



DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BELHADJ Zahira

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Microbiologie appliquée

THÈME

*Exploration de l'activité anti-bactérienne de
certaines souches probiotiques isolées à partir
du poisson.*

Soutenu publiquement le 31/08/2020

DEVANT LE JURY

Président	Mr Y. ZABOURI	Grade	MAA	U. Mostaganem
Encadreur	Melle I. YAHLA	Grade	MCB	U. Mostaganem
Examineur	Mme N. KOUADRI BOUDJELTHIA	Grade	MAA	U. Mostaganem

Thème réalisé à L'Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.

Remerciements

Au début et avant tout, mes remerciements et louanges à Dieu le tout puissant, de m'avoir donné le courage et la santé pour finaliser ce modeste travail

*Je tiens à adresser mes remerciements en particulier à mon encadreur **Dr. YAHLA Imene** d'avoir accepté de diriger mon mémoire, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience durant la correction de ce mémoire.*

*Je tiens à remercier également **Mr ZABOURI Younes** d'avoir accepté de présider mes jury, et **Mme KOUADRI BOUDJELTHIA Nacima** d'avoir accepté d'examiner mon mémoire.*

*Pour finir, j'aimerais exprimer ma gratitude et mes remerciements à **Pr. MOHAMED RIAD**, le responsable pédagogique du centre de simulation médicale de la faculté de médecine Mostaganem, ainsi à toute l'équipe du centre pour leur soutien inconditionnel et encouragements durant mon parcours.*

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à

La mémoire de mon cher père, l'homme qui m'a appris à avancer dans la vie sans rien craindre, son amour m'a donné la force, je ne pourrais jamais lui remercier assez pour tout ce qu'il a fait pour moi. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !

A ma très chère mère, la femme exemplaire, la source de tendresse et de douceur qui n'a jamais cessé de m'encourager et de prier pour moi, c'est grâce à ses sacrifices qui ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui, j'en serai éternellement reconnaissante

A mes chers frère et sœur pour leur soutien infaillible, je leur souhaite tout le bonheur du monde

A toute la famille Belhadj

A mes chères amies que j'aime énormément

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin, Merci.

Résumé

Cette étude vise à explorer l'activité antibactérienne des bactéries lactiques à potentiel probiotique vis-à-vis des bactéries d'altération.

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de lait fermenté traditionnel, Raib. Après leur isolement, caractérisation et identification par des méthodes physiologiques, biochimiques et technologiques, Les souches ont été évaluées pour leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis les germes pathogènes par différentes méthodes : méthode de disques, la méthode des spots et la méthode de diffusion sur gélose. Les résultats ont montré que l'activité antagoniste des bactéries lactiques par la méthode des disques et la méthode des spots est plus forte contre les bactéries à Gram négatif, tandis qu'avec la méthode de diffusion sur gélose présente un large spectre inhibiteur contre les bactéries à Gram positive.

Mots clés : bactéries lactiques, souches pathogènes, probiotiques, activité anti-bactérienne.

Abstract

This study aims to explore the antibacterial activity of lactic acid bacteria with probiotic potential against pathogens.

The bacterial strains used in this study were isolated from traditional fermented milk, Raib. After their isolation, characterization and identification by physiological, biochemical and technological methods, the strains were evaluated for their antimicrobial property against pathogenic germs by different methods : disc method, the spot-on-lawn method and the agar diffusion method. The results showed that the antagonist activity of lactic acid bacteria by the disc and spot-on-lawn methods is stronger against Gram-negative bacteria, while with the agar diffusion method shows a large inhibitory spectrum against Gram-positive bacteria.

Key words : lactic acid bacteria, pathogenic strains, probiotics, anti-bacterial activity,

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى استكشاف النشاط المضاد لبكتيريا حمض اللاكتيك ذات إمكانات البروبيوتيك مقابل البكتيريا الممرضة.

تم عزل السلالات البكتيرية المستخدمة في هذه الدراسة من لبن الرايب التقليدي. بعد عزلها وتوصيفها وتعريفها بالطرق الفسيولوجية والكيميائية الحيوية والتكنولوجية، تم تقييم السلالات من حيث قدرتها المثبطة ضد الجراثيم المسببة للأمراض بطرق مختلفة: طريقة القرص وطريقة البقع وطريقة الانتشار على الأجار. أظهرت النتائج أن النشاط المضاد لبكتيريا حمض اللاكتيك بطريقة القرص وطريقة البقع أقوى ضد البكتيريا سالبة الجرام، بينما أظهرت طريقة انتشار على الأجار طيفاً مثبطاً واسعاً ضد البكتيريا موجبة الجرام.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك، السلالات الممرضة، البروبيوتيك، النشاط المضاد للبكتيريا.

Liste des abréviations

- **ADN** : Acide DésoxyriboNucleique
- **API 20/ API 50** : Appareils et Procédés d'Identification
- **ARN** : Acide RiboNucleique
- **BHI** : Brain Heart Infusion
- **CO₂** : Dioxyde de carbone
- **EPEC** : Entéro-pathogéniques *Escherichia Coli*
- **FAO** : Food and Agriculture Organization
- **GC** : Guanine Cytosine
- **IgA** : ImmunoGlobulines A
- **IgG** : ImmunoGlobulines G
- **MH** : Mueller Hinton
- **MO** : Micro-Organismes
- **MRS** : Man Rogosa et Sharp
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **pH** : Potentiel d'Hydrogène
- **PSS** : Solution Saline Physiologique
- **WHO** : World Health Organization

Unités de mesures

- **cm** : Centimètre
- **g** : Gram
- **ml** : Millilitre
- **mm** : Millimètre
- **tr/min** : Tours par minutes
- **µl** : Microlitre
- **µm** : Micromètre

Noms des genres bactériens

- *Aer. Hydrophila* : *Aeromonas*
- *B.* : *Bifidobacterium*
- **BL** : Bacilles Lactiques
- *Cl.* : *Clostridium*
- *E. faecalis* : *Enterococcus*
- *E. coli* : *Escherichia Coli*
- *H.* : *Helicobacter*
- *L.* : *Lactobacillus*
- **LB** : *Lacto Bacillus*
- *P. aeruginosa* : *Pseudomonas*
- *S. aureus/ S. thermophilus* : *Staphylococcus*
- *S. cremoris* : *Streptococcus*
- *V. anguillarum* : *Vibrio*

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les différents genres de bactéries lactiques (Leveau et Bouix, 1993).....	5
Tableau 02: Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (Penaud, 2006).....	6
Tableau 03: Rôle des ferments lactiques en fromagerie (Branger <i>et al.</i> , 2007).....	7
Tableau 04: Liste des principales souches microbiennes considérées comme probiotiques. .	12
Tableau 05: Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Salminen <i>et al.</i> , 2004 ; Patterson, 2008).....	14
Tableau 09: Spectre antibactérien des surnageants acellulaire des six bactéries lactiques isolées du produit laitier traditionnel (Raib). Mezaini et al. (2009).	30

Liste des figures

Figure 01: Mécanismes d'action proposés des micro-organismes probiotiques dans le traitement des infections entériques (Chemlal, 2012).	17
Figure 02: Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière dû à l'adhésion spécifique (a) et non spécifique (b) des probiotiques. (Servin et Coconnier, 2003).	18
Figure 03: Mode d'action des acides organiques produits par les probiotiques contre les pathogènes bactériens (Servin et Coconnier, 2003)*X-COOH = CH ₃ -CHOH-COOH dans le cas de l'acide lactique ou CH ₃ COOH dans le cas de l'acide acétique.	19
Figure 04: Les différentes méthodes de détection de l'activité antibactérienne.	26

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Unités de mesures

Noms des genres bactériens

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction	1
CHAPITRE I : LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES	3
I.1. Les bactéries lactiques	3
I.1.1. Définition	3
I.1.2. Origine	4
I.1.3. Taxonomie	4
I.1.4. Effets bénéfiques des bactéries lactiques	5
I.2. Les probiotiques	10
I.2.1. Définition	10
I.2.2. Histoire	10
I.2.3. Les critères de sélection des probiotiques	11
I.2.4. Souches à fort potentiel probiotique	12
I.2.5. Application des Probiotiques	13
I.2.6. Rôle probiotique des bactéries lactiques	15

CHAPITRE II : ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES PROBIOTIQUES.....	16
II.1. Mécanismes d'action des probiotiques	16
II.1.1. Compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhésion	17
II.1.2. Production de substances antimicrobiennes.....	18
II.1.3. Compétition au niveau de l'utilisation des nutriments.....	19
II.1.4. Stimulation des mécanismes de défense immunitaire	19
II.2. Études cliniques	20
CHAPITRE III: MATERIEL ET METHODES.....	23
III.1. Matériel.....	23
III.1.1. Préparation des milieux de culture.....	23
III.1.2. Origine des souches tests.....	23
III.2. Méthodes.....	23
III.2.1. Isolement des bactéries lactiques	23
III.2.2. Détection de l'activité antibactérienne	24
CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION	27
IV.1. Activité antibactérienne.....	27
IV.1.1. Méthode des disques.....	27
IV.1.2. Méthode des spots.....	27
Conclusion.....	32
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	33
ANNEXES.....	41

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques constituent un vaste groupe dont la taxonomie est régulièrement remise à jour avec la progression des données moléculaires, elles regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique. Elles appartiennent à divers genres comme *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* et *Carnobacterium* (Labioui et al, 2005).

Les bactéries lactiques isolées à partir de produits laitiers ont reçu une attention accrue en tant que conservateurs alimentaires potentiels en raison de leur activité antagoniste contre de nombreux pathogènes d'origine alimentaire tels que *Listeria monocytogenes*. Elles sont largement répandues dans la nature, généralement impliquées dans un grand nombre de fermentations alimentaires spontanées, et elles ont été largement étudiées. Certains genres de bactéries lactiques produisent des bactériocines et des substances analogues aux bactériocines qui peuvent inhiber la croissance des micro-organismes d'altération et pathogènes (Mezaini et al, 2009).

La capacité antimicrobienne des probiotiques est un trait très important et comprend la production de composés antimicrobiens, l'exclusion compétitive des agents pathogènes, l'amélioration de la fonction de barrière intestinale et autres. Habituellement, les souches probiotiques produisent plus d'une substance antimicrobienne qui peut agir en synergie, augmentant le spectre des micro-organismes ciblés (Fijan 2016).

Les bactériocines, sont des substances protéiques produites puis excrétés à l'extérieur des cellules productrices, présentant une activité bactéricide ou bactériostatique à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altérations. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelque fois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices.

Ces substances naturelles pourraient être utilisées comme agent de conservation sous forme d'additif, soit d'inoculum bactérien producteur de bactériocines au cours du processus de fabrication, permettant ainsi de diminuer le nombre d'intoxications alimentaires et d'augmenter la durée de conservation et de commercialisation des aliments (Allouche, 2010).

INTRODUCTION

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude consiste à :

- ✓ L'isolement et la caractérisation phénotypique des bactéries lactiques à partir d'un produit laitier fermenté.
- ✓ Mettre en évidence les différentes méthodes de détection de l'activité antibactérienne et faire une revue des résultats de divers auteurs pour déterminer l'effet antagoniste de certains souches probiotiques vis-à-vis les bactéries pathogènes.

***CHAPITRE I : LES
BACTERIES
LACTIQUES ET LES
PROBIOTIQUES***

CHAPITRE I : LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

I.1. Les bactéries lactiques

Depuis l'aube de l'humanité, les bactéries lactiques sont employées pour la fabrication et la conservation d'aliments. La découverte de leur action sur le lait fût probablement accidentelle, mais leur utilisation a été perpétuée sous forme de levains.

Ces bactéries fûrent et sont encore utilisées sous forme de levains artisanaux, mais le développement de l'industrie laitière, a conduit à la production de ferments industriels capable d'assurer à la fois la qualité et la constance du produit (Carr et *al.*, 2002).

Malgré leur importance économique, les bactéries lactiques n'ont pas toujours reçu l'attention nécessaire ni de la part des microbiologistes ni de celle des industriels. Depuis quelques années, elles deviennent un sujet d'étude privilégié de part le monde (Thapa, 2005). Elles sont utilisées dans la préparation de nombreux aliments : produits laitiers (fromage, yaourts), carnés (saucissons), produits à base de poisson et de plantes (choucroute, olives fermentées, ensilage). Leur croissance s'accompagne d'une production d'acide lactique et de métabolites qui améliorent la conservation et les qualités organoleptiques des produits (Drouault et Corthier, 2001 ; Carr et *al.*, 2002). En plus de l'acide lactique, certaines produisent du gaz carbonique et divers composés, dont certains contribuent à l'arôme des produits laitiers. Leur présence dans le tractus des mammifères limite l'implantation d'agents pathogènes tout en sécrétant des substances bénéfiques pour l'hôte. En effet, un certain nombre d'études cliniques chez l'Homme ou sur des modèles animaux ont notamment confirmé l'effet bénéfique des laits fermentés et des yaourts dans le cas d'intolérance au lactose, de diarrhées virales ou de diarrhées associées à la prise d'antibiotiques (Sullivan et Nord, 2005).

I.1.1. Définition

Les bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique sont des procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes, Gram positifs généralement immobiles, en formes de bâtonnet ou coque, jamais sporulées (asporulées), catalase négatives, oxydase négatives, généralement nitrate réductase négatives. Ce sont des bactéries anaérobies mais, aérotolérantes ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas l'indole ni d'hydrogène sulfureux. Leur capacité de biosynthèse est faible, ce qui explique leur polyauxotrophie pour divers acide aminés, des bases nucléiques, des vitamines et des acides gras mais aussi leur métabolisme fermentaire, elles sont normalement dépourvues de cytochromes et en conséquence inaptés à toute respiration (Desmazeaud, 1983 ; Guiraud et *al.*, 2003).

Les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire qui, en utilisant des glucides, produisent soit exclusivement de l'acide lactique (bactéries homolactiques strictes), soit de l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives), soit de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'éthanol ou du CO₂ (bactéries hétérolactiques strictes) (Desmazeaud, 1994 ; Carr et *al.*, 2002).

I.1.2. Origine

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, et on les trouve dans différentes niches écologiques. Les espèces des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, ou *Leuconostoc* se rencontrent plutôt chez les hommes, les animaux, et les oiseaux. On peut les isoler de la peau des animaux, des matières fécales, mais aussi de l'ensilage, du foin ou des grains. Dans le domaine laitier, elles existent sur les ustensiles en quantité considérable. Certaines espèces des groupes sérologiques A et B peuvent être pathogènes, mais les autres sont plutôt saprophytes (Guiraud et *al.*, 2003).

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont répandues dans la nature. On les trouve dans les végétaux où elles assureront l'acidification de l'ensilage. On les trouve aussi dans l'intestin des animaux et de l'homme, car *Lactobacillus acidophilus* résiste aux sels biliaries. On les isole également des cavités naturelles de l'organisme. *Lactobacillus acidophilus* entre dans la flore normale du vagin, où sa présence empêche l'invasion par *Candida albicans*. Les espèces du genre *Pediococcus* se rencontrent surtout sur les plantes (Hermier et *al.*, 1992).

I.1.3. Taxonomie

La plupart des études génétiques sur les bactéries lactiques concernent les streptocoques pathogènes (*Streptococcus pneumoniae* par exemple) et les souches utilisées dans l'industrie laitière. Depuis quelques années, des études se sont développées notamment sur *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. (De Vos, 1999 ; Hugenholtz et Kleerebezem, 1999). Cependant, parmi les souches alimentaires, *Lactococcus lactis* est la bactérie la plus étudiée ; elle est de ce fait considérée comme l'espèce modèle. *Lactococcus lactis* est divisé en deux sous-espèces principales, *lactis* et *cremoris*, initialement séparées sur des bases phénotypiques (Davidson et *al.*, 1996), puis à l'aide de séquençage des gènes codant pour les ARN ribosomiques 16 S (Klinj et *al.*, 1991 ; Salama et *al.*, 1991).

Onze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. A ces genres, a été ajouté récemment le genre *Bifidobacterium* (Kandler et Weiss, 1986).

CHAPITRE I : LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

La composition de leur ADN permet de connaître l'homogénéité des espèces constituant ces genres (Tableau 01). Le pourcentage en base Guanine et Cytosine (G C%) de leur ADN montre une composition assez proche pour les genres *Streptococcus* (34-46 %), *Leuconostoc* (36-43 %) et *Pediococcus* (34-42 %) (Schleifer 1986, Farrow et al., 1989). Par contre, le genre *Lactobacillus* est caractérisé par l'hétérogénéité de ses espèces : (32-53%) (Kandler et Weiss, 1986 a, b). Le GC des *Bifidobacterium* varie de 55 à 67 % (Scardovi, 1986).

Tableau 01 : Les différents genres de bactéries lactiques (Leveau et Bouix, 1993).

	Cellules		Fermentation	ADN : GC%
	Forme	Arrangement		
<i>Streptococcus</i>	coque	chaines	homolactique	34-46
<i>Leuconostoc</i>	coque	chaines	hétérolactique	36-43
<i>Pediococcus</i>	coque	tétrades	homolactique	34-42
<i>Lactobacillus</i>	bacille	chaines	homolactique hétérolactique	32-53
<i>Bifidobacterium</i>	variée	variée	acétique et lactique	55-67

I.1.4. Effets bénéfiques des bactéries lactiques

I.1.4.1. Domaine alimentaire

I.1.4.1.1. Fermentation alimentaire

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis longtemps dans la fabrication de divers produits fermentés (Leroy et Devuyt, 2004). Elles interviennent dans la transformation de divers produits agro-alimentaires (Tableau 02), comme le lait (crème maturée, yaourt, fromage...), dans la vinification, la fabrication des salaisons, fermentation des végétaux (Hamoum, ensilage) et en boulangerie traditionnelle (Desmazeaud, 1998).

Les bactéries lactiques ont plusieurs rôles dans la production des produits fermentés. Le premier rôle, intervient dans le changement de la saveur et la texture de l'aliment, grâce à l'acide lactique sécrété par les bactéries lactiques tout au cours de leur croissance.

CHAPITRE I : LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

Les bactéries lactiques produisent ainsi des peptides et des molécules comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le diacétyle ou l'éthanol qui sont importants pour la saveur des aliments.

Tableau 02: Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques
(Penaud, 2006).

Genre	Substrat	Exemple de produit
<i>Bifidobacterium</i>	Lait	Laits fermentés
<i>Lactobacillus</i>	Lait	Yaourts, laits fermentés, kéfirs, fromages
	Viande	Saucissons secs, jambons secs
	Végétaux	Choucroutes, olive, "yaourt" au lait de soja
	Céréales	Pain au levain, bières
<i>Lactococcus</i>	Lait	Fromages, kéfirs
<i>Leuconostoc</i>	Végétaux	Choucroutes, olives, vins
	Lait	Fromages, kéfirs
<i>Pediococcus</i>	Végétaux	Choucroute
	Viande	Saucisses semi-séchées
<i>Oenococcus</i>	Végétaux	Vins
<i>Streptococcus</i>	lait	Yaourts, laits fermentés, fromages

En production laitière, la fermentation lactique joue un rôle primordial (Tableau 03), c'est-à-dire, les ferments lactiques naturels ou commerciaux interviennent dans l'élaboration de tous les produits laitiers fermentés (Pilet *et al.*, 2005). Ces ferments assurent plusieurs fonctions, telles que la protéolyse qui donne aux fromages leurs caractères rhéologiques (viscosité, plasticité et l'élasticité) et la production des agents épaississants pour améliorer la texture du fromage.

Tableau 03: Rôle des ferments lactiques en fromagerie (Branger *et al.*, 2007).

<p>Propriétés des ferments lactiques</p>	<p>Effets sur le produit</p>
<p>Transformer les sucres en acide lactique</p>	<ul style="list-style-type: none"> · Abaissement du pH · conservation des produits □ limitation du développement de bactéries nuisibles <ul style="list-style-type: none"> · modification de la micelle de caséine · Solubilisation des minéraux liés à la caséine · action sur l'égouttage des caillés (teneur en eau) <ul style="list-style-type: none"> · action sur la texture des fromages · Diminution de la concentration en lactose · production de lactate (action sur la saveur des fromages)
<p>Transformer les sucres en CO2</p>	<ul style="list-style-type: none"> · Libération de CO2 · ouverture utile en pâtes molles et pâtes persillées · ouverture nuisible en pâtes pressées

CHAPITRE I : LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

Transformer les citrates	<ul style="list-style-type: none">· Formation de diacétyl· recherché en fromages à pâte fraîche et molles
Transformer la caséine	<ul style="list-style-type: none">· Protéolyse pendant la maturation· activation de la croissance (peptides, acides aminés)· Protéolyse pendant l'affinage· modification de la texture, couleur, flaveur
Produire des polysaccharides	<ul style="list-style-type: none">· Épaississement du milieu pour les pâtes fraîches· augmentation de la viscosité par libération de· polysaccharide pendant la fermentation lactique

I.1.4.1.2. Utilisation dans la conservation

La propriété des bactéries lactiques à produire des composés antagonistes est reconnue depuis très longtemps. Par cette capacité, l'utilisation des bactéries lactiques permet de satisfaire les besoins au point de vue sanitaire en industrie alimentaire.

les bactéries lactiques, synthétisent certains métabolismes à effet antimicrobien tels que l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle (Atrih et Foster, 2001), des composés antifongiques (Lavermicocca *et al.*, 2000). Grâce a ces propriété que les bactéries lactiques sont reconnues comme de bons agent de conservation des produits alimentaires (Abee *et al.*, 1995; Rodgers, 2001).

➤ Production d'acide lactique

Issu de la fermentation lactique, cette dernière termine par une production importante d'acide lactique, ce métabolisme conduit à une acidification forte et rapide. Le pH diminue en fonction du temps, et le pH final est dépendant de la matière première, par exemple, le yaourt possède un pH entre 4 et 4.5, la choucroute 4.8, et les saucissons entre 4.6 et 5.3. Le développement de la microflore indésirable à ces valeurs sera difficile (M Federighi ,2005).

➤ Production des bactériocines

Les bactériocines sont utilisés sous forme d'aditif alimentaire (E234), ce qui minimise l'utilisation des aditifs chimiques et artificiels dans les produits alimentaires (Nykanen *et al.*, 1999).

Les bactériocines ont une activité bactéricide et/ou bactériostatique, elles représentent une large classe de substances antagonistes (Klaenhammer, 1988). Elles interviennent aussi dans la fabrication des produits alimentaires fermentés, et elles contribuent à l'amélioration du goût, de l'aspect et de l'innocuité microbiologique de l'aliment. En plus d'améliorer la saveur, la fermentation permet d'augmenter la durée de conservation du produit (Rogers, 1928 ; Rogers et Whittier, 1928).

I.1.4.2. Domaine de santé

Dans le domaine de santé, les bactéries lactiques sont utilisées comme des probiotiques, c'est-à-dire qu'elles exercent un effet bénéfique par l'amélioration de la flore intestinale de l'homme ou de l'animal. Les espèces classifiées comme probiotique sont : *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. jhonsonii*, *Lb. reteri*, *Lb. delbruecki*, *subsp bulgaricus* (Salminen *et al.*, 2004)

I.2. Les probiotiques

I.2.1. Définition

Le terme probiotique a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2006). Il a été tout d'abord défini par Lilly et Stillwell en 1965 comme : « acteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » (Lamoureux, 2000 ; Ait-Belgnaoui *et al.*, 2006). Ensuite, Parker en 1974 a défini les probiotiques comme :

« organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ». en 1989, Fuller a proposé une définition plus proche du sens actuel : « supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale ».

C'est en 2002 que la FAO (Food and Agriculture Organization) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé ; WHO) ont formulé la définition suivante : « micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère ».

I.2.2. Histoire

Il y a un siècle, Elie Metchnikoff (scientifique russe, lauréat du Nobel et professeur à l'Institut Pasteur à Paris) a suggéré que l'ingestion des bactéries lactiques offrait des bénéfices pour la santé conduisant à une plus grande longévité. Ainsi, Metchnikoff a affirmé que "l'auto intoxication intestinale" et que le vieillissement en résultant pouvait être supprimé en modifiant la flore microbienne de l'intestin et en remplaçant des microbes protéolytiques tels que *Clostridium*, par des microbes utiles, ceci explique que les paysans bulgares, grands consommateurs de laits fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé (Tannock; 2002).

Quelques années plus tard, un médecin français, Henry Tissier a isolé une bifidobactérie à partir d'un enfant nourri au sein, et il l'a appelé *Bacillus bifidus communis*. Tout en affirmant que la bifidobactérie réduirait la bactérie protéolytique qui cause la diarrhée, Tissier a suggéré qu'il y avait une possibilité d'administrer aux enfants souffrant de ce symptôme. Le terme "probiotiques" fut d'abord introduit en 1965 par Lilly et Stillwell; par contraste avec les antibiotiques (Lamoureux, 2000 ; Ait-Belgnaoui *et al.*, 2006).

I.2.3. Les critères de sélection des probiotiques

Tout d'abord, pour sélectionner un micro-organisme autant qu'un probiotique, il ne doit présenter ni toxicité ni pathogénie. D'autre part, les probiotiques doivent stimuler une réponse immunitaire (Schiffrin *et al.*, 1997) ainsi de produire des substances antimicrobiennes et de réduire l'allergie chez les sujets sensible (Gourbeye *et al.*, 2001).

La viabilité et le survie au niveau du site d'action est un critère essentiel pour la sélection des probiotiques, toutefois la capacité de résistance aux perturbations du tractus exige une résistance aux obstacles majeur comme : le pH acide, les sels biliaries, antibiotiques... (Percival, 1997 ; Lamoureux, 2000 ; Millette *et al.*, 2008).

I.2.3.1. La résistance a l'acidité gastrique

Le comportement des bactéries dans un milieu acide dépend de la souche, de ce fait il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce de la souche utilisée. A pH=2 certaines souches dévoilent une résistance qui dure en moyenne 1h30, alors que pour d'autres, après 30 minutes 1 seule bactérie résiste à partir d'un milliards (Corcoran *et al.* 2005).

I.2.3.2. La résistance aux sels biliaries

Les sels biliaries sécrètent dans le duodénum des molécules qui ont un rôle de détergent, ce qui met les bactéries devant un autre obstacle à résister après l'acidité de l'estomac. En effet, les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaries en les hydrolysant avec des hydrolases, de ce fait diminuant leur solubilité (Ammor *et Mayo*, 2007 ; Gu *et al.*, 2008).

I.2.3.3. La résistance aux antibiotiques

La structure et la physiologie de certaines bactéries leur donne le pouvoir à résister a des différents antibiotiques. 68.4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. Des souches de *Lactobacillus* ont été trouvées résistantes à la kanamycine (81%), à la tétracycline (29.5%), à l'érythromycine (12%) et au chloramphénicol (8.5%). 38% des isolats de *Enterococcus faecium* ont été trouvés résistants à la vanomycine (Temmerman *et al.*, 2003).

I.2.3.4. Critères technologiques

D'autres critères sont aussi admises aux critères de sélection des probiotiques, ces critères sont technologiques et sont : Bonnes propriétés sensorielles, Résistance aux phages, Viabilité durant le traitement technologique, Stabilité dans le produit et durant le stockage (Saarela *et al.*, 2000).

I.2.4. Souches à fort potentiel probiotique

Les principales souches reconnues en tant que probiotiques chez l'humain sont des bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et des levures du genre *Saccharomyces*. Les espèces associées à chacun de ces groupes sont présentées au (Tableau 04).

Tableau 04: Liste des principales souches microbiennes considérées comme probiotiques.

Lactobacilles	Bifidobactéries	Autres bactéries lactiques	Autres micro-organismes non lactiques
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>thermophilus</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. breve</i>		<i>cerevisiae</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. paracasei</i>	<i>lactis</i>		
<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Adapté de Holzapfel et al. (2001)

Parmi ces micro-organismes, les bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les plus fréquemment utilisées avec le plus d'applications connues à ce jour chez l'humain. À titre d'exemples, les souches commerciales de lactobacilles ayant des propriétés fonctionnelles et des effets cliniques documentés incluent *L. rhamnosus* GG, *L. casei* DN-114 001, *L. casei* Shirota et *L. reuteri* comparativement aux bifidobactéries dont la principale souche, *B. lactis* Bb12, fait l'objet de plusieurs études (Pedone et al., 2000; Alvarez-Olmos et Oberhelman, 2001; Chouraqui et al., 2004). Néanmoins, le rôle non-négligeable de certaines autres souches de bifidobactéries dans la résistance de l'hôte aux infections a été récemment décrit dans la littérature (Leahy et al., 2005; Picard et al., 2005).

I.2.5. Application des Probiotiques

I.2.5.1. Applications alimentaires

Les différents produits commercialisés en tant que probiotiques humains ou animaux sont constitués soit d'un seul microorganisme (produits dits monosouches) ou d'une association de plusieurs espèces (produits dits plurisouches). Actuellement, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formes (Patterson, 2008) :

- Un concentré de culture ajouté à des aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales ;
- Un ingrédient ajouté à un aliment à base de lait ou de soja et auquel on permet d'atteindre une concentration élevée par fermentation ;
- Des cellules séchées, concentrées, en poudre, en capsule ou en comprimés.

Utilisés pour l'enrichissement de certain yaourt et laites (Klaenhammer *et al.*, 2007). Cette utilisation est due aux effets nutritionnels et thérapeutiques de ces bactéries car elles enrichissent le milieu où elles se trouvent en vitamines B et K, acides aminés, et bactériocines responsables de l'inhibition des bactéries pathogènes (Soomro *et al.*, 2002). Les bactéries les plus fréquemment utilisées comme probiotiques sont des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* (Khan et Ansari, 2007).

I.2.5.2. Applications dans le domaine de santé

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques.

Le (Tableau 05) illustre la diversité des effets bénéfiques sur la santé :

CHAPITRE I : LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES

Tableau 05: Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Salminen *et al.*, 2004 ; Patterson, 2008).

Effets intestinaux	Effets sur le système immunitaire	Autres effets
<p>Contrôle des troubles suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> •Mauvaise digestion du lactose •Diarrhée due aux rotavirus et diarrhée associée aux antibiotiques •Syndrome du côlon irritable •Constipation •Infection par <i>Helicobacter pylori</i> •Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle •Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin •Prévention de l'entérocolite nécrosante du nouveau-né 	<ul style="list-style-type: none"> •Modulation immunitaire •Répression des réactions allergiques par réduction De l'inflammation •Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants (<i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>) 	<p>Réduction du risque de :</p> <ul style="list-style-type: none"> •Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein) •Coronaropathie •Maladie des voies urinaires •Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes •Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle

Ces micro-organismes sont impliqués dans l'amélioration de la santé intestinale et influencent positivement le développement et l'activité du système immunitaire. De nombreux effets leur sont attribués (Gareau *et al.* 2010; Gill and Prasad 2008; Moayyedi *et al.* 2010) :

- l'aide à la mal-absorption du lactose due à l'activité lactase bactérienne (Vrese *et al.* 2001)
- l'amélioration de la valeur nutritionnelle des aliments
- la protection contre les infections gastro-intestinales (diarrhée du voyageur, diarrhée infantile, diarrhée induite par antibiotiques...) (Isolauri *et al.* 1991; McFarland *et al.* 1994)
- le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Kruis *et al.* 2004; Prantera *et al.* 2002)
- la lutte contre les infections à *H. pylori* (Nista *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004)
- la stimulation du système immunitaire
- la lutte contre la constipation
- la prévention des infections uro-génitales
- la neutralisation de carcinogènes alimentaires
- la réduction du risque de maladie coronarienne (Ebel *et al.* 2012).

I.2.6. Rôle probiotique des bactéries lactiques

De nombreuses études rapportées, depuis une quinzaine d'années, montrent que les bactéries lactiques sont de plus en plus utilisées sous forme de probiotiques qui sont des préparations contenant des microorganismes et leurs métabolites, utilisés comme additifs alimentaires et qui affectent de façon bénéfique l'organisme de l'hôte (Boulloche *et al.*, 1994 ; Schaafsma, 1996). Ces bactéries présentent des propriétés prophylactiques et thérapeutiques par exemple leur activité anticholestérolémiante (Gilliland, 1985), leur action anticarcinogène (Bogdanov *et al.*, 1975), leur potentiel vaccinal (Gerritse *et al.*, 1990) et l'effet protecteur des tractus digestif (Elo *et al.*, 1991).

CHAPITRE II :
ACTIVITE
ANTIBACTERIENNE
DES PROBIOTIQUES

CHAPITRE II : ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES PROBIOTIQUES

II.1. Mécanismes d'action des probiotiques

Depuis longtemps, les consommateurs attribuent au yaourt des bénéfices sur la santé, mais il a fallu attendre les années 1970 pour découvrir progressivement le rôle joué par les bactéries lactiques vivantes du yaourt dans le tube digestif. L'introduction récente sur le marché de grande consommation de laits fermentés à base de bactéries lactiques d'origine entérique (*Bifidobacterium* et *Lactobacillus*) a encore accru l'intérêt d'une catégorie de consommateurs, plus que jamais conscients de l'influence d'une alimentation saine sur la santé (Vermeiren, 2004).

De façon générale, l'efficacité des probiotiques est liée à leur durée de présence dans le tube digestif ce qui n'implique pas forcément qu'ils puissent le coloniser ou s'y développer. Les mécanismes d'actions, bien qu'imparfaitement quantifiés sont qualitativement de plus en plus connus. Chez l'animal monogastrique, ils agissent comme des régulateurs de la flore intestinale en exerçant soit (adapté de Calder et Kew, 2002; Kaur et *al.*, 2002):

- a) un effet prophylactique (antagonisme contre certains pathogènes par production de substances antimicrobiennes ; compétition avec les pathogènes pour certains nutriments ou pour les récepteurs de la muqueuse intestinale)
- b) Et/ou un effet nutritionnel (augmentation de la digestibilité, production de nutriments favorables)
- c) et/ou un effet de détoxification (moins de production d'ammoniac, d'amines, ou de cytotoxines).

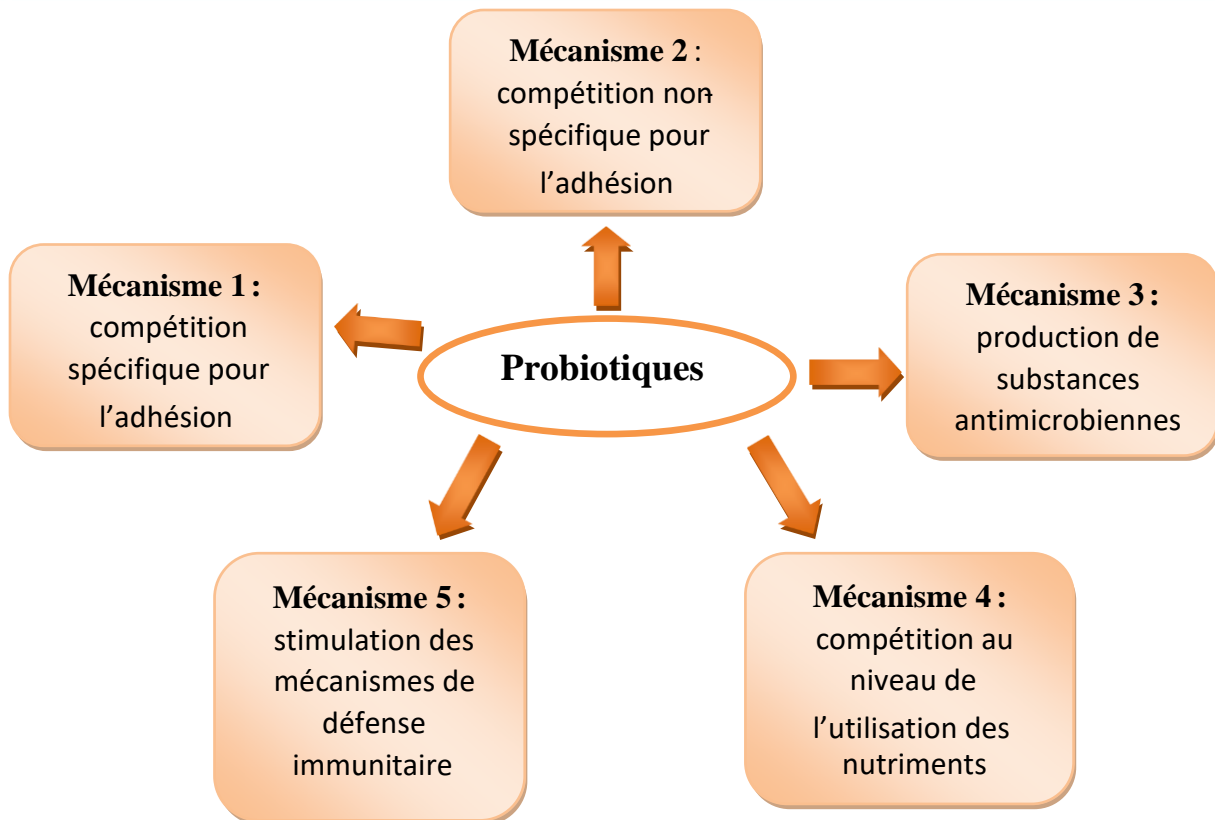


Figure 01: Mécanismes d'action proposés des micro-organismes probiotiques dans le traitement des infections entériques (Chemlal, 2012).

II.1.1. Compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhésion

Étant donné que la majorité des infections intestinales sont initiées par l'adhésion des pathogènes aux cellules entérocytaires de l'hôte, certains lactobacilles probiotiques auraient la capacité de bloquer physiquement l'accès aux entérocytes (Gill, 2003; Servin et Coconnier, 2003; Servin, 2004; Picard et *al.*, 2005). Ce mécanisme d'action serait similaire à celui exercé par le microbiote intestinal résident face aux infections microbiennes (Liévin- Le Moal et Servin, 2006).

Les mécanismes de compétition de l'adhésion se font généralement de deux façons. Ils peuvent survenir de façon spécifique par l'intermédiaire des adhésines ou de façon non spécifique en impliquant des interactions électrostatiques ou hydrophobes, des forces passives et stériques (Servin et Coconnier, 2003). Deux exemples de ces modes de compétition sont présentés dans la (Figure 02).

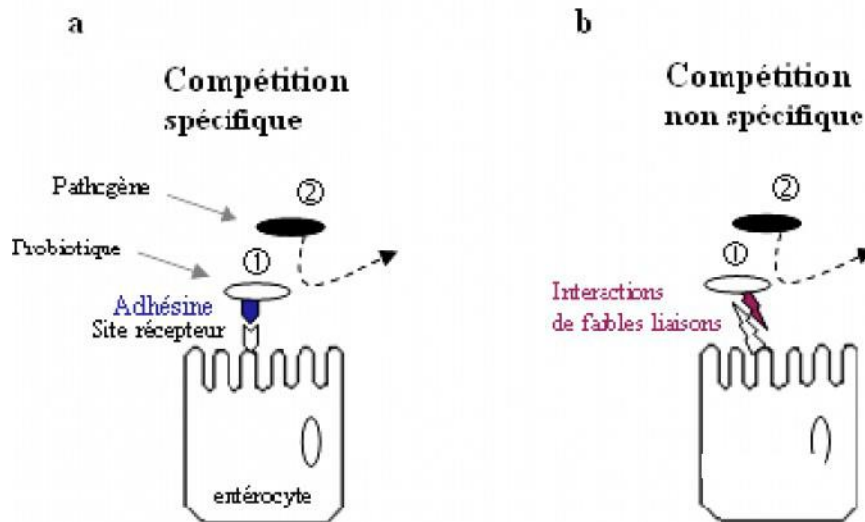


Figure 02: Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière dû à l'adhésion spécifique (a) et non spécifique (b) des probiotiques. (Servin et Coconnier, 2003).

Des études pionnières effectuées par Bernet et *al.* (1993) ont démontré que des souches de bifidobactéries humaines adhérant fortement aux cellules intestinales Caco-2 inhibent l'adhésion de micro-organismes pathogènes comme *E. coli* entéropathogénique (EPEC) et *Salmonella typhimurium* à ces mêmes cellules lorsqu'elles sont placées en compétition. Mack et *al.* (1999) ont rapporté une inhibition complète de l'adhésion d'*E. coli* O157:H7 par l'ajout préalable de la souche *Lb. plantarum* 299v sur des cellules HT-29. Ces auteurs ont proposé, entre autres, que l'adhésion préalable des probiotiques aux cellules intestinales contribuerait à limiter l'accès des pathogènes aux entérocytes en plus d'augmenter la sécrétion du mucus qui pourrait lui aussi empêcher l'adhésion des pathogènes aux cellules intestinales.

II.1.2. Production de substances antimicrobiennes

Le troisième mécanisme d'action des probiotiques concerne l'inhibition de la croissance des pathogènes grâce à des composés antimicrobiens. Les bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* d'origine humaine peuvent produire des substances anti-microbiennes, telles que les acides organiques, qui sont actives *in vitro* et *in vivo* contre les micro-organismes entérovirulents impliqués dans les cas de diarrhées (Servin, 2004).

Les acides lactique et acétique sont produits *via* la fermentation des hexoses par les lactobacilles. Ces acides organiques peuvent diffuser passivement à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée (Figure 03). Ils acidifient le cytoplasme après dissociation et inhibent l'activité enzymatique cellulaire des pathogènes acido-sensibles

(Deng et al., 1999). Cette diminution du pH peut donc affecter la viabilité des pathogènes bactériens (Bruno et Shah, 2002; Servin, 2004).

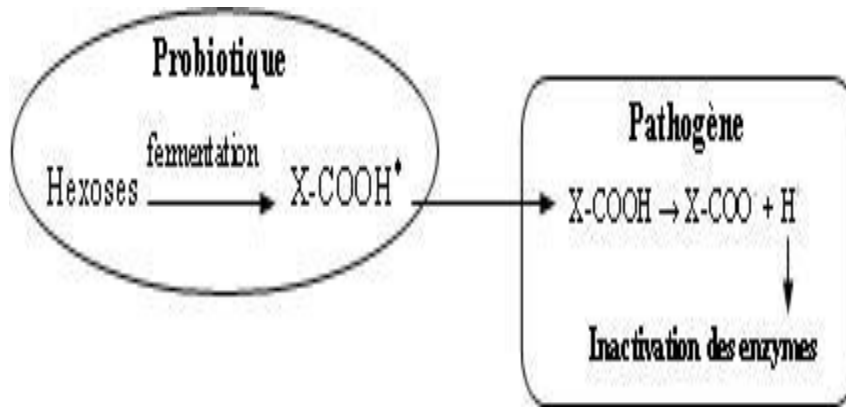


Figure 03: Mode d'action des acides organiques produits par les probiotiques contre les pathogènes bactériens (Servin et Coconnier, 2003)*X-COOH = CH₃-CHOH-COOH dans le cas de l'acide lactique ou CH₃COOH dans le cas de l'acide acétique.

II.1.3. Compétition au niveau de l'utilisation des nutriments

L'inhibition de la croissance des pathogènes peut également s'effectuer par un processus de restriction des nutriments. Il est évident que la capacité des micro-organismes à entrer en compétition pour limiter les nutriments disponibles est un facteur non négligeable qui détermine la composition du microbiote. Ainsi, une augmentation du nombre de lactobacilles obtenue lors d'un traitement probiotique permettrait de diminuer les substrats disponibles pour l'implantation de micro-organismes pathogènes (Fooks et Gibson, 2002).

II.1.4. Stimulation des mécanismes de défense immunitaire

Le dernier mécanisme porte sur l'interaction des probiotiques avec le système immunitaire pour accroître la réponse immune de l'hôte contre des entéropathogènes. Parmi les effets observés, quelques auteurs soulignent une stimulation de l'immunité adaptative (IgA, IgG) et innée (macrophages, basophiles, monocytes) par les probiotiques (Fooks et Gibson, 2002; Gill, 2003; Servin, 2004).

Par exemple, Shu et Gill (2001) ont étudié l'effet d'une souche commerciale de bifidobactéries administrée sous la forme d'un lait fermenté chez des souris BALB/c et C57BL/6 dans le but de prévenir l'infection à *E. coli* O157:H7. La souche de bifidobactéries a pu réduire la sévérité de l'infection à *E. coli* O157:H7 et cette réduction a été associée à la stimulation immunitaire obtenue par l'ingestion de probiotiques.

Ces auteurs ont attribué cet effet protecteur à une réponse en IgA anti-*E. coli* O157:H7 plus forte chez les souris recevant la souche probiotique comparativement aux contrôles.

Une seule étude animale s'est intéressée à l'activité antagoniste des probiotiques en relation avec la réponse immune durant une infection entérique virale (Qiao et al., 2002). Dans cette étude, des rotavirus rhesus ont été administrés par voie orale chez des souris BALB/c traitées par la suite par des bifidobactéries (*B. bifidum* et *B. infantis*). Les niveaux d'IgA spécifiques aux rotavirus dans les fèces et dans le sérum étaient plus élevés chez les souris traitées avec des bifidobactéries après l'infection que les souris infectées au rotavirus et ne recevant pas de bifidobactéries. Les bifidobactéries agiraient dans ce cas comme des adjuvants en modulant une réponse rapide de la muqueuse et une forte production d'IgA spécifiques pour atténuer la sévérité de la diarrhée induite par rotavirus.

En résumé, les mécanismes d'action proposés dans cette section présentent l'état actuel des connaissances sur l'action des probiotiques contre des pathogènes entériques. Cependant, il est important de noter que les mécanismes associés à des souches particulières ne peuvent pas être extrapolés à tous les micro-organismes probiotiques. Chaque souche doit être étudiée de façon indépendante. De plus en plus d'équipes de recherche travaillent actuellement pour identifier ces mécanismes d'action de probiotiques particuliers contre certains pathogènes.

II.2. Études cliniques

Actuellement, la plupart des études cliniques disponibles ayant démontré un effet positif des probiotiques ont porté sur la prévention et le traitement des diarrhées occasionnées par des virus (principalement les rotavirus), des bactéries (*Campylobacter*, *Shigella*, *Salmonella*) ou celles liées à la prise d'antibiotiques (diarrhée opportuniste à *Clostridium difficile*) (Tableau 06). Les études cliniques démontrant des effets positifs pour la prévention et le traitement des infections entériques virales ont principalement été réalisées chez des nourrissons et des enfants. Les jeunes enfants répondent particulièrement bien aux probiotiques grâce à leur microbiote intestinal moins complexe comparativement à celui des adultes (De Vrese et Marteau, 2007).

Tableau 06 : Études cliniques concernant l'efficacité des souches probiotiques commerciales lors d'infection entériques.

Type d'infection entérique	Souches probiotiques	Producteur	Population à l'étude	Effet observé	Référence
Diarrhée infantile	<i>L. rhamnosus</i> GG	Valio,	Finlande	Diminution de la durée des diarrhées à rotavirus	Isolauri et al., 1991 Isolauri et al., 1994
				Augmentation de la réponse immunitaire humorale	Kaila et al., 1992 Majamaa et al., 1995
	<i>L. casei</i> DN-114 001 (Immunitay)	Danone, France	Enfants	Diminution de l'incidence des diarrhées	Pedone et al., 2000
	<i>L. reuteri</i> SD 2112 (Protectiy)	BioGaia, Suède	Nourrissons	Diminution de l'incidence et de la durée de diarrhées à <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> et rotavirus	Weizman et al., 2005 Shornikova et al., 1997
	<i>B. lactis</i> Bb12	Chr. Hansen, États-Unis	Nourrissons	Prévention des diarrhées à rotavirus	Saavedra et al., 1994 Phuapradit et al., 1999
	<i>E. coli</i> Nissle 1917	Ardeypharm, Allemagne	Nourrissons et enfants	Diminution de la fréquence quotidienne de diarrhées à <i>Salmonella</i> , <i>Yersinia</i> , <i>E. coli</i> pathogénique, <i>Shigella</i> , rota-, adéno- et norovirus	Henker et al., 2007
Diarrhée associée aux pathogènes alimentaires	<i>B. breve</i>	Yakult, Japon	Nourrissons et enfants	Diminution de <i>Campylobacter jejuni</i> détectés dans les fèces	Tojo et al., 1987
	<i>Enterococcus faecium</i> F68 (Bioflority)	Giuliani, Suisse	Adultes	Diminution de la durée et de la sévérité des diarrhées dues à des pathogènes alimentaires	Buydens et al., 1996
	<i>L. rhamnosus</i> GG	Valio, Finlande	Enfants	Diminution des diarrhées à <i>Shigella</i>	Sepp et al., 1995
Diarrhée associée aux antibiotiques	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Biocodex, États-Unis	Adultes	Diminution de l'occurrence d'infection à <i>Clostridium difficile</i> liée à la prise d'antibiotiques	McFarland et al., 1994 McFarland et al., 1995 Elmer et al., 1996

CHAPITRE II : ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES PROBIOTIQUES

Chez les enfants, la souche *L. rhamnosus* GG, qui demeure la bactérie probiotique la plus étudiée, a démontré des résultats positifs sur la diminution de la durée de diarrhée à rotavirus (Isolauri et al., 1994 ; Majamaa et al., 1995) et des diarrhées aiguës dues à plusieurs causes incluant les adénovirus et les rotavirus (Guandalini et al., 2000). D'autres souches probiotiques ont également démontré un effet bénéfique sur la prévention des infections à rotavirus. Ainsi, l'équipe de Saavedra (1994) a étudié l'effet prophylactique d'une souche commerciale *B. lactis* Bb12 pour contrer ces infections. Cet essai a montré que l'addition de cette souche probiotique à des formules infantiles distribuées à des nourrissons hospitalisés a significativement diminué l'incidence de la diarrhée et l'excrétion de rotavirus.

Les évidences cliniques concernant l'efficacité des probiotiques contre les entéropathogènes d'origine bactérienne sont moins documentées. Hormis les quelques études présentées au (Tableau 06) d'autres études concernant l'effet des probiotiques lors des diarrhées des voyageurs, qui sont causées entre autres par *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* et *Shigella* (Ericsson, 2003), ont donné des résultats limités et peu convaincants. Même si quelques études à double insu contrôlées au placebo ont montré par exemple que la souche *L. rhamnosus* GG réduit l'incidence de la diarrhée des voyageurs (Dupont, 1997; Hilton et al., 1997), d'autres auteurs ont noté une incidence non significative chez les voyageurs recevant ces bactéries comparés au groupe placebo (Oksanen et al., 1990). Pour expliquer ces résultats, certains auteurs ont avancé qu'il est peu probable qu'une seule souche probiotique ait une action *in vivo* contre un large spectre de pathogènes (Leahy et al., 2005).

De par la complexité de mise en oeuvre, les études cliniques chez les humains restent rares et généralement peu d'études ayant des effets non significatifs sont publiées (Sanders, 2003). Toutefois, ces premiers résultats cliniques sur l'efficacité des probiotiques restent extrêmement prometteurs. Cependant, il est encore prématuré d'émettre des recommandations spécifiques applicables en usage clinique pour le traitement de la diarrhée car les études disponibles réalisées à double insu et contrôlées au placebo ont été effectuées principalement à l'aide d'un nombre restreint de patients ($n < 100$) (De Vrese et Marteau, 2007). D'autres études incluant un plus grand nombre de patients sont actuellement nécessaires pour confirmer les études précédentes, pour accroître leur crédibilité face à la communauté médicale et aussi pour évaluer l'effet des probiotiques à long terme (Reid et al., 2003; De Vrese et Marteau, 2007).

CHAPITRE III :
MATERIEL ET
METHODES

CHAPITRE III: MATERIEL ET METHODES

III.1. Matériel

III.1.1. Préparation des milieux de culture

✚ Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharp, 1960) : utilisée pour la culture et le dénombrement des *Lactobacillus* dans les produits laitiers (Biokar Diagnostics, Beauvais, France).

✚ MRS liquide

✚ Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975) : utilisée pour le dénombrement des lactocoques (particulièrement *Lactococcus lactis*) et de *Streptococcus thermophilus* dans les produits laitiers (Biokar Diagnostics, Beauvais, France).

✚ M17 liquide

✚ BHI : pour la culture d'un grand nombre de microorganismes, y compris de nombreux types de pathogènes. (Biokar Diagnostics, Beauvais, France).

III.1.2. Origine des souches tests

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de lait fermenté traditionnel, Raib, fabriqué sans cultures de départ. Des échantillons ont été collectés dans toutes les régions de Chlef.

Les souches cibles utilisées dans cette étude sont : *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. (Mezaini et al, 2009).

III.2. Méthodes

III.2.1. Isolement des bactéries lactiques

- Les bactéries lactiques ont été isolées à partir du Raib, en homogénéisant des échantillons de 10 g de fromage dans 90 ml de solution saline.
- Une série de dilutions appropriées sur différents milieux: (BHI, MRS et M-17).
- Les plaques ont été incubées de manière aérobie à 30° C pendant 48 heures, puis plusieurs colonies ont été prélevées au hasard pour identification.
- La morphologie cellulaire et la coloration de Gram ont été examinées par microscopie optique, et l'activité catalase a été réalisée.
- L'identification phénotypique était basée sur des caractéristiques physiologiques et biochimiques, fermentation du sucre, en utilisant les tests de fermentation (API-20 CH et API-50 CH) .

III.2.2. Détection de l'activité antibactérienne

Il s'agit de plusieurs méthodes de détection de l'activité antibactérienne, les deux méthodes décrit par Bilge Hilal (Çadirci et al, 2005) :

III.2.2.1. Préparation des filtrats

- Les bactéries lactiques ont été cultivées à 37 ° C et à 42 ° C pendant 16 h. dans le bouillon MRS. Après culture de 16 h de culture, 1% du volume a été inoculé dans 150 ml du MRS bouillon et incubé à 37 ° C pendant 24, 48 et 72 h en anaérobiose .
- Les cultures de bactéries lactiques ont été centrifugées à 15 000 tr / min pendant 15 min et les surnageants ont été récupérés dans des flacons coniques et le pH a été ajusté à 4,5. Le surnageant acellulaire a été stérilisé par filtration sur membrane (taille de pores de 0,22 µm: (Kivanç, 1990).

III.2.2.2. Préparation des inoculums

Les inoculums ont été préparées comme décrit par Kivanç (1990), avec quelques modifications.

- Des cultures de 16 h de bactéries pathogènes ont été centrifugées à 15 000 tr / min pendant 15 minutes et les cellules ont été collectées et les surnageants jetés. Les cellules ont été rincées deux fois avec une solution saline physiologique stérile (PSS), ont été ajustées à 10^3 et 10^6 cellules / ml

III.2.2.3. Méthode de disques

La méthode de disques de Bhunia et al. (1988) a été suivi avec des modifications.

- Les bactéries pathogènes à des concentrations de 10^3 et 10^6 cellules / ml, ont été ajoutées à 560 µl dans 7 ml de gélose molle BHI (gélose à 0,75%) et mélangées. Ensuite, cet inoculum a été transféré sur des plaques d'agar MRS solide.
- Des disques en papier (diamètre du disque 6 mm) ont été imbibés dans 30 µl de surnageant acellulaire provenant du cultures de bactéries lactiques de 24, 48 et 72 h et placé sur la surface de la gélose MRS et incubé à 37°C pendant 24 h en anaérobiose (Figure 04/a).
- Un disque imbibé par le bouillon BHI est placé sur de la gélose MRS, comme témoin.
- Après incubation, une zone claire autour d'un disque indique qu'il s'agit d'une activité antimicrobienne.

III.2.2.4. Méthode des spots (spot-on-lawn)

Lawn : culture d'une nuit sur une plaque d'agar de 120ml.

Spot : 6 ul de culture d'une nuit repérée sur plaque d'agar. (iGEM LMU-Munich, 2014).

Le test antimicrobien des spots a été décrit par plusieurs auteurs, plusieurs modifications de la méthode ont été apportées. De plus, diverses autres expressions sont utilisées telles que le test de la gélose, le test de dilution critique et le test d'antagonisme différé. (Fijan, 2016).

- Dans la méthode des spots, des cultures de 24, 48 et 72 h de cultures de bactéries lactiques ont été repérées sur la surface des plaques de la gélose du MRS et incubées à 37°C pendant 24 h en anaérobiose.
- Des suspensions de cellules lavées 16 h de bactéries indicatrices ont été ajoutées à (8%) 7 ml. La gélose molle BHI et ce mélange ont été transférés sur milieu MRS solide qui contenaient des cultures de bactéries lactiques pendant une nuit (Figure 04/b).
- Le MRS bouillon a été repéré comme témoin.
- Après 24 h et 37°C incubation en anaérobiose, la zone d'inhibition a été mesurée en millimètres (Schillinger et Lucke, 1989).

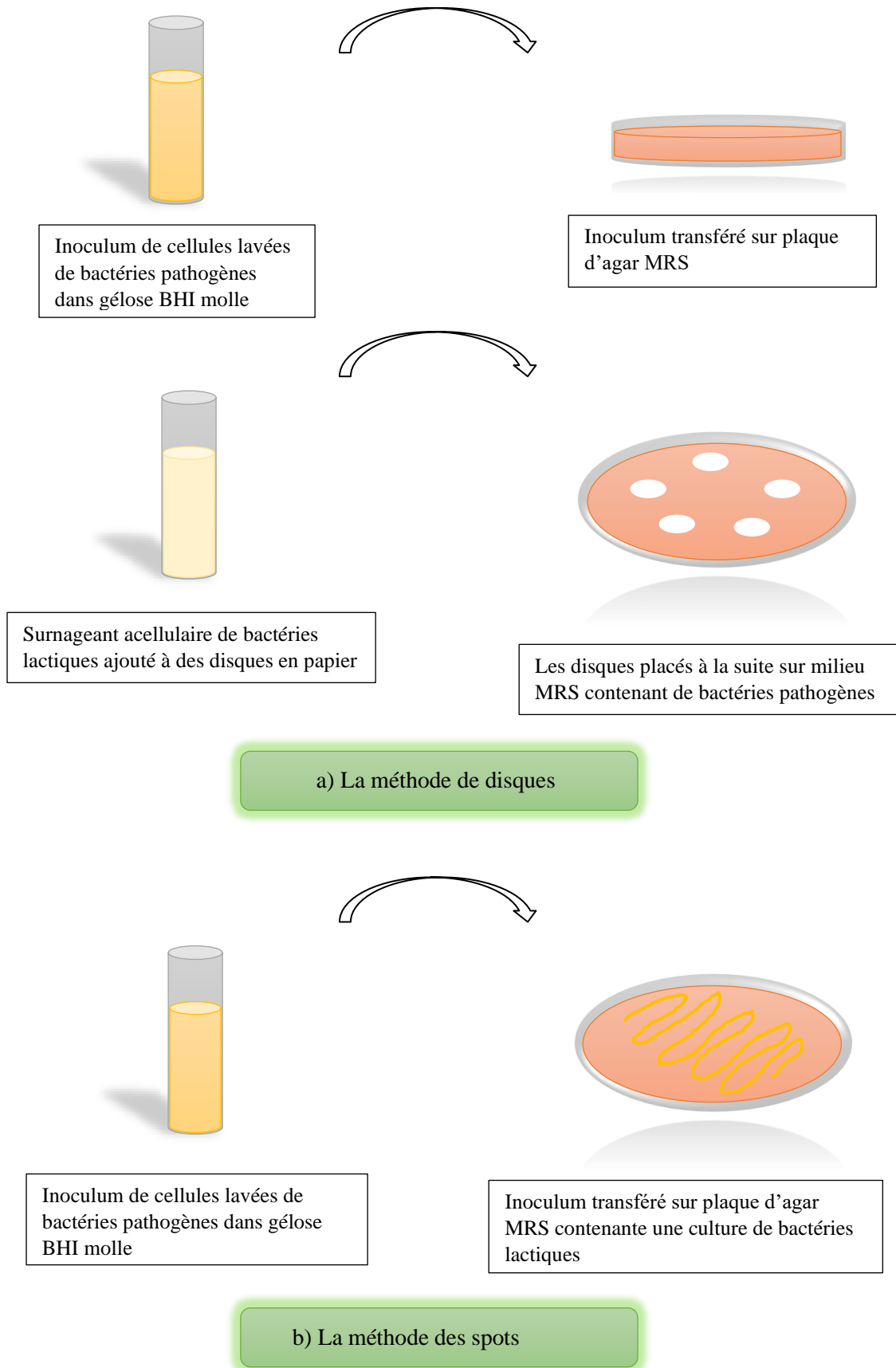


Figure 04: Les différentes méthodes de détection de l'activité antibactérienne.

CHAPITRE IV :
RESULTATS ET
DISCUSSION

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Activité antibactérienne

IV.1.1. Méthode des disques

Çadirci et al. (2005). Ont testé trois souches de *Lactobacillus* contre 10 micro-organismes pathogènes, les résultats de la méthode des disques montrent que les bactéries Gram (-) étaient majoritairement inhibées dans cette étude et *B. subtilis* ATCC 6633 était la bactérie la plus sensible (Tableau 07).

Les résultats sont conformes aux résultats de Boudersa et al. (2017), Suite à la méthode des disques le pouvoir antagoniste a révélé que les bacilles lactiques (BL) présentent l'activité inhibitrice la plus forte. Elle est dirigée contre *E. coli* Gram (-) avec une moyenne de 11 mm, une activité toutefois supérieure à celle observée contre *S. aureus* (9.67mm) et *B. Cereus* (8mm) Gram (+).

IV.1.2. Méthode des spots

Les résultats de Çadirci et al. (2005) de la méthode des spots, montrent que les bactéries Gram (-) étaient majoritairement inhibées et *P. aeruginosa* ATCC 27853 était la bactérie la plus sensible (Tableau 08).

L'étude de Pan et al. (2008) a montré également la présence d'une activité antimicrobienne potentielle du probiotique candidat *Cl. butyricum* par la méthode des spots envers deux agents pathogènes de poissons. Les résultats ont montré que *Cl. butyricum* avait une inhibition claire de la croissance de deux agents pathogènes, *V. anguillarum* et *Aer. Hydrophila* Gram (-) (diamètre de la zone d'inhibition > 0.8 cm), alors qu'il avait une faible inhibition Contre les Gram (+) *Lact. delbrueckii*, et aucune inhibition envers *Lact. acidophilus* (diamètre de la zone d'inhibition < 0.3 cm).

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 07: Effet antagoniste de *Lactobacillus* contre les souches pathogènes par méthode de disques. Çadirci et al. (2005).

Cultures bactériennes	<i>L. helveticus</i>						<i>L. plantarum</i>						<i>L. casei</i>					
	24h		48h		72h		24h		48h		72h		24h		48h		72h	
	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶
<i>B. Subtilis</i> ATCC 6633	11	8	21.5	21	12	10	12	11.5	21.5	20.5	12	11.5	9	11	11	9	12	10.5
<i>S. Aureus</i> ATCC 25923	11	10.5	7.5	9	10	10	11	9	8.5	9	9.5	10	11.5	9.5	7.5	9	12	10
<i>E. Faecalis</i> ATCC 29212	11	10.5	12	10	11.5	10	14	13.5	13	10	13	12.5	9	8.5	10.5	10.5	10	9.5
<i>E. Cloaceae</i> ATCC13047	10.5	9.5	8	7.75	9.5	10	10	8.5	8	7	10	9	9.5	9	8	7.5	10	10
<i>E. Coli</i> O157 :H7	14	11	16	14.5	15	14.5	13.5	11	15	14.5	12	10.5	10.5	10	11.5	11	12.5	11.5
<i>E. Coli</i> ATCC 25927	12	11	13	12.5	12.5	11.5	12	11.5	14	13	13	12.5	9.5	9	10	9	11	10
<i>E. Coli</i> ATCC 25922	11	9	8	9	11	8.5	11	10	9	9	9	9	10	10	10	10	10	8.5
<i>P.aeruginosa</i> ATCC10145	11	10	20	18	10	9	12	10.5	20.5	20	11	9.5	8	7.5	12	9	10.5	9.5
<i>P.aeruginosa</i> ATCC27853	11	9	6.25	10	7.5	7.5	10	8	6.25	10	8	7.5	11	9	6.25	10	8.5	7.5
<i>P. mirabilis</i> ATCC 7002	11.5	11.5	8	8	9.5	9	10	10	8	8	10	8.5	10	10	10	7.75	11	8

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 08: Effet antagoniste de *Lactobacillus* contre les M.O pathogènes par méthode des spots. Çadirici et al. (2005).

Cultures bactériennes	<i>L. helveticus</i>						<i>L. plantarum</i>						<i>L. casei</i>					
	24h		48h		72h		24h		48h		72h		24h		48h		72h	
	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶
B. subtilis ATCC 6633	18	18	34	27	29	25	20	19	23	22	25	23.5	20.5	19	21.5	23	23	18.5
S. aureus ATCC 25923	17	17	28	27	23.5	24	17	13	28	22	20.5	21	18	18	21	21	26	24
E. faecalis ATCC 29212	15	15	22.5	19	19.5	22	14.5	13.5	22	20	20	19	15	17	20	18.5	19.5	20
E. cloaceae ATCC 13047	23	13	16	15	21	21	16	15.5	18	17	18.5	18	16	17	20	21	24	11
E. coli O157:H7	16	19	23	23	25	26	15.5	16.5	26	24	24	21	18.5	18	25	24	25.5	25
E. coli ATCC 25927	21	19	27	24.5	26	28	17.5	17	28	27	27	22	20	19	27	25.5	27.5	24
E. coli ATCC 25922	13	14.5	20	23	17	19	17	19	17	16	27	25	14	12	21.5	17	27.5	25
P.aeruginosa ATCC10145	20	15.5	23	21	28	19	17	15	28	25	26	27	19	22	26	22.5	30	30
P.aeruginosa ATCC27853	19	20	33	31	25.5	25	16.5	14	26	23	25	26	20	21	26	25	28	30
P. mirabilis ATCC 7002	16	17	26	27	23.5	25.5	14.5	14.5	26	25	23	26	18	16	21	20	30	31

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

En outre, selon Mezaini et al. (2009). les résultats montrent que six isolats étaient actifs contre une ou plusieurs souches testées. Cependant, la souche *S. thermophilus* T2 a montré un large spectre inhibiteur contre toutes les bactéries cibles Gram (+) utilisées dans cette étude, sauf contre *Staphylococcus aureus*. De plus, *S. thermophilus* T2 n'a montré aucune activité inhibitrice contre les bactéries à Gram (-) utilisées dans cette étude: *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* (Tableau 09).

Ces résultats corroborent avec les résultats obtenues par Labioui et al. (2005). qui ont constaté que les trois souches de bactéries lactiques les plus efficaces, BLh5, BLh10 et BLh17 ne présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis des bactéries pathogènes. Elles sont toutes actives sur les Gram (+), mais seule la souche BLh5 est efficace contre *Proteus mirabilis* Gram (-). Et les trois souches présentent une forte activité antibactérienne contre *Escherichia Coli* ATCC25921.

Tableau 06: Spectre antibactérien des surnageants acellulaire des six bactéries lactiques isolées du produit laitier traditionnel (Raïb). Mezaini et al. (2009).

Souche	Souches inhibées
<i>Lactococcus lactis</i> S1	<i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactococcus lactis</i> S2	<i>Listeria innocua</i>
<i>Lactococcus lactis</i> S7	<i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactococcus lactis</i> S9	<i>Listeria innocua</i> , <i>Bacillus cereus</i>
<i>S. thermophilus</i> T2	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Staphylococcus epidermitidis</i>
<i>S. cremoris</i> R3	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactococcus diacetylactis</i> V1	<i>Enterococcus faecalis</i>

D'après les résultats, on constate que l'activité antagoniste des bactéries lactiques par la méthode des disques et la méthode des spots est plus forte contre les bactéries à Gram (-), tandis qu'avec la méthode de diffusion sur gélose présente un large spectre inhibiteur contre les bactéries à Gram (+).

L'activité antibactérienne des souches lactiques est probablement due à la production de plusieurs agents antibactériens. L'activité inhibitrice sur les bactéries testées par la méthode des spots est considérée comme meilleure, mais cela pourrait être à cause de tous les métabolites présents. Mais dans la méthode des disques, des surnageants de cultures de bactéries lactiques ont été utilisés en anaérobies, des conditions ont été imposées pour diminuer l'activité inhibitrice, ainsi, la zone d'inhibition qui a été observée autour des disques peut dépendre uniquement de l'activité des bactériocines (Çadirci et al, 2005).

En outre, dans la recherche sur l'activité antimicrobienne, la méthode des spots est une technique pratique et appropriée. Cependant, dans les enquêtes sur la bactériocine, elle doit être contrôlée avec la méthode des disques (Çadirci et al, 2005).

L'activité antimicrobienne observée dans l'étude de (Mezaini et al, 2009) est exercée uniquement contre les bactéries Gram positives, la bactériocine produite par *S.*

thermophilus T2 inhibe les souches Gram positives telles que *Listeria innocua* et *Enterococcus faecalis* . et rarement les souches à Gram négatif.

Les bactéries Gram (+) sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques. Les bactériocines sont surtout actives sur les pathogènes à Gram (+). L'activité bactéricide de la souche BLh5 se retrouve exclusivement dans le milieu de culture. On a donc formation de substances extracellulaires (Labioui et al, 2005).

CONCLUSION

Conclusion

En conclusion, l'étude des bactéries lactiques aidera à sélectionner les meilleures souches pour améliorer la sécurité microbiologique des produits alimentaires et augmenter leur durée de conservation.

Les bactéries lactiques ont pour habitat de nombreux milieux naturels, des végétaux (plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales, flore intestinale, vaginales, fèces et dans le lait).

L'activité antimicrobienne ou antagoniste des probiotiques est une propriété importante qui comprend la production de composés antimicrobiens contre des agents pathogènes, l'amélioration de la fonction de barrière intestinale et autres.

Sur cette base le but principal de cette étude est de mettre en évidence l'activité antagoniste des bactéries lactiques vis-à-vis de certaines bactéries d'altération.

Il existe de nombreuses méthodes pour déterminer les propriétés antagonistes des probiotiques, y compris la méthode des spots, la méthode des disques, la méthode de diffusion sur gélose et autres, par contact direct et indirect entre la souche testée et la souche indicatrice.

La première partie de cette étude consiste à isoler, caractériser et identifier les souches de bactéries lactiques à partir du lait fermenté.

La deuxième partie c'était la détermination de leur capacité à produire des substances inhibitrices contre les souches cibles.

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que l'activité antagoniste des bactéries lactiques par la méthode des disques et la méthode des spots est plus forte contre les bactéries à Gram négatif, tandis qu'avec la méthode de diffusion sur gélose les bactéries à Gram positif étaient inhibées le plus, cela pourrait être à cause des métabolites présents et leurs natures.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(A)

- **Abee T., Krockel L., Hill C., 1995** - Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J. Food. Microbiol* : 28: pp 169-85.
- **Ait-Belgnaoui A., lamine F., han W., eutamene H., fioramonti J., bueno L. ET theodorou V., 2005**. A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. *Nutr. Ali. Fonct.* 3 : 59-63.
- **Allouche F. N ., Hellal A ., Laraba A.** (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie*, (3) :13- 20.
- **Alvarez-Olmos MI, and Oberhelman RA.** 2001. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin Infect Dis.* 32: 1567-1576.
- **Ammor M.S. et Mayo B., 2007**. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science.* 76 : 138-146.
- **Atrih A. et Foorste S J., 2001** - Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance proprieties and demonstration of its conservation amongst species'. *Appl. Microbiol:* 91: pp 364-372.

(B)

- **Bilge HÇ, Sumru Ç** (2005). A Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. *Pak. J. Nutr.*, 4(4): 238.
- **Boudersa W, Nekkaa R.** (2017). Étude de l'activité antibactérienne de bacteries lactiques isolées a partir d'un produit laitier fermenté : le yaourt brassé. *Université des frères Mentouri Constantine.* 42.
- **Branger A., Richer M.M. et Roustel S., 2007**. Microbiochimie et alimentation. Educagri Edition. 166-168.
- **Bruno FA, and Shah NP.** 2002. Inhibition of pathogenic and putrefactive microorganisms by Bifidobacterium sp. *Milchwissenschaft.* 57: 617-621.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(C)

- **Calder PC, and Kew S.** 2002. The immune system: a target for functional foods, *Br J Nutr.* 88: S165-S176.
- **Carr F.J., Chill D. and Maida N. (2002):** The Lactic Acid Bacteria: *A literature Survey. Critical Reviews in Microbiology.* 28, 4, 281-370
- **Chemlal-Kherraz D, 2013.** Isolement et identification des bactéries lactiques isolées du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et mise en évidence de leur potentiel probiotique. Thèse de doctorat en biologie. Université d'oran.
- **Chouraqui JP, Van Egroo LD, Fichot MC.** 2004. Acidified milk formula supplemented with *Bifidobacterium lactis*: impact on infant diarrhea in residential care setting. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 3: 288-292

(D)

- **Davidson B.E., Kordias N., Dobos M., Hillier A.J. (1996):** Genomic organization of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek,* 70:161-183.
- **De Vos W.M. (1999):** Gene expression systems for lactic acid bacteria, *Curr. Opin. Microbiol.* 2 289-295.
- **De Vrese M, and Marteau PR.** 2007. Probiotics and prebiotics: Effects on diarrhea. *J Nutr.* 137: 803S-811S.
- **Desmazeaud M., 1998.** Bactéries lactiques et qualité des fromages. Lab. de recherches laitières INRA. 1-3.
- **Desmazeaud M.J., (1983) :** L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait,* 63, pp 267-316.
- **Desmazeaud M.J., (1992) :** Les bactéries lactiques. INRA station de recherche laitière 78350 Jouy en Joas.
- **Drouault S. et Corthier G. (2001) :** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet. Res.,* 32: 101-117.
- **DuPont HL.** 1997. *Lactobacillus GG* in the prevention of traveler's diarrhea: an encouraging first step. *J Travel Med.* 4: 1-2.

(E)

- **Ericsson CD.** 2003. Traveller's diarrhoea. *Int J Antimicrob Agents.* 21: 116-124.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(F)

- **FAO et OMS, 2002.** 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
- **FAO/WHO. 2002.** Joint Working Group Report on Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1. Available at: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en/index.html
- **Federighi M., 2005** - Bactériologie alimentaire compendium d'hygiène des aliments. 2 ed.
- **Fijan S, (2016).** Antimicrobial Effect of Probiotics against Common Pathogens. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health.*
- **Fooks LJ, and Gibson GR. 2002.** Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr.* 88: S39- S49.

(G)

- **Gill HS, 2003.** Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 17: 755-773.
- **Guandalini S, Pensabene L, Zikri MA, Dias JA, Casali LG, Hoekstra H, Kolacek S, Massar K, Micetic-Turk D, Papadopoulou A, De Sousa JS, Sandhu B, Szajewska H, Weizman Z. 2000.** Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 30: 54-60.
- **Guiraud Joseph-Pierre (2003):** Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyses microbiologiques. *Ed. Dunod, Paris, 651p.*

(H)

- **Hermier J., Lenoir J., Weber F. (1992):** Les groupes microbiens d'intérêt laitier. *Cepil, lavoisier, Paris. 568p.*
- **Hilton E, Kolakowski P, Singer C, Smith M. 1997.** Efficacy of Lactobacillus GG as a diarrheal retentive in travelers. *J Travel Med.* 4: 41-43.
- **Holzapfel W.H., 2008.** Functional characteristics of *Lactobacillus spp.* from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 126 : 57-64.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U.** 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.* 73: 365S-373S.
- **Hugenholtz J., Kleerebezem M., (1999):** Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 492-497.

(I)

- **Isolauri E, Kaila M, Mykkanen H, Ling WH, Salminen S.** 1994. Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *Dig Dis Sci.* 39: 2595-2600.

(K)

- **Kandler O. and Weiss N. (1986):** Regular, non-sporing Gram-positive rods: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* P.H.A Sneath, N. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore. 2: 1208-1234.
- **Kaur IP, Chopra K, Saini A.** 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci.* 15: 1-9.
- **Khan S H. and Ansari F A.,** 2007 – Probiotics: The friendly bacteria with market potential in global market. *Pak. J. Pharm. Sci.* Vol: 20(1): 76-82.
- **Kivanç, M.,** 1990. Antagonistic action of lactic cultures toward spoilage and pathogenic microorganisms in food. *Die Nahrung,* 34: 273-277.
- **Klaenhammer T R., Azcarate-Peril M A., Altermann E. and Barrangou R ., 2007** – The influence of dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. *The Journal of Nutrition Effects of Probiotics and Prebiotics:* 137: 748S-750S.
- **Klaenhammer T R., Azcarate-Peril M A., Altermann E. and Barrangou R ., 2007** – The influence of dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. *The Journal of Nutrition Effects of Probiotics and Prebiotics:* 137: 748S-750S.
- **Klaenhammer TR, and Kullen MJ.** 1999. Selection and design of probiotics. *Int J Food Microbiol.* 50: 45-57.
- **Klinj N., Weerkamp A.H., de Vos W.M. (1991):** Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 3390-3393.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(L)

- **Labioui H , Laaroussi E, El yachoui M , Ouhssine M.** (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2005, 144, 237-250.
- **Lamoureux L., 2000.** Exploitation de l'activité β -galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. National Library of Canada. 23-47.
- **Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., et Gobetti M., 2000** - Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: pp 4084 - 4090.
- **Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, van Sinderen D.** 2005. Getting better with bifidobacteria. *J Appl Microbiol.* 98: 1303-1315.
- **Leroy F. et De Vuyst L., 2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Tre.FoodSci. Technol.* 15 : 67-78.
- **Leveau J.Y., Bouix M., 1993 :** Microbiologie industrielle. Les Micro-organismes d'intérêt industriel. Tec & doc Lavoisier Paris. 169-330 p.
- **Liévin-Le Moal V, and Servin AL.** 2006. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: Mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev.* 19: 315-337.

(M)

- **Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T.** 1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 20: 333-338.
- **McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Elmer GW, Moyer KA, Melcher SA, Bowen KE, Cox JL.** 1995. Prevention of β -lactam-associated diarrhoea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol.* 90: 439-448.
- **McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Fekety R, Elmer GW, Moyer KA et al.** 1994. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile*. *JAMA.* 271: 1913-1918.
- **Mezaini, A., Chihib, N. E., Bouras, A. D., Nedjar-Arroume, N., & Hornez, J. P.** (2009). Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product. *Journal of environmental and public health*, 2009.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **MILLETTE, MATHIEU (2007).** Étude de bactéries lactiques à potentiel probiotique et de leurs métabolites Thèse. Québec, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique, Doctorat en biologie, 258 p.

(N)

- **Nista EC, Candelli M, Cremonini F, et al.** Bacillus clausii therapy to reduce side-effects of anti-Helicobacter pylori treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:1181–8.
- **Nykanen A., Lapvetainen A., Hietanen R M. and Kallio H., 1999** - Applicability of lactic acid and nisin to improve the microbiological quality of cold-smoked rainbow trout. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.A* .Vol: 208(2): pp 116-120.

(O)

- **Oksanen PJ, Salminen S, Saxelin M, Hamalainen P, Ihantola-Vormisto A, MuurasniemiIsoviita L, Nikkari S, Oksanen T, Porsti I, Salminen E et al.** 1990. Prevention of travellers diarrhoea by Lactobacillus GG. *Ann Med*. 22: 53-56.
- **OMS.** 2005. Escherichia coli enterohemorragique (EHEC). Aide mémoire N°125. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/fr/print.html>

(P)

- **Pedone CA, Arnaud CC, Postaire ER, Bouley CF, Reinert P.** 2000. Multicentric study of the effect of milk fermented by Lactobacillus casei on the incidence of diarrhoea. *Int J Clin Pract*. 54: 568-571.
- **Percival M., 1997.** Choosing a probiotic supplement. *Clin. Nutr. Insights*. 6(1): 95-100.
- **Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C.** 2005. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther*. 22: 495-512.
- **Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C.** 2005. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther*. 22: 495-512.
- **Pilet M.F., Magras C., Federigh M., 2005.** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.

(Q)

- **Qiao H, Duffy LC, Griffiths E, Dryja D, Leavens A, Rossman J, Rich G, Riepenhoff-Talty M, Lochniskar M.** 2002. Immune responses in rhesus rotavirus-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

challenged Balb/c mice treated with bifidobacteria and prebiotic supplements. *Pediatr Res.* 51: 750-755.

(R)

- **Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK.** 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev.* 16: 658-672.
- **Rogers L A., 1928** - The inhibiting effect of *Streptococcus thermophilus* and on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 5: pp 161-168. *Brrlgariczw. J. Bacteriol:* 5: pp 161-168.
- **Rogers L A., et E O Whittier., 1928** - Limiting factors in lactic fermentation. *J.Bacteriol:* 16:pp 211-214.

(S)

- **Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Matto J., et Mattila-Sandholm T., 2000.** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84 : 197-215.
- **Salama M., Sandine W., Giovannoni S., (1991):** Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 1313-1318.
- **Salminen S., Wright A V., Ouwehand A., 2004** - Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel. Dekker. Inc., U.S.A.
- **Salminen S., Wright A V., Ouwehand A., 2004** - Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel. Dekker. Inc., U.S.A.
- **Sanders ME.** 2003. Probiotics: considerations for human health. *Nutr Rev.* 61: 91-99.
- **Scardovi V. (1986):** Bifidobacterium. *Bergey's Manuel of determinative Bacteriology, IX^e édition.*
- **Schiffrin E.J., Brassart D., Servin A.L., Rochat F., Donnet-Hughes A.** Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr* **1997**;66:515S-520S.
- **Servin AL, and Coconnier MH.** 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 17: 741-754.
- **Servin AL.** 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 28: 405-440.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Sullivan A., and Nord C. E. (2005):** Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal of Internal Medicine*, 257, 78-92.

(T)

- **Tannock G.W.** Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1999**;76:265-78.
- **Temmerman R., Pot B., Huys G. et Swings J., 2003.** Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81 : 1-10.
- **Thapa N., Pal et al. (2005):** Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *Int. J. of Food Microbiol.* 107: 33-38

(X)

- **X. Pan T. Wu L. Zhang Z. Song H. Tang Z. Zhao.** (2008). In vitro evaluation on adherence and antimicrobial properties of a candidate probiotic *Clostridium butyricum* CB2 for farmed fish. Zengfu Zong, College of Life Sciences, Shanghai Fisheries University, Shanghai, China. 1623–1629.

ANNEXES

ANNEXES

Milieu d'isolement :

✚ Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharp, 1960)

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone 10,00 g
- Extrait de viande..... 10,00 g
- Extrait de levure5,00 g
- Glucose 20,00 g
- Phosphat dipotassique2,00 g
- Acétate de sodium5,00 g
- Citrate d'ammonium2,00 g
- Sulfate de magnésium0,20 g
- Sulfate de manganèse0,05 g
- Agar bacteriologique15,00g
- Eau distillée1000 ml

pH = 6,8 ± 0,1 Autoclave 120° pendant 20 min

✚ MRS liquide tout les ingrédients du **MRS solide** mais sans Agar

✚ Milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975) Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone2,50 g
- Peptone pepsique de viande2,50 g
- Peptone papainique de soja5,00 g
- Extrait de levure..... 2,50 g
- Extrait de viande5,00 g
- Lactose5,00 g
- Glycérophosphate de sodium19,00 g
- Sulfate de magnésium0,25 g
- Acide ascorbique0,50 g
- Agar bacteriologique15,00g
- Eau distillée1000 ml

pH = 7,1 ± 0,2 pour MRS normal et 5,4 pour MRS acidifié autoclave 120° pendant 20 min

✚ **M17 liquide** tout les ingrédients du **M17** solide mais sans Agar

✚ **Milieu BHI** (Brain Heart Infusion) Agar (Becton, Dickinson 2013)

Pour 1 litre de milieu :

- Infusion cœur-cervelle (matières solides)8,0 g
- Digestion peptique de tissu animal.....5,0
- Digestion pancréatique de caséine16,0
- Chlorure de sodium5,0
- Glucose2,0
- Phosphate d'hydrogène disodique.....2,5
- Gélose13,5

pH 7,4 ± 0,2

BHI liquide tout les ingrédients du **BHI** solide mais sans Agar