux figurent divers applications potentielles dans les produits laitiers, carnés et marins.

On peut considérer que la majorité de bactériocines décrites à ce jour correspond à des bactériocines de bactéries lactiques (**Worobo *et al.*, 1994 ; Quadri *et al.*, 1994**).

Nos cinq souches lactiques pures ont donné un effet inhibiteur vis-à-vis de *Salmonella* sp sur milieu solide, par la suite, nous avons recherché l'effet inhibiteur des souches productrices dans leurs surnageant de culture, ceci est réalisé par la méthode de diffusion à partir des puits. Nous avons remarqué que cette activité inhibitrice est présente dans le surnageant. Les mêmes résultats ont été signalés par Holo *et al.* (**1991**) ayant purifiés la Lactococcin A, isolée à partir de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. Sherwitz *et al.* (**1986**) ont montrés qu'on peut s'assurer qu'il s'agit bien d'une bactériocine si on observe la disparition des zones d'inhibition après action d'une enzyme protéolytique, donc elles devraient être sensibles à l'action de ces enzymes (**Upreti et Hinsdill, 1973 ; Barefoot et Klaenhammer, 1983 ; Mehta *et al.*, 1984 ; Klaenhammer, 1993**).

La purification des bactériocines produites par les bactéries lactiques montre certaines difficultés dues : à la concentration élevée en protéines dans l'extrait acellulaire, à la tendance de certaines bactériocines à s'associer avec d'autres molécules et à la nature hydrophobe de ces bactériocines (**Van-Laak *et al.*, 1992**).

La technique d'adsorption-désorption décrite par Yang *et al.* (**1992**) peut servir d'alternative pour la purification de ces bactériocines, cette méthode semble être plus économique, plus rapide et reproductible (**Piard *et al.*, 1992**).

Selon Yang *et al.* (**1992 et 1994**), la production des substances inhibitrices est fondée sur le principe d'adsorption et de désorption de ces dernières sur la cellule bactériocinogène. Les stratégies de purification des bactériocines se rapportaient exclusivement à la fraction sécrétée dans le milieu de culture par les souches productrices et ne tenaient pas compte de la partie adsorbée à la surface des cellules. La fraction adsorbée représente environ 80% de la totalité de la bactériocine produite (**Daba *et al.*, 1994**). La propriété d'adsorption et de désorption des bactériocines sur les cellules en fonction du pH a permis d'améliorer les procédés d'extraction et a abouti à des rendements plus élevés en bactériocines (**Yang *et al.*, 1992**). En effet, l'ajustement du pH à 6 (adsorption maximale de la bactériocine) permet une séparation facile des molécules à partir du milieu de culture par centrifugation et récupération des cellules. Ensuite la bactériocine peut être désorbée des cellules en diminuant le pH entre 1,5 à 2 (**Yang *et al.*, 1992**). Cette méthode semble produire des peptides d'une façon plus concentrée avec des

niveaux élevés de production. D'autre part, Bower et Daeschel (1989) ont rapporté que les interactions électrostatiques assurent l'adsorption aux surfaces hydrophiles alors que la désorption est influencée par l'ajout du Tween 80.

La précipitation au sulfate d'ammonium permet de concentrer des protéines à un volume réduit. Pour déterminer à quel moment la bactériocine précipite, une première précipitation fractionnaire est effectuée. Ceci consiste à précipiter les protéines en sel à 60%. Premièrement, le surnageant de culture est refroidi à 0°C sous agitation dans un bain de glace. Le sel y est ajouté délicatement afin de laisser le temps aux protéines de précipiter et d'éviter la présence de sel non dissout. La solution ainsi récoltée est centrifugée à 6000tr/min pendant 30 minutes. Le surnageant est ensuite remis sous agitation à 0°C pour continuer la précipitation. Le culot de chaque fraction est récupéré dans le plus petit volume possible de tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8.8.

La filtration sur membrane consiste en une approche alternative à la précipitation au sulfate d'ammonium et à l'adsorption-désorption. Cette filtration se fait à l'aide d'une membrane de filtration possédant un seuil de passage moléculaire déterminé de 3kDa. Ces fractions sont dialysées 18 heures contre l'eau distillée et la présence d'activité est déterminée par la méthode de puits. Pourtant, suite à la filtration de surnageant sur une membrane de 3kDa, aucune activité n'est retrouvée dans le filtrat. La présence d'activité dans le rétentat vient donc supporter l'hypothèse d'agrégation ou de l'adsorption sur les membranes à filtration.

L'étape de dialyse augmente l'activité spécifique parce que les peptides possédant une taille inférieure à 3,500 Da sont éliminés de la fraction contenant la bactériocine. La nisine ayant un poids moléculaire de 3353Da. Les lantibiotiques dont le poids moléculaire est connu sont tous plus petits que 3500Da. Pour les non lantibiotiques, plusieurs bactériocines comme la diplococcine, les lactococcines A et G, ainsi que la lactococcine 972 possèdent des poids moléculaires se situant entre 3500 Da et 14000Da.

### **13. Effet antibactérien des extraits**

La bactérie pathogène *Salmonella* sp est généralement plus sensible à l'effet bactéricide des extraits lactiques trouvés par les deux méthodes d'extraction. Les bactériocines agissent en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des dérèglements des fonctions cellulaires (Biswas *et al.*, 1991 ; Onda *et al.*, 2003).

D'après Van Belkum *et al.* (1992), la lacticine produite par *Lc. lactis* est active

contre *Escherichia* et *Salmonella*. Les travaux réalisés par Ryan et al. (1996) et Dougherty et al. (1998) montrent que la lacticine 3147 est une bactériocine produite par *Lc. lactis* DPC 3147, possède un large spectre d'inhibition, elle est active contre certaines bactéries des genres suivants: *Escherichia*, *Acetobacter*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Listeria*. D'autre part, la diplococcine produite par plusieurs souches de *Lc. lactis* subsp *cremoris* possède un spectre d'inhibition qui se limite à des bactéries de l'espèce *Lc. lactis* subsp *cremoris* (Davey et Richardson, 1981).

La production de bactériocine par les bactéries lactiques est fortement dépendante des souches, de la composition du milieu de culture, du pH final du milieu, du temps d'incubation, de la température optimale de croissance et surtout elle nécessite l'utilisation des milieux simples et économiques. Ces résultats indiquent un mode bactéricide de l'action du composé antibactérien. Des résultats similaires ont été observés par Ammor et al. (2006) ; Gessas (2006).

#### **14. La cinétique de croissance de *Salmonella* sp en culture mixte**

Les bactériocines des bactéries Gram<sup>-</sup> et Gram<sup>+</sup>, représentent un groupe hétérogène de substances antibactériennes dont le poids moléculaire, les propriétés biochimiques, le spectre d'activité et le mode d'action peuvent être très différents (Riley et Wertz, 2002 ; Aslim et al., 2005 ; Deegan et al., 2006).

##### **14.1. En présence de l'extrait lactique obtenu par la méthode d'adsorption-désorption**

L'effet inhibiteur s'est exprimé juste après l'inoculation à t=1 heure, ceci suggère l'implication d'un probable mécanisme d'antagonisme bactérien.

L'activité des bactériocines ne se manifeste qu'à des pH supérieurs à 4. Les activités maximales sont observées à pH 6,5. Dans le cas d'utilisation de l'extrait des deux souches de *Lactococcus* sp, l'activité des bactériocines est meilleure et la croissance de *Salmonella* sp diminue rapidement pour s'annuler après 72 heures d'incubation.

Des arguments de plus en plus majeurs s'accumulent en faveur de ce résultat ; Gomes et Xavier Malcata (1998); Frenandez-Murga et al. (2000) ; Vinod Kumar et al. (2006) ont démontré que le pH optimal de production des bactériocines par les bactéries lactiques est 6.5, de plus, ils ont confirmé que l'action de ces bactériocines est maximale au

même pH (6,5). A travers ces résultats, nous pouvons conclure que le pH intestinal est optimal pour la production de bactériocines et pour l'expression de son activité.

#### **14.2. En présence de l'extrait lactique obtenu par la méthode précipitation au sulfate d'ammonium**

Une diminution remarquable de la charge bactérienne de *Salmonella* sp a été observée après 3 jours de contact avec les extraits. Donc le contact et la persistance des souches lactiques elles même pendant une lente durée avec la souche pathogène *Salmonella* sp n'est pas obligatoire pour que les bactériocines exercent leurs effets. La bactériocine conserve toute son activité pendant 3 jours à une température de 37°C selon nos conditions expérimentales. Sa stabilité a été détectée à un pH compris de 6,5, qui est son pH optimum. La sensibilité de *Salmonella* sp aux extraits lactiques à pH varié est due à leur incapacité à produire une réponse adaptative aux peptides bioactives comme le montre Kim et Dunn (1999) ; Even et al. (2002).

La stabilité de nos extraits a été détectée à une gamme de pH comprise entre 5 à 6, son pH optimum est estimé à 6, nos résultats sont en accord avec ceux d'Allouche et al. (2010).

#### **15. Test UV-Visible**

On observe la présence d'une absorbance maximale entre 217nm et 220nm, ce qui indique la présence des peptides bioactifs.

#### **16. Test HPLC**

Nos chromatogrammes montrent des pics, tant de bactériocines que d'impuretés voisines. Les pics des bactériocines obtenus sont ainsi bien résolus. La séparation obtenue après une première chromatographie étant tout à fait satisfaisante, les fractions les plus actives correspondant aux temps de rétention 8,6 min pour les extraits de chaque souche lactique trouvés par les deux méthodes d'extraction en comparaison avec le standard. Un pic de bactériocine très propre a ainsi pu être obtenu avec un temps de rétention de 8,5 min pour l'extrait trouvé par la méthode d'adsorption-désorption de la bactérie *Lactobacillus plantarum*. Il a été aussi vérifié que l'épaulement qui apparaît après le pic de bactériocine ne correspond pas à une substance active et il ne s'agit que d'une impureté.

### **17. CMI/CMB**

La CMI est la plus faible concentration qui inhibe toute croissance visible d'un microorganisme après 24 heures d'incubation dans un milieu de croissance spécifique (Jarlier, 2004).

Le but de cette méthode est de déterminer la plus faible concentration en bactériocine capable de provoquer une inhibition complète de la croissance de la bactérie cible.

Les spectres d'inhibition des bactériocines s'établissent à partir des préparations purifiées (extraits bactériociniques). D'après la CMI, les résultats obtenus sont très différents et présentent une inhibition contre la souche pathogène *Salmonella* sp. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) trouvées par Ennahar et al. (2000) aussi ne sont pas les mêmes pour les souches lactiques utilisées, elles sont variables selon les espèces bactériennes.

Le résultat sera, donc, représentatif de l'activité antibactérienne globale d'une seule bactériocine. Pour cette raison, lorsqu'une souche produit plusieurs bactériocines, l'interprétation du spectre d'inhibition est seulement possible si celui-ci est réalisé à partir de bactériocines purifiées (Sebti, 2002).

# Conclusion

## CONCLUSION

L'exploitation du potentiel biologique des espèces bactériennes revêt un intérêt important, ainsi les nouvelles démarches consistent à s'intéresser à la recherche des peptides bioactifs dans la partie extracellulaire d'origines bactériennes.

Notre travail a porté sur des bactéries lactiques de différentes genres, quatre bactéries ont été isolées à partir du lait cru de vache de l'ouest de l'Algérie, et une c'est une souche de référence provienne de la station de recherche INRA-France.

La première étape de cette étude consiste en l'obtention d'un groupe de souches de bactéries lactiques représentant une contribution de notre part dans l'acquisition d'une banque de souches lactiques qui fera par la suite l'objet de notre étude.

Après l'isolement, purification et l'identification biochimique des quatre espèces étudiées (*Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Leuconostoc* sp et *Lactobacillus* sp), une étude de l'effet antibactérien a été effectuée vis-à-vis de *Salmonella* sp.

La mise en évidence de l'activité antagoniste des souches lactiques était l'objectif de cette étude. D'après le test *in vitro*, nos souches lactiques présentent un effet bactéricide très apparent traduit par l'apparition des halos clairs autour des puits. D'après le test *in vivo*, nous avons conclu que les agents biothérapeutiques utilisés dans le traitement de certaines infections microbiennes chez l'homme et chez certaines populations animales, améliorent l'état de santé et assurent le maintien de l'équilibre écologique de la microflore intestinale, ces intérêts bénéfiques ont été nettement observés dans la présente étude. Après l'étude des traitements appliqués sur les souris conventionnelles on conclue que la prise quotidienne d'une flore lactique provoque une diminution significative de germe pathogène.

Suivant les résultats qu'on a obtenus, nous pouvons prédire que les surnageants contiennent plutôt des substances bioactives alors que les culots sont moins actifs. L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* constitue une première étape dans la recherche des substances de source naturelle biologiquement active.

Notre étude concernant les effets bénéfiques des bactéries lactiques et de leurs utilisations dans le contrôle des micro-organismes pathogènes, nous a permis de confirmer la validité de nombreuses théories, y compris l'exclusion compétitive, l'inhibition de la croissance des pathogènes.

On a conclu également que les modes d'action des bactéries lactiques utilisées se sont focalisées sur la colonisation intestinale et l'induction de la suppression de la croissance et de l'invasion des microorganismes pathogènes.

La deuxième étape de l'étude a pour intérêt d'une caractérisation des substances inhibitrices dans les surnageants a été effectuée aux cinq bactéries lactiques, cette caractérisation est basée sur l'effet du pH et sels biliaires, l'effet de température et l'effet des enzymes protéolytiques.

Il serait intéressant de mener une enquête détaillée sur les fractions des extraits naturels démontrant l'activité antimicrobienne *in vitro* et *in vivo*, en vue d'identifier l'espèce chimique ou les composés responsables de ces activités. Une extraction a été réalisée par le biais de deux méthodes: extraction par sulfate d'ammonium et adsorption-désorption. Des tests complémentaires seront nécessaires comme une analyse par UV-Visible, Infra-Rouge et la chromatographie liquide à haute performance s'imposent. L'étude des modes d'action de ces composés sur les différents microorganismes s'imposent à fin de les utilisé comme des agents de prévention et à intérêt alimentaire.

En conclusion, il serait intéressant d'approfondir les investigations physico-chimiques et biologiques sur ces extraits afin d'isoler les molécules responsable des activités observées, ce qui permettra d'élargir l'arsenal thérapeutique des médicaments à base de bactéries, ainsi qu'une identification par PCR de ces dernières.

# **Références bibliographiques**

Références bibliographiques

A

**Aasen I.M., Moretro T., Katla T., Axelsson L., Storro I. 2000.** Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *L. sakei* CCUG 42687. Appl. Microbiol. Biotechnol., 53: 159-166.

**Abee T., Rombouts F.M., Hugenholtz J., Guihard G., Letellier L. 1994.** Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. Applied and Environmental Microbiology. 60, 1962-1968.

**Achemchem 2004.** Purification et caractérisation d'une bactériocine anti-*Listeria* produite par *Enterococcus faecium* F-420 isolée à partir de lait cru de chèvre. Biotechnologies. 47 (2), 384-388.

**Achemchem F., Abrini J. 1997.** Production de bactériocines par des bactéries lactiques à partir du jben de chèvre du Nord du Maroc. Journal of Applied Microbiology, 70, 660-669.

**Adams M.R., Hall C.J. 1988.** Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. Int. J. Food Sci. Technol. 23: 287-292.

**Agence française de sécurité sanitaire des aliments (afssa). 2005.** Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte.

**Albano H., Todorov S.D., Van Reenen C.A., Hogg T., Dicks L.M.T., Teixeira P. 2007.** Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from "Alheira", a fermented sausage traditionally produced in Portugal. Elsevier. International Journal of Food Microbiology. 116: 239-247.

**Alexandre D.P., Silva M.R., Souza M.R., Santos V.L.M. 2002.** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria from artisanal minas cheese against indicator microorganisms. Arq. Brasil. Med. Vet. Zootec. 54: 424-428.

**Allgaier H., Jung G., Werner R.G., Schneider U., Zahner H. 1986.** Epidermin Squencing of a heterodet tetracyclic 21- peptide amide antibiotic. Eur. J. Biochem. 160: 9-22.

**Allouche F.N., Hellal A., Laraba A. 2010.** Etude de l'activité antimicrobienne de souches de Lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. Nature et Technologie. 3: 13-20.

**Amélie C.P. 2006.** *Salmonella*, salmonelloses bovines : état des lieux, épidémiologie en France. Ecole Nationale Vétérinaire D'alfort.

## Références bibliographiques

**Ammor M.S., Mayo B. 2007.** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science.* 76 : 138-146.

**Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. 2006.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control* 17: 454-468.

**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. 1-Screening and characterization of the antibacterial compound. *Food Control.* 17(6): 454-461.

**Amrouche T. 2005.** Contribution à l'étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactérie: Analyse in vitro et étude ex vivo des mécanismes moléculaires impliqués. Thèse de Doctorat. Faculté des études supérieures de l'Université Laval.245p.

**Anastasiadou S., Papagianni M., Ambrosiadis I., Koidis P. 2008.** Rapid quantifiable assessment of nutritional parameters influencing pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627. *Bioresource Technol.*, 99(14): 6646-6650.

**Anderssen E.L., Diep D.B., Nes I.F., Eijsink V., Nissen-Meyer J. 1998.** Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2269-2272.

**Arous S., Dalet K., Héchard Y. 2004.** Involvement of the mpo operon in resistance to class IIa bacteriocins in *L. monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 238: 37-41.

**Aslim B., Yuksekdog Z.N., Sarikaya E., Beyatli Y. 2005.** Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *Food Science and Technology* 38: 691-694.

**Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidmen Z.G., Smith. 1991.** In: *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley and Sons, New York, NY. [Links J. Mak, Y.M., Sornarajah, R. and Ho, K.K, p.1.6.1 and 1.6.4.

**Avila M., Garde S., Medina M., Nunez M. 2005.** Effects of milk inoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture. *J. Food Prot.* 68: 1026-1033.

**Avonts L., De Vuyst L. 2001.** Antimicrobial potential of probiotic lactic acid bacteria *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol. Wet.* 66: 543-50.

**Axelsson L. 2004.** Classification and physiology In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. Ouwehand A. 3<sup>e</sup> Ed. New York, Marcel Dekker, Inc. 633: 1 - 66.

## B

**Badis A., Guetarni D., Moussa B., Henni D.E., Tornadijo E., Kihal M., 2004.** Caractéristiques des bactéries d'acide lactique cultivable, isolés à partir de lait cru de chèvre algérienne et l'évaluation de leurs propriétés technologiques. Food Microbiol. 21 (3): 343-349.

**Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarnie D., Kihal M. and Ouzrout R., 2003.** Caractérisation phénotypiques des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales—Arabia et Kabyle. Sci et Tech., 23 pp: 30-37.

**Barefoot S.F., Klaenhammer T.R.** Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Antimicrob Agents Chemother. 26 (1984) 328–334.

**Barefoot S.F., Klaenhammer T.R. 1983.** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1808-1815.

**Bauer R., Dicks L.M.T. 2005.** Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. International Journal of Food Microbiology. 101: 201-216.

**Bekhouche F., Boulahrouf A. 2005.** Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant a six stations d'élevage de constantine. Sciences and Technologies. 23: 38-45.

**Benkerroum N., Oubel H., Zahar M., Dlla S., Filalimaltouf. 2000.** Isolation of a bacterocin producing *Lactococcus lactis* subsp *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan lben. Journal of Applied microbiology. 89: 960-966.

**Bennik M.H., Verheul A., Abee T., Naaktgeboren-Stoffels G., Gorris L.G., Smid E.J. 1997.** Interactions of nisin and pediocin PA- 1 with closely related lactic acid bacteria that manifest over 100-fold differences in bacteriocin sensitivity. Applied and Environmental Microbiology. 63, 9, 3628-36.

**Benthin S., Villadsen J. 1995.** Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* by D- and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. J. Appl. Bacteriol. 78:647-654.

## Références bibliographiques

- Bettelheim K.A. 2007.** The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Crit Rev Microbiol.* 33(1): 67-87.
- Beukes E.M., Bester B.B., Mostert J.F. 2001.** The microbiology of South African traditional fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 63, 189-197.
- Bezkorovainy A. 2001.** Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *J. Clin. Nut.* 73: 3995-4055.
- Bispham J., Tripathi B.N., Watson P.R., Wallis T.S. 2001.** Ilot de pathogénicité de *Salmonella* 2 influences à la fois systémique et de salmonellose à *Salmonella* induit entérite chez les veaux. *Infect Immun.* 69: 367-377.
- Biswas S.R., Ray P., Johnson M.C., Ray B. 1991.** Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (4), 1265-1267.
- Bjorkroth J., Holzapfel W. 2006.** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *Prokaryotes.* 4: 267-319.
- Bonjean-tremolet B. 1978.** Contribution à l'étude des infections à *Salmonella arizonae*. Thèse Méd. Lyon, n°101.
- Bossis E., Lemanceau P., Latour X., Gardan L. 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie.* 20: 51-63.
- Bourel G., Henini S., Krantar K., Oraby M., Divies C., Garmyn D. 2001.** Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. INRA EDP Sciences, pp: 75-82.
- Bourgault A.M., Lamothe F. 1988.** Evaluation of the KOH test and the antibiotic disk test in routine clinical anaerobic bacteriology. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2144-2146.
- Bourgeois C.M., Larpent J.P. 1996.** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2, pp. 523.
- Bourgeois C., Mescle J., Zucca J. 1996.** Microbiologie alimentaire, aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome 1. Edition: Toc, Lavoisier. Pris. pp: 272-293.
- Bradly R.L., Anold E., Barbano D.M. 1992.** Chemical and physical methods. In: *Standard methods for the examinations of dairy products*, Ed. Marshall: 433-531.
- Breukink E., Van Kraaij C., Demel R.A., Siezen R.J., Kuipers O.P., De Kruijff B. 1997.** The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry.* 36, 23, 6968-76.

**Broadbent J.R. 2001.** Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.). 2<sup>e</sup> Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 243-300.

**Brown J.H. 1935.** «Theobald Smith 1859-1934 », dans J Bacteriol, vol. 30, no 1, p. 1–3.

**Brul S., Coote P. 1999.** Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. Int. J. Food Microbiol. 50(1-2): 1-17.

**Burns P., Vinderola G., Binetti A., Quiberoni A., De los Reyes-Gavilan C. G., Reinheimer J. 2008.** Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *Int. Dairy J.* 18: 377-385.

## C

**Callewaert R., De Vuyst L.** Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed- batch fermentation. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66 (2), 606-613.

**Casla D., Requena T., Gomez R. 1996.** Antimicrobiol activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus carvatus* IFPL 105. J. Appl. Bacteriol, 81: 1, 35 – 41.

**Castagliuolo I., Riegler M.F., Valenick L., Lamont J.T., Pothoulakis C.** *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. Infect Immun 1999; 67:302-7.

**Castellano P., Vignolo G., Farias R.N., Arrondo J.L., Chelin R. 2007.** Molecular view by Fourier transforms infrared spectroscopy of the relationship between lactocin 705 and membranes: speculations on antimicrobial mechanism. Applied and Environment Microbiology. 73(2): 415-420.

**Catto-Smith A.G. 1996.** Gut flora and mucosal function. Asia Pacific J. Clin. Nutr; 5: 36- 39.

**Carr F.J., Chill D., Maida N., 2002.** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. Critical Reviews in microbiology, 28(4):281-370.

**Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K. 1998.** Development and application of an in vivo methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, 84 pp: 759–768.

**Chatterjee C., Miller L.M., Leung Y.L., Xie L., Yi M., Kelleher N.L., Van Der Donk W.A. 2005.** Lacticin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production. *Journal of Chemical Society*. 127: 15332-15333.

**Chen Y.S., Srionnual S., Onda T., Yanagida F. 2007.** Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, 45: 190-193.

**Chen H., Hoover D.G. 2003.** Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*. 2: 82-100.

**Chen Y., Ludescher R.D., Montville T.J. 1997a.** Electrostatic interactions but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipids vesicles. *App. Environ. Microbiol.* 63 : 4770-4777.

**Chen Y., Shapira R., Eisenstein M., Montville T.J. 1997b.** Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 2, 524-31.

**Chen T., Montville T.J. 1995.** Efflux of ions and ATP depletion induced by pediocin PA-1 are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Bacteriology*. 79, 684-690.

**Cherif A., Rezgui W., Raddadi N., Daffonchio D., Boudabous A. 2008.** Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp *entomocidus* HD110. *Microbiological Research*, 163(6): 684-692.

**Cheriguene A. 2008.** Caractérisation et étude du potentiel technologique des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chèvre de l'Ouest Algérien. Thèse de Doctorat en Microbiologie Alimentaire et Industrielle. Université d'Oran Es-Senia.

**Chikindas M.L., Garcia-Garcera M.J., Driessen A.J., Ledebouer A.M., Nissen-Meyer J., Nes I.F., Abee T., Konings W.N., Venema G. 1993.** Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 59, 11, 3577-84.

**Chiu C.H., Tang P., Chu C., Hu S., Yu Q.J., Chou Y.Y., Wang H.S., Lee Y.S. 2005.** La séquence du génome de *Salmonella enterica* sérotype *Choleraesuis*, un agent pathogène très envahissantes et résistantes zoonotiques. *Nucleic. Acids Res.* 33:1690-1698.

## Références bibliographiques

**Choukri T. 2007.** Antagonisme de quelques souches de bifidobacteries vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Mémoire de magister. Université de Mostaganem. Page 16-30.

**Christensen D.P., Hutkins R.W. 1992.** Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. Applied and Environmental Microbiology. 58, 10, 3312-5.

**Cintas L.M., Casaus M.P., Herranz C., Nés I.F., Hernandez P.E. 2001.** Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Food. Sci. Technol. Int. 7: 281-305.

**Cocolin L., Rantsiou K. 2007.** Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. Applied Microbiology and Biotechnology. 76, 6, 1403-11.

**Cocolin L., Foschino R., Comi G., Fortina M.G. 2007.** Description of thz bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. Elsevier. Food Microbiology. 24 : 752- 758.

**Cogan T.M., Barbosa M., Beuvier E., Bianchi-Salvadori B., Cocconcelli P.S., Fernandes I. 1997.** Characterization of lactic acid bacteria in artisanal dairy products. Journal of Dairy Research, 64, 409–421.

**Cogan T.M. 1972.** Modification of the prill and hammer method for determining diacetyl Jo. Dairy. Sci, 55:382-384.

**Collard J.M., Bertrand S., Dierick K., Godard C., Wildemaue C., Vermeersch K., Duculot J., Van Immerseel F., Pasmans F., Imberechts H., Quinet C. 2005.** Drastic decrease of *Salmonella enteritidis* isolated from humans in Belgium in 2005, shift in phage types and influence on foodborne outbreaks. Epidemiol Infect. Jul 24; 1-11.

**Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J., Wallbanks S., 1993.** Taxonomic studies of some *Leuconostoc* like organisms from fermented sausages, description of a new genus Weissella for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. J. Appl. Bacteriol. (75): 595-603.

**Contrepolis M., Dubourguier H.C., Parodi A.L., Girardeau J.P., Ollier J.L. 1986.** Septicaemic *Escherichia coli* and experimental infection of calves. Vet. Microbiol. 12(2): 109-118.

**Conway P. L., Gorbach S.L., Goldin B.R., 1987.** Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. Journal of Dairy Science 70: 1-12.

**Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. 2005.** Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat Rev Microbiol; 3:777-88.

**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.

**Coventry M.J., Gordon J.B., Alexander M., Hickey M.W., Wan J. 1996a.** A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate. *Applied and Environmental Microbiology.* 62, 5, 1764-9.

**Coventry M.J., Wan J., Gordon J.B., Mawson R.F., Hickey M.W. 1996b.** Production of brevicin 286 by *Lactobacillus brevis* VB286 and partial characterization. *Journal of Applied Bacteriology.* 80, 1, 91-8.

## D

**Daba H., Lacroix C., Huang J., Simard R.E., Lemieux L. 1994.** Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5 J. of *Appl. Bacteriol.* 77 : 682-88

**Daba H., Lacroix C., Huang J., Simard R.E. 1993.** Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 39: 166-173.

**Daeschel M.A. 1989.** Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43:164-167.

**Dalet K., Cenatiempo Y., Cossart P., Hechard Y. 2001.** A sigma (54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology.* 147, Pt 12, 3263-9.

**Dalet K., Briand C., Cenatiempo Y., Héchard Y. 2000.** The rpoN gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.,* 41(6): 441-443.

**Davey G.P., Richardson B.C. 1981.** Purification and some properties of diplococcin from *Sreptococcus cremoris* 346. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 84-89.

**Davies E.A., Adams M.R. 1994.** Resistance of *Listeria monocytogenes* to the bacteriocin nisin. *International Journal of Food Microbiology.* 21, 4, 341-7.

**Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C., Ross P. 2006.** Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.,* 16: 1058-1071.

## Références bibliographiques

**Delaney S.M., Mavrodi D.V., Bonsall R.F., Thomashow L.S. 2001.** PhzO, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens*. 30-84. J. Bacteriol. 183: 318-327.

**Delarras C. 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier. P: 128, 129, 269, 271.

**Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M.C., Janssens D. 1994.** Caractéristique générale des bactéries lactiques. In Bactéries lactiques vol 1. pp. 25-116.

**De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. 1960.** A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 23: 130-135.

**De Roissart H. 1986.** Bactéries lactiques, p. 343. In F. M. Luquet (ed.), Laits et produits laitiers : vache, brebis, chèvre, vol. 3. Lavoisier, Paris.

**De Rycke J., Guillot J.F., Boivin R., 1988.** An *in vivo* assay for the detection of cytotoxic strains of *Escherichia coli*. Ann Rech Vet. 20(1): 39-46.

**Desar I.M.E., De Boer M., Bens C.C.P.M. 2008.** Rapid and reliable identification of *Streptococcus anginosus* group isolates to the species level by real-time PCR and melting curve analysis. Journal of Microbiological Methods. vol. 75, 372-374.

**De Schrijver K., Buvens G., Possé B., Van den Branden D., Oosterlynck C., De Zutter L., Eilers K., Piérard D., Dierick K., Van Damme-Lombaerts R., Lauwers C., Jacobs R. 2007.** Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with the consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, Euro Surveill 2008; 13(7).

**Desmazeaud M., Cogan T.M. 1996.** Role of cultures in cheese ripening. Int: Cogan, T.M., Acoolas, J-P. (Eds), Dairy Starter Cultures. VCH Publishers, Inc., New York, pp. 207-231.

**De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. Whiteman W.B. 2009.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg London, New York.

**De Vuyst L., Leroy F. 2007.** Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 13, 4, 194-9.

**De Vuyst L., Avonts L., Makras E. 2004.** Probiotics, prebiotics and gut health. In C. Remacle & B. Reusens (Eds), Functional Foods: Ageing and Degenerative Disease, pp. 416-482. Cambridge, United Kingdom, Woodhead Publishing Ltd.

**De Vuyst L., Avonts L., Neysens P., Hoste B., Vancanneyt M., Swings J., Callewaert R. 2004.** Applicability and performance of the bacteriocin producer *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in type II cereal fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 90: 93-106.

**De Vuyst L., Vandamme E.J. 1993.** Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications, in bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and applications: 151-221. London: Chapman et Hall.

**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.

**Dilmi Bouras A., 2002.** Survie de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* et leur action sur le métabolisme du cholestérol. Thèse de doctorat d'état, INA, El Harrach, Alger.

**Dobson C.M., Deneer H., Lee S., Hemmingsen S. 2010.** Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus claussenii* ssp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

**Dortu C., Thonart P. 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 13: 143-154.

**Dougherty B.A., Hill C., Weidman J.F., Richardson D.R., Venter J.C., Ross R.P. 1998.** Sequence and analysis of the 60 kb conjugative, bacteriocin-producing plasmid pMRCOI from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Mol. Microbiol.* 29: 1029-1038.

**Drider D., Fimland G., Hechard Y., Mc Mullen L.M., Prévost H. 2006.** The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 70: 564-582.

## E

**Eijsink V.G., Axelson L., Diep D.B., Havarstein L.S., Holo H., Nes I.F. 2002.** Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; and example for biological warfar and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 81: 1-4, 639-54.

**Eijsink V.G.H., 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 (9): 3275-3281.

**Elmoualdi L., Labioui H., Eyachioui M., Ouhssine M. 2006.** Caracterisation, fermentation et valorization de dechets d'eviscération de volailles de kenitra, Maroc. *Afrique Science*, Vol. 02, N°1 pp 102-115.

**El Shafei H.A., Abdel-Sabour H., Ibrahim N., Mostefa Y.A. 2000.** Isolation, screening and characterisation of the bacteriocin-producing Lactic and bacteria isolated from traditional fermented. *Food Microbiol. Res.* 154: 4, 321-331.

**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.

**Endo A., Okada S. 2005.** Monitoring the lactic acid bacterial diversity during shochu fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, vol. 99, 216-221.

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

**Esther I.A. 2009.** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Université de Strasbourg. N° d'ordre 136.

**Euzéby J. P. 2006.** Enterobacteriaceae, "Enterobacteriales". *Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire*, 22p.

**Euzéby J. P. 2000.** *Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire*, Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris: 26-30.

**Even S., Lindley U.D., Loubire P., Coccagn-bousquet. 2002.** Dynamic reponse of catabolic pathway of autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation of metabolic and energetic constraints. *Mol. Microbiol.* 45: 1143-1152.

**Everest P., Ketley J., Hardy S., Douce G., Khan S., Shea J., Holden D., Maskell D., Dougan G. 1999.** Évaluation des mutants *Salmonella typhimurium* dans un modèle expérimental de gastro-entérite. *Infect. Immun.* 67:2815-2821.

## F

**FAO/WHO.** Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Report of a joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London Ontario, Canada 2002.

**Fernandez R.O., Pizarro R.A. 1997.** High performance liquid chromatographic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *J. Chromatogr.* 771(A): 99-104.

**Fimland G., Axelsson L., Brurberg M.B., Nes I.F., Eijsink V.G., 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. *Journal of bacteriology*. 182: 2643-2648.

**Fleming H.P., Etechells J.L., Costilow R.N. 1975.** Microbiological inhibition of isolate of *Pediococcus* from cucumber brine. *Appl. Environ. Microbiol.* 30: 1040-1042.

**Foley G.L., Schlafer D.H. 1994.** Bacterial endotoxemia and reproductive effects in ruminants, *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 10(3), 491-501.

**Font de Valdez G. 2002.** Maintenance of Lactic Acid Bacteria. In *Food Microbiology Protocols*. Spencer, J. F. T et Ragout de Spencer, A. L. eds Humana Press. Totowa, New Jersey, Argentine. 163-171.

**Franz C.M., Van Belkum M.J., Holzappel W.H., Abriouel H., Galvez A. 2007.** Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*. 31, 3, 293-310.

**Franz C.M.A.P., Stiles M.E., Schleifer K.H., Holzappel W.H. 2003.** Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology Enterococci in Foods. Functional and Safety Aspects*. vol. 88,105-122.

**Friedman C.R., Torigian C. 1998.** An outbreak of salmonellosis among children attending a reptile exhibit at a zoo. *J Pediatr*, May; 132 (5):802-7.

**Fuller R. 1989.** Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol*; 66: 365-378.

**Furet J.P., Quenee P., Tailliez P. 2004.** Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*. vol. 97, 197-207.

## G

**Galverz A., Abriouel H., Lopez R.L., Omar N.B. 2007.** Bacteriocin- based strategies for food bioservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120 (1-2):51-70.

**Garcera M.J., Elferink M.G., Driessen A.J. Konings W.N. 1993.** *In vitro* pore-forming activity of the lantibiotic nisin. Role of protonmotive force and lipid composition. *European Journal of Biochemistry*. 212, 2, 417-22.

**Garvie E.I. 1986.** Taxonomy and identification of bacteria important in cheese fermented dairy products. In *advances in the microbiology and biochemistry and fermented milk*. F. L. Davies., B. A.

## Références bibliographiques

**Gaussier H., Morency H., Lavoie M.C. Subirade M. 2002.** Replacement of trifluoroacetic acid with HCl in the hydrophobic purification steps of pediocin PA-1: a structural effect. *Applied and Environnement Microbiology*. 68: 4803-4808.

**Gewirtz A.T., Siber A.M., Madara J.L., Mc Cormick B.A. 1999.** Orchestration de mouvement des neutrophiles par les cellules épithéliales intestinales en réponse à *Salmonella typhimurium* peut être découplée de l'internalisation bactérienne. *Infect. Immun.* 67:608-617.

**Gibson G.R., Rouzaud G., Brostoff J., Rayment N. 2005.** An evaluation of probiotic effects in the human gut: microbial aspects. Final Technical report for FSA project ref G01022.

**Gillor O., Nigro L.M., Riley M.A. 2005.** Genetically bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*, (11).

**Gomez-Alonso S., Hermosin-Gutierrez I., Garcia-Romero E. 2007.** Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 608-613.

**Gomes A.M.P., Xavier Malcata F. 1998.** Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *J. Dairy Sci.*, 81: 1992-1507.

**Gonzalez L., Sandoval H., Sacristan N., Castro J.M., Fresno J.M., Tornadijo M.E. 2007.** Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control.*, 18: 716-722.

**Gravesen A., Ramnath M., Rechinger K.B., Andersen N., Jänsch L., Héchar Y., Hastings J.W., Knøchel S. 2002.** High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *L. monocytogenes*. *Microbiology*, 148: 2361-2369.

**Gu R.X., Yang Z.Q., Li Z.H., Chen S.L., Luo Z.L. 2008.** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. *Anaerobe*. 14: 313-317.

**Guessas B., 2006.** Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolés du lait cru de chèvre dans le biocontrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat en microbiologie appliqué. Université d'Oran Es-Senia.

**Guessas B., Kihal M. 2004.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African J. Biotechnol.* 3(6): 339-342.

**Guglielmottia D.M., Golowczych M., Jorge A., Reinheimera L., 2007.** Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants, International Dairy Journal, 17 pp: 916–925.

**Guinane C.M., Cotter P.D., Hill C., Ross P. 2005.** A review: microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota of food. J. Appl. Microbiol., 98: 1316-1325.

**Guiraud J.P. 2003.** Microbiologie Alimentaire. Tec & Doc, Dunod. Paris. 90-292.

**Guiraud J.P. 1998.** Microbiologie alimentaire, DUNOD, Paris. P: 80, 84, 116, 282, 283, 291.

**Gurira O.Z., Buys E.M. 2005.** Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. Food Microbiology., 22: 159-168.

**Guyonnet D., Fremaux C., Cenatiempo Y., Berjeaud J.M. 2000.** Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. Applied and Environmental Microbiology. 66, 4, 1744-8.

**Gyu S.C., Hyung K.D. 2006.** Isolation and identification of lactic acid bacteria isolated from a traditional jeotgal product in Korea. *Ocean Science Journal*. Vol 41(2): 113-119.

## H

**Haddie J.M. 1995.** The genus *Streptococcus*. In The genera of Lactic acid Bacteria. Wood B.J.B., Holzapfel W.H. Chapman & Hall, London., 392, 55 - 124.

**Haddie J.M. 1986.** Other *streptococci*. In : Bergey's manual of systematic bacteriology (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). 1 : 1070.

**Hadef S. 2012.** Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée. Université Kasdi Merbah-Ouargla.

**Hammes W.P., Hortal C. 2006.** The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Chap.1. 2. 10. In procariotes. 4: 320-403.

**Harir A., Ouis N., Sahnouni F., Bouhadi D. 2009.** Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. 37-55.

**Harlander S.K. 1993.** Regulatory aspects of bacteriocin use. In: Hoover, D. G. and Steenson, L. R., Editors, 1993. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Academic Press, New York, 233-236.

**Hasper H.E., Kramer N.E., Smith J., Hillman J.D., Zachariah C., Kuipers O.P., De Kruijff B., Breukink E. 2006.** An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid. *Science*. 313:1636-1637.

**Hassan A.N., Frank J.F. 2001.** Starter Cultures and their use. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2<sup>e</sup> Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.

**Hata A., Moller H.S., Stensballe A., Lindmark-Mansson H., Karlsson A.H. 2010.** Effect of minor milk proteins in chymosin separated whey and casein fractions on cheese yield as determined by proteomics and multivariate data analysis. *J. Dairy Sci.* 91: 3787-3797.

**Hechard Y., Sahl H.G. 2002.** Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84: 545-557.

**Hechard 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.

**Hee Ji Lee David A., Orlovich John R., Tagg Paul Fawcett J. 2009.** Detection and Specific Enumeration of Multi-Strain Probiotics in the Lumen Contents and Mucus Layers of the Rat Intestine after Oral Administration. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 1:113–120/ DOI 10.1007/s12602-009-9019-6.

**Hemme D., Foucaud-Scheunemann C. 2004.** *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int Dairy J.* 14: 467-494.

**Hensel M., Shea J.E., Gleeson C., Jones M.D., Dalton M.D.E., Holden D.W. 1995.** L'identification simultanée des gènes de virulence bactérienne par une sélection négative. *Science*.

**Hensel M., Shea J.E., Waterman S.R., Mundy R., Nikolaus T., Banks G., Vazquez-Torres A., Gleeson C., Fang F.C., Holden D.W. 1998.** Gènes codant des protéines effectrices putatif du système de sécrétion de type HJ d'îlot de pathogénicité de *Salmonella* sont pour la virulence des bactéries et la prolifération dans les macrophages. *Moi. Microbiol.* 30:163-174.

**Herranz C., Chen Y., Chung H.J., Cintas L.M., Hernandez P.E., Montville T.J. Chikindas M.L. 2001a.** Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Applied and Environmental Microbiology.* 67, 4, 1689-92.

## Références bibliographiques

- Herranz C., Cintas L.M., Hernandez P.E., Moll G.N. Driessen A.J. 2001b.** Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45, 3, 901-4.
- Hersh D., Monack D.M., Smith M., Ghorri N., Falkow S., Zychlinsky. 1999.** L'invasine Salmonella SIPB induit l'apoptose des macrophages en se liant à la caspase- 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2396-2401.
- Hesse M., Meier H., Zeeh B. 1997.** Méthode spectroscopique pour la chimie organique. Edition Masson.
- Hildebrand D.C. 1988.** Pectate and pectin gel for differentiation of *Pseudomonas* sp. and other bacterial plant pathogens. *Phytopathol.* 61: 1430- 1439. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178-703.
- Ho Thi Nguyet Thu. 2008.** Étude de la flore lactique du Nem Chua, produit carné fermenté cru traditionnel du sud Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments et Nutrition. Université Bordeaux 1- France.
- Ho T.N.T., Tuan N.N., Deschamps A., Caubet R. 2007.** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology*. 134-142.
- Hogg T. 2005.** Essential microbiology. John Wiley & Sons, Ltd. 188-190.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. 1994.** Genus *Pseudomonas*. In: Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A; Staley, J.T.; Williams, S.T. (Eds) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Williams and Wilkins, pp. 93-94.
- Holzappel W.H., Schillinger U. 2002.** Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35, 109-116.
- Holzappel W.H., Geisen R., Schillinger U. 1995.** Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*. 24: 343-362.
- Hsiao C., Siebert K. 1999.** Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 47 (3): 189-201.
- Hudault S., Lievin V., Bernetcamard M.F., Servin A.L. 1997.** Antagonistic activity exerted *in vivo* by *Lactobacillus casei* (GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 513-518.
- Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. 2007.** Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int J Food Microbiol.* Jul 15;117 (3): 237-57.

I

**Iyer R., Tomar S.K., Uma Maheswari T., Singh R., 2010.** *Streptococcus thermophilus* strains: multifunctional lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 20 : 133-141.

**Izquierdo. 2009.** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique ; thèse Doctorat ; Université de Strasbourg ; Strasbourg ; France.

J

**Jack R.W., Tagg J.R., Ray B. 1995.** Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiological Reviews. 59, 2, 171-200.

**Jarlier. 2004.** Résistance aux antibiotiques, rôle du laboratoire de bactériologie. 2<sup>ème</sup> édition. Onerba. France.

**Jiménez-Díaz R., Rios-Sánchez R.M., Desmazeaud M., Ruiz-Barba J.L., Picard J-C. 1993.** Pantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plaitnrzt* m LPCOIO isolated from a green olive fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1416-1424.

**Joffin J.N., Leyral G. 2006.** Microbiologie technique. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine Bordeaux, France, pp. 219-223.

**Joffin J.N., Layral G. 1996.** Microbiologie technique. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine Bordeaux., p : 219-223.

**Joffraud J.J., Cardinal M., Cornet J. 2006.** Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold smoked salmon. International Journal of Food Microbiology. vol. 112, 51-61.

**Jones B.D., Falkow S. 1996.** Salmonellose: les réponses immunitaires de l'hôte et les déterminants de la virulence bactérienne. Annu. Rev Immunol. 14:533-561.

K

**Kacem M., Zadi-Karam H., Karam N.E. 2003.** Lactic acid Bacteria of western Algeria. 1: Characteristics of strains isolated from raw milk and olive oil. Sciences et Technologies C. (Université Mentouri. Constantine. Algeria), 20, pp: 45-50.

**Kaiser A.L., Montville T.J. 1996.** Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. Applied and Environmental Microbiology. 62, 12, 4529-35.

## Références bibliographiques

- Karam H.Z., Karam N.E. 2006.** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *J. Tropicultura*, 24, 3, 153-156.
- Kawamura Y., Hou X.G., Sultana F., Miura H., Ezaki T. 1995.** Determination of 16S ribosomal-RNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 45, 406 - 408.
- Kérouanton A., Hennekinne J.A., Letertre C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A., De Buyser M.L.** Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol.* **2007**; Apr 20; 115 (3):369-75.
- Khalid N.M., Marth E.H. 1990.** Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* 73: 158-167.
- Kim W.S., Dunn N.W. 1999.** Differentiation of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* and subsp *cremoris* strains by their adaptative response to stress. *FEMS Microbiology Letter*, 171: 57-65.
- Kimoto-Nira H., Kobayashi M., Nomura M., Sasaki K., Suzuki C. 2009.** Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition: Analysis by using different growth media. *Int. J. Food. Microbiol.* 131: 183-188.
- Klaenhammer T.R. 1994.** Activité antimicrobienne des bactéries lactiques, in «Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques» De Roissart H., Luquet F.M. Editeurs Loriga. Uriage. 245-280.
- Klaenhammer T.R. 1993.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12(1-3): 39-85.
- Klaenhammer T.R. 1988.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70, 3, 337-49.
- Klein S., Kush G. 2004.** Diffusion in  $\kappa$ -carrageenan/locust bean gum gel beads with or without entrapped growing lactic acid bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 1041.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G. 1998.** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41:103-125.
- Klein C., Kaletta C., Etian K.D. 1993.** Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:296-303.

**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.

**Kojic M., Svircevic J., Banina A., Topisirovic L. 1991.** Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacitilactis* S50. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1835- 1837.

**Koort J., Coenye T., Santos E.M. 2006.** Diversity of *Weissella viridescens* strains associated with "Morcilla de Burgos". *International Journal of Food Microbiology.* vol. 109, 164-168.

**Kovacs N. 1956.** Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178-703.

**Kristiansen P.E., Fimland G., Mantzilas D., Nissen-Meyer J. 2005.** Structure and mode of action of the membrane-permeabilizing antimicrobial peptide pheromone plantaricin A. *Journal of Biological Chemistry.* 280, 24, 22945- 50.

**Kumari A., Makeen K., Garg A.P., Marotta F., Gupta C., Divya. 2009.** Effet of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCSUB202, on mode of action of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* MTCC3038. *Int. J. Prob. Preb.* 4(3) : 1-6.

## L

**Labioui H., Elmoualdi L., El yachoui M., Ouhssine M. 2005.** Selection de souches de bacteries lactiques antibacteriennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 144(3-4), 237-250.

**Larpent J.P. 1997.** Microbiologie alimentaire, technique de laboratoire. Lavoisier Tec-Doc. 1073p.

**Larpent J.P. 1996a.** Les bactéries lactiques. In *Microbiologie alimentaire: Aliments fermentés et fermentation alimentaires.* Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 4-33.

**Larpent-Gourgaud M., Michaux O., Callon C., Brenot O., Sirami J., Bonnin P., Boissonnet B. 1993.** Etude comparée des flores d'aromatisation du saucisson de fabrication industrielle ou artisanale. *V.P.C* 4:23-47.

**Larsen A.G., Vogensen F.K., Josephsen J. 1993.** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *J Appl Bacteriol.*75: 113- 122.

## Références bibliographiques

**Leal-Sánchez M.V., Jiménez-Díaz R., Maldonado-Barragán A., Garrido-Fernández A., Ruiz-Barba J.L. 2002.** Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *L. plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 : 4465-4471.

**Leclerc H., Gaillard F.L., Simonet M. 1994.** Les grands groupes de bactéries. In: *Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien*. DOIN. Paris. 445.

**Leclerc H., Mossel D.A.A. 1989.** *Microbiologie du tube digestif*. Ed. Doin. Paris. 139-260.

**Lee K.H., Kim J.H., Lim D.S., Kim C.H. 2000.** Anti-leukaemic and antimutagenic effect of di (2-ethylhexyl) phthalate isolated from aloe vera. *J. Pharm. Pharmacol.* 52, 593.

**Lelliot R.A., Stead D.E. 1987.** In: T.F. Preece (Ed.). *Methods in Plant pathology*. Vol 2: *Methods for diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell. Oxford. UK, 212 p.

**Le Marrec C., Hyronimus B., Bressolier P., Verneuil B., Urdaci M.C. 2000.** Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 5213–5220.

**Le Minor L. 1992.** Taxonomie et nomenclature des Salmonella, *Med. Mal. Infect*, 22, 246- 248.

**Leroy S., Lebert I., Chacornac J.P., Chevalier I., Talon R. 2007.** Identification et caractérisation de la flore d'intérêt technologique: bactéries lactiques et staphylocoques à coagulase négative. *Sci. Tec. V. Prod. Carnés*. 25 (5): 172.

**Leroy F., De Winter T., Adriany T., Neysens P., De Vuyst L. 2006.** Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *L. amylovorus* DCE 471. *Int. J. Food Microbiol.*, 12 : 102-111.

**Leveau J.Y., Bouix M. 1993.** Les levures. Dans: *Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel*. Eds. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris, pp : 2-39.

**Levy E., Eyal Z., Chet I., Hochman A. 1992.** Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40:163-71.

**Lievin-Le Moal V., Amsellem R., Servin A.L., Coconnier M.H. 2002.** *Lactobacillus acidophilus* (souche LB) de l'adulte résident de l'homme exerce une activité de la microflore gastro-intestinale contre les dommages bordure en brosse promu par un *Escherichia coli* diarrhoeagenic dans les cellules des entérocytes-like. *Gut* 50: 803-811.

**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.

**Lima E.T., Andreatti Filho R.L., Okamoto A.S., Noujaim J.C., Barros M.R., Crocci A.J. 2007.** Evaluation *in vitro* of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research.*, 71: 103-107.

**Lima F.L., Farias F.F., Costa J.E., Auxiadora M.R., Alviano C.S., Farias L.M. 2002.** Bacteriocin production by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from oral cavity humans with periodontal diseases periodontal healthy subjects and marmosets. *Res. Microbiol.* 153, 1: 45-52.

**Limonet M., Cailliez-Grimal C., Linder M., Revol-Junelles A.M, Millière J.B. 2004a.** Cell envelope analysis of insensitive, susceptible or resistant strains of *Leuconostoc* and *Weissella* genus to *Leuconostoc mesenteroides* FR 52 bacteriocins. *FEMS Microbiology Letters.* 241, 1, 49-55.

**Limonet M., Revol-Junelles A.M., Cailliez- Grimal C., Millière J.B. 2004b.** Synergistic mode of action of mesenterocins 52A and 52B produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* FR 52. *Current Microbiology.* 48, 3, 204-7.

**Lin T.Y., Chien M.F.C. 2007.** Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food .Chem.* 100: 1419-1423.

**Liu S. 2003.** Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 83 (2): 115-131.

**Ly-Chatain M. H., Le M. L., Thanh M. L., Belin J. M., Waché Y. 2010.** Cell surface properties affect colonisation of raw milk by lactic acid bacteria at the microstructure level. *Food. Res. Int.* 43: 1594-1602.

## M

**Madsen K., Cornish A., Soper P., Mc Kaigney C., Jijon H., Yachimec C., Doyle J., Jewell L., De Simone C. 2001.** Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121:580-91.

**Maftah A., Renault D., Vignoles C., Hechard Y., Bressollier P., Ratinaud M.H., Cenatiempo Y., Julien R. 1993.** Membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes*

and mitochondria by the bacteriocin mesentericin Y105. *Journal of Bacteriology*. 175, 10, 3232-5.

**Makhloufi K.M. 2011.** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Biochimie. Université Pierre et Marie Curie-Paris 6. France. 200p.

**Makhloufi M., Rebuffat S., Drider D. 2011.** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du Boza. Thèse Doctorat. Université Pierre et Marie CURIE UPMC. Paris. France.

**Mameche-Doumandji A. 2008.** Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées localement. Thèse de Doctorat, Université de Blida: 44-85.

**Mami A., Henni J.E., Kihal M. 2008.** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy & Sci.*, 3: 39-49.

**Mann G.V., Spoerry A. 1974.** Caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. *Technologie de production. Am. J Clin. Nutr.*, 61, 353-359. 23.

**Mannu L., Paba A., Pes M., Scintu M.F., 2002.** Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional Pecorino Sardo cheese. *J. Appl. Microbiol.* 89:191-197.

**Maragkoudakis P.A., Zoumpopoulou G., Miaris C., Kalantzopoulos G., Pot B., Tsakalidou E. 2006.** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16: 189-199.

**Marteau P., Seksik P., Lepage P., Doré J. 2004.** Cellular and physiological effects of probiotics and prebiotics. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*. 4, 889-896.

**Martinez J.M., Kok J., Sanders J.W., Hernandez P.E. 2000.** Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 8, 3543-9.

**Martinez B., Suirez J.E., Rodriguez A. 1996.** Lactococcin 972: a homodimeric lactococcal bacteriocin whose primary target is not the plasma membrane. *Microbiol.* 142: 2393-2398.

**Martinez B., Sulrez J.E., Rodriguez A. 1995.** Antagonistic activities of wild lactococcal strains isolated from homemade cheeses. *J. Food Prot.* 58: 1118-1123.

**Martirani L., Varcamonti M., Naclerio G., De Felice M. 2002.** Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb Cell Fact.* 18: 1(1):1.

**Masuda S., Yamaguchi H., Kurokawa T., Shirakami T., Tsuji R.F., Nishimura I. 2008.** Immunomodulatory effect of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from soy sauce moromi grown in high-salt medium. *International Journal of Food Microbiology.*, vol. 121, 245-2.

**Mathara J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K., Holzapfel W.H. 2004.** Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 3, 269-278.

**Mavrodi O.V., Mc Spadden Gardener B.B., Mavrodi D.V., Bonsall R.F., Weller D.M., Thomashow L.S. 2001.** Genetic diversity of phlD from 2,4- diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol.* 91: 35–43.

**Mc Auliffe O., Hill C. 2001a.** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Review.* 25: 285-308.

**Mc Clelland M., Sanderson K.E., Spieth J., Clifton S.W., Courtney P.L., Porwollik S., Ah J., Dante M., Du F., Layman D., Leonard S., Nguyen C., Scott K., Holmes A., Grewald N., Ryan E.E., Sun H., Florea L., Miller W., Stoneking T., Nhan M., Waterston R., Wilson R.K., 2001.** Séquence complète du génome de *Salmonella enterica typhimurium* LT2 sérovar. *Nature.*

**Mead P.S., Slutsker L. 1999.** Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5 (5): 607-625.

**Mehta A.M., Patel K.A., Dave P.J. 1984.** Purification and some properties of an inhibitory protein isolated from *Lactobacillus acidophilus* AR1. *Milchwissenschaft* 39: 86-89.

**Merino L.A., Hrenuk G.E., Alonso J.M., Ronconi M.C. 2000.** Interêt de l'antibiotypie et la bactériocinotypie pour différencier les souches de *Shigella* isolées en Argentine. *Manuscrit n° 2166 « Bactériologie ».*

**Millemann Y. 2005.** Gastro-entérites néonatales du veau: conduite à tenir. *Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique de pathologie du Bétail, 10p.*

**Moreno M.R.F., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. 2006.** The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106, 1–24.

**Moretro T., Aasen I.M., Storro I., Axelsson L. 2000.** Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. *J Appl Microbiol.* 88: 536-545.

**Morgan S.M., O'connor P.M., Cotter P.D., Ross 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.

**Mullie C., Odou M.F., Singer E., Romond M.B., Izard D. 2003.** Multiplex PCR using 16S r RNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 222 (1): 36-129.

## N

**Nahäisi M.H. 1986.** *Lactobacillus acidophilus*: therapeutic properties, products and enumeration. *Int: Developments in food microbiology-2. Appl. Sci.*, 6: 153-178.

**Nel H.A., Bauer R., Vandamme E.J., Dicks L.M. 2001.** Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 1131-1138.

**Nes I.F., Diep D.B., Havarstein L.S., Brurberg M.B., Eijsink V., Holo H. 1996.** Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 70, 2-4, 113-28.

**Netz D.J., Bastos Mdo C., Sahl H.G. 2002.** Mode of action of the antimicrobial peptide aureocin A53 from *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology.* 68, 11, 5274-80.

**Nigutova K., Morovsky M., Pristas P., Teather R.M., Holo H., Javorsky P. 2007.** Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram-positive cocci. *J. Appl. Microbiol.* 102(2): 563-569.

**Nilsen T., Nes I.F., Holo H. 2003.** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology.* 69, 5, 2975-84.

**Noonpakdee W., Santivarangkna C., Jumriangrit P., Sonomoto K., Panyim S. 2003.** Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 81: 137-145.

**Novel G. 1993.** Les bactéries lactiques. In Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel, eds. J. Y. Leveau et M. Bouix. Tec et Doc. Lavoisier, Paris; 1-11.

### O

**Orberg P.R., Sandine W.E. 1984.** Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* spp. Appl. Environ. Microbiol., 48, 1129-1133.

**Ogier J.C., Casalta E., Farrokh C., Saïhi A. 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. Int. J. Food Microbiol. 126: 286-290.

**Onda T., Yanagida F., Tsuji M., Shinohara T., Yokotsuka K. 2003.** Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. Int. J. Food Microbiol., 2003, 87(1-2), 153-159.

**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.

**Orla-Jensen S. 1919.** The Lactic Acid Bacteria. Copenhagen: Host and Son.

**Oscàriz L.C., Pisabarro A.G. 2001.** "Classification and mode of action of membrane active bacteriocins produced by gram-positive bacteria" Int. Microbiol. 14: 13-9.

**O'Sullivan L., Ross R.P., Hill C. 2003.** Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie. 84: 593-604.

**Ouwehand A.C., Vesterlund S. 2004.** Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S., Ouwehand A., Von Wright A. (eds.). Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects, 3<sup>rd</sup> ed. Marcel Dekker, New York. 375-395.

**Ouwehand A.C., Vesterlund S. 2003.** Health aspects of probiotics. Drugs, 6, 573-580.

**Oyetayo V.O., Adetuyi F.C., Akinyosoye F.A. 2003.** Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent *in vivo*. Afr. J. Biotechnol., 2, 448-452.

### P

**Paik H.D., Bae S.S., Park S.H., Pan J.G. 1997.** Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. J. Ind. Microbiol. Biot. 19: 294-298.

**Papagianni M. 2003.** Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv.*, 21(6): 465-499.

**Papagianni M., Avramidis N., Filioussis G. 2007.** High efficiency electrotransformation of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* cells pretreated with lithium acetate and dithiothreitol, *BMC Biotechnologie*, 7: 15.

**Parente E., Ricciardi A. 1999.** Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 628-638.

**Parente E., Moles M., Ricciardi A. 1996.** Leucocin F10, a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*. *International Journal of Food Microbiology*. 33, 2-3, 231-43.

**Parente E., Ricciardi A., Addario G. 1994.** Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, 41 (4), 388-394.

**Parkhill J., Dougan G., James K.D., Thompson N.R., Pickard D., Wain C., Churcher K., Mungali S.D., Bentley, Holden M.T.G., Sebahia M., Baker S., Bashman D., Brooks K., Chillingworth T., Connerton P., Cronin A., Davis P., Davies R.M., Dowd L., White N., Farrar J., Fettwell T., Hamlin N., Haque A., Hien T.T., Holroyd S., Jagels K., Krogh A., Larsen T.S., Leather S., Moule S., O'Gaora P., Parry C., Quail M., Rutherford K., Siinmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., Barrell B.G., 2001.** Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar *typhi* CT 18. *Nature* 413:848-852.

**Patton G.C., Van Der Donk W.A. 2005.** New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:543-551.

**Peirson M.D., Guan T.Y., Holley R.A. 2003.** Aerococci and carnobacteria cause discoloration in cooked cured bologna. *Food Microbiology.*, 149 - 158.

**Perelman R., Lagardere B., Gallet J. P., Durquet-Perelman C.** *Pédiatrie pratique II: Maladies infectieuses.* Edition Maloine. Paris. 1990; 2: 1313-1337.

**Piard J.C., Kuipers O.P., Rollerna H.S., Desmazeaud M.J., De Vos W.M. 1993.** Structure, organisation, and expression of the *lct* gene for lactacin 481, a novel antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 268: 16361-16368.

**Piard J.C., Desmazeaud M.J. 1992.** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72, 113-142.

**Piard J.C., Muriana P.M., Desmazeaud M.J., Klaenhammer T.R. 1992.** Purification and partial characterization of lactacin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced

by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. Applied and Environmental Microbiology. 58, 279-284.

**Piard J.C., Desmazeand M. 1991.** Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part *L. oxygen* metabolites and catabolism end- products. Lait. 71: 525-541.

**Pilet M.F., Magras C., Federigh M. 2005.** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2<sup>e</sup> Ed., Economica. Paris. 219-240.

**Piraino P., Ricciardi A., Salzano G., Zotta T., Parente E. 2006.** Use of unsupervised and supervised artificial neural networks for the identification of lactic acid bacteria on the basis of sds-page patterns of whole cell proteins. Journal Of Microbiological Methods. Vol. 66, 336-346.

**Pitt T.L., Gaston A.M. 1995.** Bacteriocin typing. Methods in molecular biology. Edited by Haward, J. et Whitecombe, D.M. Edition: Human press.Inc. Totowa, New Jersey (NJ). 46: 5-14.

**Podolak P.K., Zayas J.F., Kastner C.L., Fung D.Y.C. 1996.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. J. Food Prot. 59: 370-373.

**Popoff M.Y. 2001.** Antigenic Formulas of the Salmonella Serovars. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Pasteur Institute, Paris, France.

**Popoff M.Y., Bockemuhl J. 2004.** Supplement 2002 to the Kauffmann-White scheme, Res. Microbiol., 155(7), 568-570.

**Popoff M.Y., Bockemuhl J., Mcwhorter-Murlin A. 1994.** World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Unite des Enterobacteries, U389 INSERM, Institute Pasteur, Paris. Res. Microbiol. 145, 711–716.

**Pot B. 2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu G., and Luquet F.M. (Eds). Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Lavoisier. Paris, France pp 1–152.

**Pot B., Devriese L.A., Uris D., Vandamme P., Haesebrouck F., Kersters K. 1996.** Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. Syst. Appl. Microbiol. 19: 213-222.

**Pritchard G.C., Coolbear T. 1993.** The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. FEMS. Microbiol. Rev. 12: 179-206.

Q

**Quadri L.E., Sailer M., Roy K.L., Vederas J.C. Stiles M.E. 1994.** Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *Journal of Biological Chemistry*. 269, 16, 12204-11.

R

**Ramnath M., Arous S., Gravesen A., Hastings J.W, Hechard Y. 2004.** Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 150: 2663-2668.

**Ramnath M., Beukes M., Tamura K., Hastings J.W. 2002.** Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase System enzyme IIAB component in a Leucocin. A resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polycarylamide gel electrophoresis. *Applied and Environnement Microbiology*. 66: 3098-3101.

**Randazzo C., Vaughan E., Caggia C. 2006.** Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: Microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 109: 1-8.

**Rantsiou K., Comi G., Cocolin L. 2004.** The R<sub>pob</sub> Gene As A Target For Pcr-Dgge Analysis To Follow Lactic Acid Bacterial Population Dynamics During Food Fermentations. *Food Microbiology.*, Vol. 21, 481-487.

**Richard C., Canon 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(2): 175-183.

**Riley M.A., Wertz J.E. 2002.** Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 117-137.

**Rincé A., Dufour A., Le Pogam S., Thuault D., Bourgeois C.M., Le Pennec J.P. 1994.** Cloning, expression and nudeotide sequence of genes involved in production of lactococcin DR, a bacteriocin from *Lnctococcus lactis* ssp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1652-1657.

**Robin J.M., Rouchy A. 2001.** Les probiotiques. CEDN. Nutrithérapie. Info.1-4.

**Rodriguez J.M., Martinez M.I., Horn N., Dodd H.M. 2003.** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 80, 2, 101-16.

**Rodriguez J.M., Martinez M.I., Kok J. 2002.** Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nul*, 42: 91-121.

**Roos S., Jonsson H. 2002.** A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology (Reading, United Kingdom)* 148: 433-442.

**Rossetti L., Giraffa G. 2005.** Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods.*, vol. 63, 135-144.

**Ruhr E., Sahl H.G. 1985.** Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 27, 5, 841-5.

**Ruiz-Moyano S., Martin A., Benito M.J., Nevado F.P., Cordoba M.G. 2008.** Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science.*, In Press, Corrected Proof.

**Ryan M.P., Meaney W.J., Ross R.P., Hill C. 1998.** Evaluation of lactocin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Applied and Environnement Microbiology*. 64: 2287-2290.

**Ryan M.P., Rea M.C., Hill C., Ross R.P. 1996.** An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lactocin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 612-619

## S

**Sabia C., De Niederhäusern S., Messi P., Manicardi G., Bondi M. 2003.** Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages ("cacciatore"). *International Journal of Food Microbiology*. vol. 87, 173-179.

**Sabia C., Manicardi G., Messi P., De Niederhäusern S., Bondi M. 2002.** Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 75, 163-170.

**Sable S., Pons A.N., Gendron-Gaillard S., Cottenceau G. 2000.** Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Environ. Microbiol.* 66(10): 4595-4597.

**Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E., Prevost H., Kihal M. 2002.** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides* 1: 01-11.

**Saidi N., Hadadji M., Guessas B. 2011.** Screening of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from West Algerian Goat's Milk. *Global J. Biotechnol. Bioch.* 6 (3): 154-16.

**Salmonellose H., Hartwick H., Gerber. 2002.** p. 425-428 in *Les Maladies du Cheval* H.JWINTZER 1989, Salmonellosis, Michael J. Marray p.940-943 in *5- Minute Veterinary Consult* C. Brown, J. Bertone.

**Samaržija D., Antumac N., Havranek J.L. 2001.** Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis* a review. *Mljekarstvo* 51: 1: 35-48.

**Sansonetti P.J. 1992.** Physiopathologie de l'infection intestinale par les salmonelles, *Rev. Prat*, 42, 2263-2267.

**Santos R.L., Zhang S., Tsois R.M., Baumler A.J., Adams L.G. 2002.** Morphologic and molecular characterization of *Salmonella typhimurium* infection in neonatal calves, *Vet. Pathol*; 39(2), 200-215.

**Savadogo A., Quattara Cheik A.T., Bassole Imael H.N., Traore S.A. 2006.** Bacteriocins and lactic acid Bacteria. *African Journal of biotechnology*. vol.5 (9): 678 – 683.

**Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. 2006.** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71: 394-406.

**Schelcher F., Valarcher J.F. 1997.** Physiopathologie des salmonelloses bovines, *Bull. GTV*; 2, 25-30.

**Schillinger U., Guigas C., Holzapfel W.H. 2005.** *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int. Dairy. J.* 12: 1289-1297.

**Schillinger U., Lücke K. 1989.** Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.

**Schleifer K.H. 1987.** Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters*. 46: 201-203.

**Schneider R., Fernandez F.J., Aguilar M.B., Guerrero-Legarreta I., Alpuche-Solis A., Ponce-Alquicira E. 2006.** Partial characterization of a class IIa pediocin produced by *Pediococcus parvulus* 133 strain isolated from meat (Mexican "chorizo"). *Food Control.*, vol. 17, 909-915.

**Schultz M., Veltkamp C., Dieleman L.A., Grenther W.B., Wyrick P.B., Tonkonogy S.L., Sartor R.B. 2002.** *Lactobacillus plantarum* 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10- deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 8 :71-80.

**Sebti I. 2002.** Bio-emballage actif incorporant la Nisine, diffusion de cette bactériocine en gel d'agarose. Thèse Doctorat. Université Bordeaux I. France.

**Settanni L., Corsetti A. 2008.** Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. Elsevier. *International Journal of Food Microbiology*. 121: 123–138.

**Shaffer Marjorie.** Is Your Child Safe From Salmonella? *Medscape Health for Consumers*, février 2000.

**Shea J.E., Hensel M., Gleeson C., Holden D.W. 1996.** Identification of a virulence locus encoding a second type? secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2593-2597.

**Sherwitz M.E., Feher A.V., Cintas L.M. 1986.** Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thurengiensis*. *J. Invert. Pathol.*, 53: 206-216.

**Silva A.M., Bambirra E.A., Oliveira A.L., Souza P.P., Gomes D.A., Vieira E.C. 1999.** Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp *typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol*; 86:331-6.

**Simpson W.J., Taguchi H. 1995.** The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Wood B.J.B., Holzapfel W.H. Chapman & Hall, London., 125 - 172.

**Sperber W.H., Swan J. 1976.** Hot-loop test for the determination of carbon dioxide production from glucose by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 990-991.

**Steen M.T., Chung Y.J., Hansen J.N. 1991.** Characterization of the nisin gene as part of a polycistronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC 11434. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1181-1188.

**Stevens K.A., Klapes N.A., Sheldon B.W., Klaenhammer T.R. 1992.** Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutants. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 5, 1786-8.

**Stiles M.E., Holzapfel W. 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36(1), 1-29.

**Strus M., Cosiewski T., Kochan P., Heczko P.B. 2005.** The *in vitro* effect of Hydrogen proxide on vaginal microbial. 48: 56-63.

**Sutra L., Federighi M., Jouve J.L. 1998.** Manuel de bactériologie alimentaire. Ed: Polytechnica, Paris, 308(6): 31-249.

**Suzuki M., Yamamoto T., Kawai Y., Inoue N., Yamazaki K. 2005.** Mode of action of piscicocin CS526 produced by *Carnobacterium piscicola* CS526. Applied Microbiology. 98: 1146-1151.

**Swaminathan B., Gerner-Smidt P. 2007.** The epidemiology of human listeriosis. Microbes Infect. Aug; 9(10):1236-43.

## T

**Tabak S., Medouakh L., Adda M., Chekroun A., Krantar K., Bensoltane A. 2007.** Interaction between *Helicobacter pylori* responsible for diseases gastro-duodenal and Bifidobacteria. Egypt. J. App. Sci., 22: 72-83.

**Tabasco R., García-Cayuela T., Peláez C., Requena T. 2009.** *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. Int. J. Food. Microbiol., 132: 109-116.

**Tagg J.R., Da jani A.S., Wannamaker L.W. 1976.** Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40: 722-756.

**Tagg J.R., Mc Given A.R. 1971.** Appl. Microbiol. 21: 943.

**Tahara T., Kanatani K. 1996.** Isolation, partial characterisation and mode of action of andocin J 1269, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. J. Appl. Bacteriol, 81: 669–677.

**Tahara T., Oshimura M., Umezawa C., Kanatani K. 1996.** Isolation, partial characterization, and mode of action of Acidocin J1132, a two- component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. Applied and Environmental Microbiology. 62, 3, 892-7.

**Tamime A.Y. 2002.** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3<sup>e</sup> Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.

**Tamime A.Y., Robinson R.K. 1999.** Yoghurt: science and technology. Woodhead, Cambridge.

**Teixeira L.M., Carvalho M.G.S., Facklam R.R. 1999.** *Vagococcus*. In Encyclopedia of Food Microbiology. Robinson R.K. Oxford, Elsevier. 2215-2220.

**Ten Brink B., Minekus M., Van Der Vossen J.M.B.M., Leer R.J., Huis in't Veld J.H.J. 1994.** Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and

## Références bibliographiques

optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. J Appl Bacteriol. 77, 140-148.

**Terzaghi B.E., Sandine W.E. 1975.** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol. 29: 807-813.

**Teuber M., Geis A. 2006.** The genus *Lactococcus*. *Prokaryotes* 4: 205-228.

**Thomas D. 1973.** Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the other bacteria. N. Z. J. Dairy. Sci. Technol. 8: 70-71.

**Thompson J.K., Collin M.A., Mercer W.D. 1996.** Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ 450. J. Appl. Bacterol; 80, 338-348.

**Todorov S.D., Dicks L.M. 2004.** Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. J. Basic Microbiol., 44: 305-316.

**Tosukhowong A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D., Sonomoto K. 2005.** Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. J. Biosci. Bioengin. 99: 30-37.

**Trias R., Badosa E., Montesinos E., Baneras L. 2008.** Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. Int J Food Microbiol. 127: 91-98.

**Twomey D., Ryan M., Meaney B., Hill C. 2002.** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. Antonie van Leeuwenhoek., 82: 165-185.

## U

**Upreti G.C., Hinsdill R.D. 1973.** Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrob. Agents Chemother. 7: 145-149.

## V

**Vadyvaloo V., Snoep J.L., Hasting J.W., Rautenbach M. 2004.** Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *L. monocytogenes* strains. Microbiology, 150: 335-340.

**Van Belkum M.J., Kok J., Venema G. 1992.** Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of ZcnB, a third bacteriocin determinant from lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 972-577

**Vandamme P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Keresters K., Swings J. 1996.** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* 60: 407.

**Van Laak R.L.M.J., Schillinger U., Holzapfel W. 1992.** Characterization and partial purification of bacteriocin produced *Leuconostoc carnosum* LA 44A. *Int. J. Food. Microbiol.*, 57: 114-121.

**Van Niel C.W., Feudtner C., Garrison M.N., Charistakis D.A. 2002.** *Lactobacillus therapy* for acute infectious diarrhoea in children: a meta analysis. *Pediatrics*, 109: 678-684.

**Verluyten J., Leroy F., De Vuyst L. 2004.** Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 5081-5088.

**Veselova M.A., Klein Sh., Bass I.A., Lipasova V.A., Metlitskaya A.Z., Ovadis M.I., Chernin L.S., Khmel I.A. 2008.** Quorum Sensing Systems of Regulation, Synthesis of Phenazine Antibiotics, and Antifungal Activity in Rhizospheric Bacterium *Pseudomonas chlororaphis* 449. *Rus. J. Gen.* 44(12): 1400–1408.

**Vinod Kumar J., Somesh S., Neerja S. 2006.** Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables. *Food technology and Biotechnology*, 44 (3): 435- 439.

**Vizoso Pinto M.G., Franz C.M.A.P., Schillinger U., Holzapfel W.H. 2006.** *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 205-214.

**Vollenweider S. 2004.** 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.* 64: 16-27.

## W

**Waite B.L., Siragusa G.R., Hutkins R.W. 1998b.** Bacteriocin inhibition of two glucose transport systems in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology.* 84, 5, 715-21.

## Références bibliographiques

**Wang C.Y., Lin P.R. Ng C.C., Shyu Y.T. 2010.** Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*. 16: 578-585.

**Wang M., Wu M., Huo H. 2007.** Life- cycle energy and greenhouse gas emission impacts of different corn ethanol plant types. *Environmental Research Letters* 2: 1-13.

**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. 2006.** 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. *Molecular Microbiology*. 61(2): 285-296.

**Wiedemann I., Breukink E., Van Kraaij C., Kuipers O.P., Bierbaum G., De Kruijff B., Sahl H.G. 2001.** Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 3, 1772-9.

**Wilmes-Reisinberg M.R., Bearson B., Foster J.W., Curtiss R. 1996.** Role of acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect.Immun.* 1085-1092.

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

**Winkowski K., Ludescher R.D., Montville T.J. 1996.** Physiochemical characterization of the nisin-membrane interaction with liposomes derived from *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 2, 323-7.

**Winkowski K., Bruno M.E., Montville T.J. 1994.** Correlation of bioenergetic parameters with cell death in *Listeria monocytogenes* cells exposed to nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 11, 4186-8.

**Wong H.C., Chen Y.L. 1988.** Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth And germination of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2179-2184.

**Worobo R.W., Henkel T., Sailer M., Roy K.L., Vederas J.C. Stiles M.E. 1994.** Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology*. 140 (Pt 3), 517-26.

**Wouters J.T.M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J., Smit G. 2002.** Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12: 91-109.

**Wray C., Wray A. 2000.** *Salmonella in Domestic Animals*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

[www.bioweb.usu.edu](http://www.bioweb.usu.edu)

## X

**Xiraphi N., Georgalaki M., Rantsiou K., Cocolin L., Tsakalidou E., Drosinos E.H. 2008.** Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. Elsevier. Meat Science. 80: 194-203.

## Y

**Yan L.Z., Gibbs A.C., Stiles M.E., Wishart D.S., Vederas J.C. 2000.** Analogues of bacteriocins: antimicrobial specificity and interactions of leucocin A with its enantiomer, carnobacteriocin B2, and truncated derivatives. Journal of Medicinal Chemistry. 43, 24, 4579-81.

**Yang R., Ray B. 1994.** Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiol. 11: 281-291.

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

**Yrlid U.Y. 2001.** *In vivo* activation of dendritic cells ad T cells during Salmonella enterica serovar Typhimurium infection, Infect. Immun, 69, 5726-5735.

## Z

**Zadi Karam H., Karam N.E. 2006.** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. Tropicultura, 24, 3, 153-156.

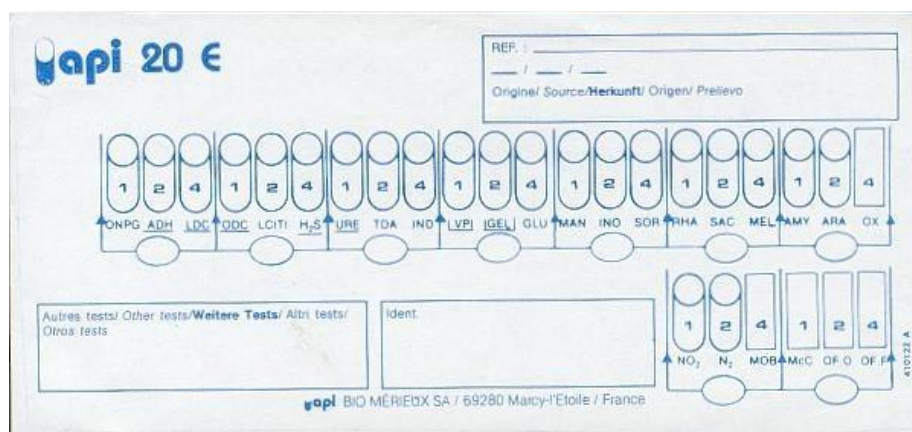
**Zago M., Fornasari M. E., Carminati D., Burns P., Suarez V., Vinderola G., Reinheimer J., Giraffa G. 2011.** Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. Food Microbiol. 28: 1033- 1040.

**Zajdel J.K., Ceglowski P., Dobrazanski W.T. 1985.** Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris* 202. Applied and Environmental Microbiology. 49, 4, 969-74.

**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.

# **Annexe**

## ANNEXE



**Figure 60:** Lecture selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20<sup>E</sup>.

**Tableau 20:** Tableau d'identification par galerie Api 20<sup>E</sup> (Source BioMérieux, 2006)

Tests	Composants actifs	QTE	Réactions/Enzymes	Résultats	
				Négatif	Positif
ONP G	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	B-galactosidase (orthoNitroPhényl- βD-	Incolore	Jaune (1)
ADH	L-arginine	1,9	Arginine dihydrolase	jaune	rouge/orange (2)
LDC	L-lysine	1,9	Lysine décarboxylase	jaune	rouge/orange (2)
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine décarboxylase	jaune	rouge/orange (2)
	Trisodium citrate	0,756	Utilisation du citrate	vert pâle/jaune	bleu-vert/bleu (3)
H <sub>2</sub> S	Sodium thiosulfate	0,075	Production d' H <sub>2</sub> S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir / fin
URE	Urée	0,76	Urease	jaune	rouge/orange (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane Désaminase	Jaune	Marron-rougeatre
IND	L-tryptophane	0,19	Production d'indole	vert pâle/jaune	rose
VP	Sodium pyruvate	1,9	Production d'acétoïne (voies Proskauer)	VP1 + VP2 / 10 min. incolore	Rose / rouge (5)
GEL	Gélatine (origine	0,6	Gélatinase (gelatine)	Non diffusion	Diffusion du
GLU	D-glucose	1,9	Fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune / jaune-gris
MAN	D-mannitol	1,9	Fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	Fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	Fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	Fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	Fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	Fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	Fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	Fermentation/oxydation	bleu / bleu-vert	jaune

(1) Une très légère couleur est également positive.

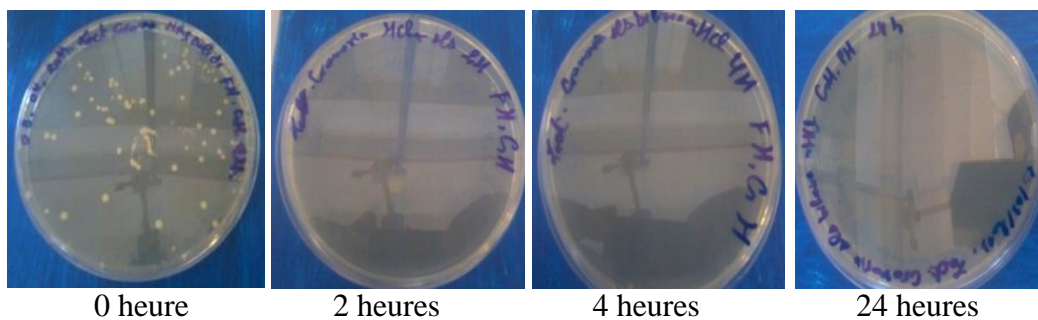
(2) Une couleur orange apparaissant après 36-48 heures d'incubation doit être considérée

négative.

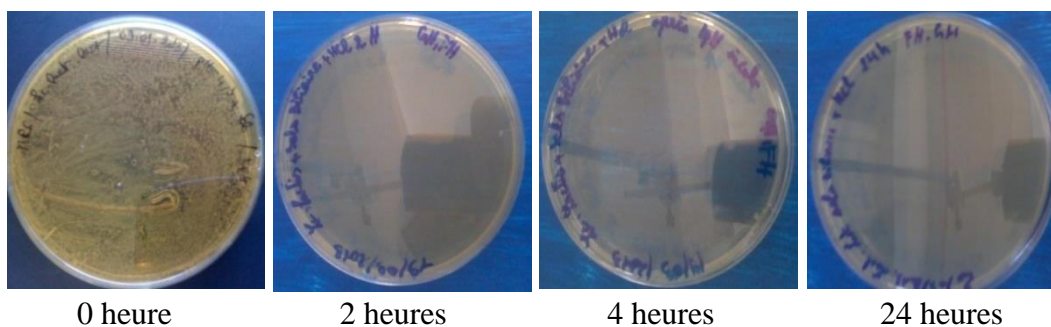
(3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).

(4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.

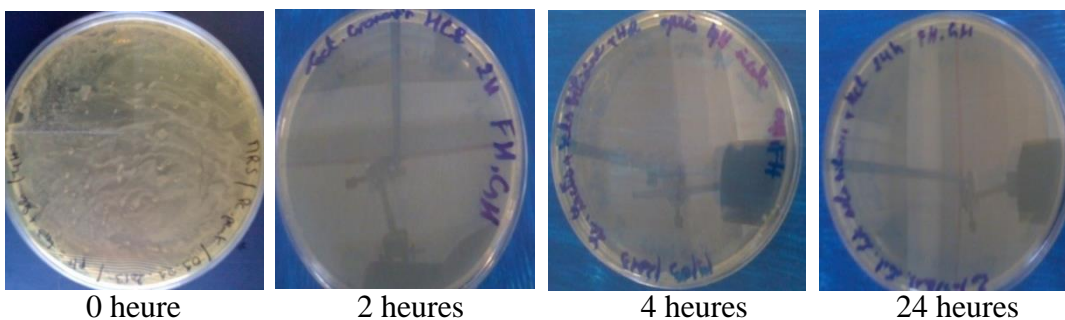
(5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.



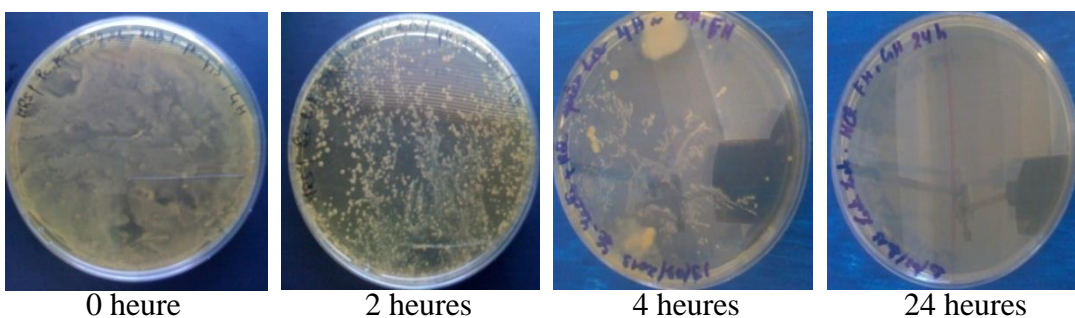
**Figure 61:** Effet de 0,3% sels biliaire sur la croissance de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*.



**Figure 62:** Effet de 0,3% sels biliaire sur la croissance de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427.



**Figure 63:** Effet de 0,3% sels biliaire sur la croissance de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*.



**Figure 64:** Effet de 0,3% sels biliaire sur la croissance de *Leuconostoc* sp.

**Le taux de survie**

Nous avons pu noter les taux de survie comme suit :

- *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CNRZ 1427:

Taux de survie (%) = 100% (0 heure)

Taux de survie (%) = 38.43% (2 heures)

Taux de survie (%) = 38.43% (4 heures)

Taux de survie (%) = 38.43% (24 heures)

- *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* :

Taux de survie (%) = 100% (0 heure)

Taux de survie (%) = 52,69% (2 heures)

Taux de survie (%) = 52,69% (4 heures)

Taux de survie (%) = 52,69% (24 heures)

- *Leuconostoc* sp :

Taux de survie (%) = 100% (0 heure)

Taux de survie (%) = 28.30% (2 heures)

Taux de survie (%) = 28.00% (4 heures)

Taux de survie (%) = 28.43% (24 heures)

- *Lactobacillus plantarum* :

Taux de survie (%) = 100% (0 heure)

Taux de survie (%) = 48.30% (2 heures)

Taux de survie (%) = 48.20% (4 heures)

Taux de survie (%) = 48.33% (24 heures)

- *Lactococcus lactis* subsp *lactis* :

Taux de survie (%) = 100% (0 heure)

Taux de survie (%) = 91,26% (2 heures)

Taux de survie (%) = 71,95% (4 heures)

Taux de survie (%) = 37,29% (24 heures)

**Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)****Milieu de base**

Peptone tryptique de caséine	2,50g
Peptone pepsique de viande	2,50g
Peptone papainique de soja	5,00g
Extrait de levure	2,50g
Extrait de viande	5,00g
$\beta$ -disodium glycérophosphate	19,00g
Sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ )	0,25g
Acide ascorbique	0,50g
Agar-agar	18,00g
Eau distillée (qsp)	950,00ml
pH=7,2	

Répartir à raison de 95ml par fiole de 125 ml. Stérilisation à l'autoclave: 120°C pendant 20 minutes.

**Milieu MRS (De Man ; Rogosa et Sharpe, 1960)**

Extrait de levure	4,00g
Extrait de viande	8,00g
Peptone	10,00g
Acétate de sodium	5,00g
Citrate d'ammonium	2,00g
Glucose	20,00g
Phosphate dipotassique ( $K_2HPO_4$ )	2,00g
Sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ )	0,25g
Sulfate de manganèse ( $MnSO_4$ )	0,05g
Tween 80	1,00ml
Agar-agar	18,00g
Eau distillée (qsp)	1000,00ml
pH=6,8	

Stérilisation à l'autoclave: 120°C pendant 20 minutes.

- Pour les *Leuconostoc* sp milieu MRS sans le citrate et l'extrait de viande.
- Pour les lactobacilles milieu MRS acidifié pH=5,4 ajusté avec l'acide acétique concentré.
- Pour les leuconostokes et les pediocokes milieu MRS additionné de  $30\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de la vancomycine (inhibition des entérocoques, les streptocoques et les lactocoques).
- Pour les leuconostokes milieu MRS additionné de  $0,12\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de la tetracycline (inhibition des streptocoques).

### Milieu Clark et Lubs

Peptone	6,00g
Glucose	5,00g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,00g
Eau distillée q.s.p	1000,00 ml
pH=7	

Stérilisation à l'autoclave: 120°C pendant 15 minutes.

### La réaction de Voges Proskauer (VP) :

Ajouter 10 gouttes de VP<sub>1</sub> et le même volume de VP<sub>2</sub> ; incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation ; attendre quelques min à 1 heure.

Réactif VP<sub>1</sub>:  $\alpha$ -naphtol (6g)+100ml alcool éthylique à 60% (conserver en flacon opaque au réfrigérateur).

Réactif VP<sub>2</sub>: la soude concentrée (ou de potasse).

### Galerie de Sherman

#### **Bouillon hypersalé**

Glucose	5,00g
Extrait de viande	5,00g
Peptone	15,00g
NaCl (25 ou 40 ou 65 ou 180g)	....g
Eau distillée (qsp)	1000,00ml
pH=7,5	

Stérilisation à l'autoclave: 120°C pendant 20 minutes.

**Bouillon à pH 9,6**

Glucose	5,00g
Extrait de viande	5,00g
Peptone	15,00g
Eau distillée (qsp)	1000,00ml
pH=9,6	

Stérilisation à l'autoclave: 120°C pendant 20 minutes.

# Publication