

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

UNIVERSITE DE MOSTAGANEM

FACULTE DES SCIENCES ET SCIENCES DE L'INGENIEUR

DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

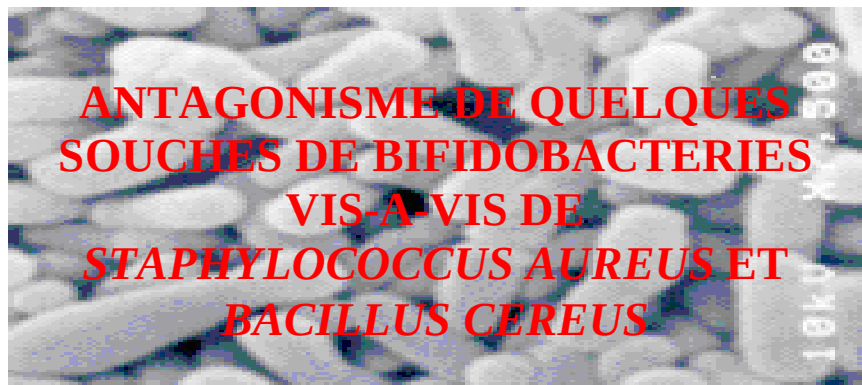
Laboratoire de Sécurité Alimentaire et Santé (LSAS).

MEMOIRE DE MAGISTER

EN

Hygiène et Sécurité Agro-alimentaire

Thème



Présenté par Mr: **CHOUKRI TEFIANI**

Le..... Juin 2007 devant le jury:

Mr G. Selselet-Attou	Pr.	Président	Univ. Mosta
Mr B. S. Bendahmane	MC.	Examineur	Univ. Mosta
Mr A. Dilmi-Bouras	MC.	Examineur	Univ. Chlef
Mr B. Lotmani	MC.	Examineur	Univ. Mosta
Mr A. Riazi	MC.	Directeur de recherches	Univ. Mosta

Année universitaire 2006 -2007

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

UNIVERSITE DE MOSTAGANEM

FACULTE DES SCIENCES ET SCIENCES DE L'INGENIEUR

DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

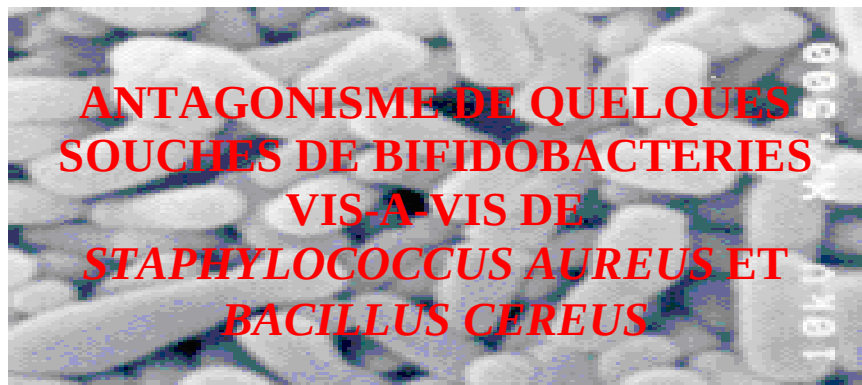
Laboratoire de Sécurité Alimentaire et Santé (LSAS).

MEMOIRE DE MAGISTER

EN

Hygiène et Sécurité Agro-alimentaire

Thème



Présenté par Mr: **CHOUKRI TEFIANI**

Le..... Juin 2007 devant le jury:

Mr G. Selselet-Attou	Pr.	Président	Univ. Mosta
Mr B. S. Bendahmane	MC.	Examineur	Univ. Mosta
Mr A. Dilmi-Bouras	MC.	Examineur	Univ. Chlef
Mr B. Lotmani	MC.	Examineur	Univ. Mosta
Mr A. Riazi	MC.	Directeur de recherche	Univ. de Mosta

Année universitaire 2006 -2007

Avant-propos

Le présent mémoire a été réalisé au laboratoire de sécurité alimentaire et santé (LSAS) du Dr. Riazi à l'université de Mostaganem et a nécessité trois années de travail durant lesquelles l'aide de plusieurs personnes a facilité ma tâche. Ils ont su m'encourager et croire en moi tout au long de cette étape cruciale de ma vie ; je leur serais toujours reconnaissant.

J'adresse ma reconnaissance à mon directeur de recherches, Mr A. Riazi, Maître de conférences, pour sa rigueur scientifique, sa disponibilité exceptionnelle et la liberté d'action qu'il m'a laissé tout au long de ce projet. Je le remercie également, pour son intérêt porté à mon sujet, son aide morale et la mise à disposition inconditionnelle de tous ses moyens. Je lui dois mon initiation à la recherche.

Je remercie également Mr. G. Selselet-Attou, professeur à l'université de Mostaganem, pour m'avoir honoré en acceptant de présider le jury de ma soutenance.

Ma gratitude s'adresse à Mr B. S. Bendahmane , Maître de conférences à l'université de Mostaganem, pour avoir accepté d'examiner mon travail .

Mes vifs remerciements sont également adressés à mes professeurs, Messieurs A. Delmi-Bouras et B. Lotmani respectivement Maîtres de conférences à l'université de Chlef et de Mostaganem.

Mes remerciements sont dirigés aussi à mes enseignants et à mes collègues du Laboratoire de Sécurité Alimentaire et Santé (LSAS) ainsi qu'au personnel des Laboratoire du département d'Agronomie (Université de Mostaganem) et du laboratoire régional vétérinaire de Mostaganem.

Je tiens à remercier infiniment tous les membres du laboratoire des fraudes (CAQE) d'Alger et à leur tête Mr Khorsi, Mme Bourouis et Mr Berghout pour avoir accepté d'effectuer le dosage des acides organiques par HPLC.

Enfin, ce travail est le fruit de longues années d'études, auxquelles l'amour et le soutien inconditionnel de ma famille ont largement contribué.

DEDICACES

Je dédie mon travail à la lune de mes nuits et le soleil de mes jours, à ceux qui m'ont toujours soutenu ; mes très chers père et mère.

A toutes mes sœurs et mon frère Yassine ainsi qu'à toutes les familles : TEFIANI, MANSOURI, HASNAOUI, YAHIA MAMOUNE et NEGACHE.

A mon grand et unique amour, ma chère épouse.

Mes dédicaces sont également adressées à ceux avec lesquels j'ai partagé de beaux moments et dont je garde d'excellents souvenirs : Medjahed, Mr et Mme Chaalel, Benbouziane, Gacemi, Wahid, Keddari, Zerrouki, Ziar, Lachachi, Dahloume, Bouzouina, Mr et Mme Youcefi, Nadia, Soane, Kara, Benfadel, Souidi, Saadaoui.

Enfin, ce mémoire est aussi dédié aux ingénieurs que j'ai côtoyé au Laboratoire de Sécurité Alimentaire et Santé (L.S.A.S).

Choukri

Résumé

L'objectif de ce travail a été de tester trois souches expérimentales (isolées à partir de selles de bébés allaités exclusivement au sein : Bbv1, Bbv2 et BLE) et une souche de référence (BLR) de bifidobactéries pour leur pouvoir antagoniste vis-à-vis de deux bactéries pathogènes : *Staphylococcus aureus* 49444 et *Bacillus cereus* ATCC 9884. L'antagonisme de ces souches a été étudié en utilisant deux méthodes : l'une consiste à les cocultiver à 37°C avec les pathogènes et l'autre à mettre en contact à 37 et à 6°C le surnageant concentré de leur culture avec celle de ces mêmes pathogènes. L'effet d'une série de solvants organiques sur le pouvoir inhibiteur des souches bifides vis-à-vis de *S. aureus* et *B. cereus* a également été exploré. Les acides organiques (acides acétique et lactique) synthétisés par les bifidobactéries ont été quantifiés par HPLC. Les résultats obtenus indiquent qu'à 37°C, les surnageants concentrés issus de cultures de bifidobactéries exercent un effet antagoniste envers *S. aureus* et *B. cereus* bien supérieur à celui observé lors de la coculture des souches bifides avec les pathogènes. A basse température (6°C), le pouvoir inhibiteur des surnageants concentrés des cultures bifides sur les deux germes pathogènes est fortement réduit et étalé dans le temps puisque 48h de contact ne permettent que 60% d'inhibition en moyenne seulement. La vitesse d'inhibition de *S. aureus* et de *B. cereus* par les surnageants bifides met également en relief cette latence d'action à 6°C. Les solvants organiques tels que le formaldéhyde, le chloroforme, l'acétone, l'hexane, l'isobutanol, le méthanol et le diéthyléther n'ont aucun effet sur le pouvoir antagoniste des surnageants concentrés de cultures de bifidobactéries vis-à-vis des deux germes pathogènes testés. Ceci laisse penser que ces solvants ne dénaturent pas les substances protéiques à activité antagoniste (i.e. bactériocine-like). Les souches bifides testées synthétisent plus d'acide acétique que d'acide lactique et ceci dans un rapport molaire variable de 1.74 à 1.99.

Mots clefs : Bifidobactéries- Antagonisme- *Staphylococcus aureus*- *Bacillus cereus*.

Abstract

The aim of the present work was to assess three experimental (isolated from stools of exclusively breast-fed infants : Bbv1, Bbv2 and BLE) and one reference (BLR) bifidobacteria strains on the basis of their antagonistic activity against two pathogen bacteria *Staphylococcus aureus* 49444 and *Bacillus cereus* ATCC 9884 using two methods: the first one consist of an associated cell culture of the two types of bacteria at 37°C, and the second one was done with contact of concentrated bifidobacteria supernatant and the pathogen bacteria at 37 and 6°C. The effect of some organic solvents on the antagonistic activity of bifidobacteria strains against *S. aureus* and *B. cereus* was also investigated. Organic acids (acetic and lactic acids) levels were determined using HPLC method. The obtained results have shown that the antagonistic activity of the concentrated bifidobacteria supernatants towards *S. aureus* and *B. cereus* at 37°C was higher than that observed with the associated cultures of the two types of cells. At low temperature (6°C), antagonistic activity of the concentrated bifidobacteria supernatants against *S. aureus* and *B. cereus* was markedly reduced and spread out since no more than 60% of viable cells were inhibited after 48h of contact. Inhibition rate of the two pathogens by the concentrated bifidobacteria supernatants also brings out this reduced antagonistic activity at lower temperature (6°C). Organic solvents such as formaldehyde, chloroform, acetone, hexane, isobutanol, methanol and ether-diethyl did not show any effect on the antagonistic activity of the concentrated bifidobacteria supernatants towards *S. aureus* and *B. cereus* suggesting that these solvents did not denaturate the protein compounds having an inhibitory power (i.e. bacteriocin-like). Production of acetic acid by Bifidobacteria strains was higher than that of lactic acid in a ratio ranging from 1.74 to 1.99.

Keys words: Bifidobacteria- Antagonism- *Staphylococcus aureus*- *Bacillus cereus*.

Liste des tableaux

CHAPITRE I: PROBIOTIQUES

Tableau 1 :	Espèces de lactobacilles et de bifidobactéries utilisées comme probiotiques (Vaughan et al., 2002).....	5
Tableau 2:	Effets bénéfiques de souches probiotiques commerciales chez l'homme (Woodcock et al., 2004).	15
Tableau 3:	Spectre d'effet antimicrobien de la bifidocine B (Yildirim, 1998).....	25
Tableau 4:	Effets des bifidobactéries aux différents stades du cancer (Le leu et al., 2005).	26
Tableau 5 :	Effets comparés de cinq différents laits fermentés et de deux laits témoins, l'un non fermenté et l'autre sans supplément sur la survie des souris infectées par <i>Salmonella Typhimurium</i> (Paubert-Braquet, et al., 1995). ...	30

CHAPITRE II : *Bifidobacterium*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

Tableau 6 :	Différentes espèces de bifidobactéries identifiées à ce jour (Euzéby, 2005).....	37
Tableau 7 :	Comportement de diverses bactéries pathogènes en fonction du pH, de la température et de l'activité de l'eau (a _w) (conditions de toxinogénèse) (Guiraud, 1998).....	43
Tableau 8 :	La composition en acides gras de <i>B. cereus</i> LWL1 en croissance sous différentes températures (Abriouel et al., 2002)... ..	52

CHAPITRE III. BACTERIOCINES, TOXINES ET ANTAGONISME.

Tableau 9 :	Résumé des propriétés des bactériocines (Baba & Schneewind, 1998).	55
Tableau 10 :	Principales caractéristiques chimiques et physicochimiques de certaines bactériocines de type lantibiotiques produites par certaines bactéries lactiques (De Vuyst & Vandamme, 1994).....	58
Tableau 11 :	Inhibition des microorganismes par <i>Pediococcus cerevisiae</i> FBB-61 cultivée sur agar (Fleming et al., 1975).	62
Tableau 12 :	Effet de la température d'incubation sur la production des cereulides par <i>B. cereus</i> NC7401 (Hagblom et al., 2002)... ..	69
Tableau 13 :	Exemples de produits utilisés comme additifs alimentaire: (Cope et al., 2004).	71
Tableau 14 :	Effet d'une seule bactériocine ou de deux bactériocines associées sur la croissance de <i>S. aureus</i> (Jamuna et al., 2005).....	73

Tableau 15:	Activité antimicrobienne des souches <i>Lactobacillus curvatus</i> L442 et <i>Leuconostoc mesenteroides</i> L124 vis-à-vis de quelques souches de <i>Listeria</i> (Mataragas et al., 2003).	77
Tableau 16:	Effet d'une seule bactériocine ou de deux bactériocines associées sur la croissance de <i>L. monocytogenes</i> (Jamuna et al., 2005)..	78

CHAPITRE IV. MATERIELS ET METHODES.

Tableau 17:	Souches utilisées dans la présente expérimentation.....	81
Tableau 18:	Milieux de culture utilisés dans l'expérimentation.....	81

CHAPITRE V. RESULTATS ET DISCUSSION.

Tableau 19:	Cinétique d'inhibition de la viabilité de <i>S. aureus</i> (en % de cellules inhibées) cocultivé à 37°C avec les différentes souches de bifidobactéries.....	88
Tableau 20:	Vitesse d'inhibition (=VI) de la viabilité de <i>Staphylococcus aureus</i> 49444 en coculture avec les différentes souches de bifidobactéries à 37°C. (VI est exprimée en % cellules inhibées / h)	93
Tableau 21:	Cinétique d'inhibition de la viabilité de <i>S. aureus</i> (exprimée en % de cellules inhibées) cultivé à 37°C en présence des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries.....	94
Tableau 22:	Vitesse d'inhibition (VI) de la viabilité de <i>Staphylococcus aureus</i> 49444 soumis à l'antagonisme des surnageants concentrés de différentes souches de bifidobactéries à 37°C. (VI est exprimée en % cellules inhibées / h)	98
Tableau 23:	Cinétique d'inhibition de la viabilité de <i>S. aureus</i> (exprimée en % de cellules inhibées) cultivé en présence des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 6°C.	101
Tableau 24:	Rapports entre pourcentage d'inhibition à 37°C et à 6°C de la viabilité de <i>S. aureus</i> cultivé en présence de surnageants concentrés de bifidobactéries.....	101
Tableau 25:	Vitesse d'inhibition (VI) de la viabilité de <i>Staphylococcus aureus</i> 49444 soumis à l'antagonisme des surnageants concentrés de différentes souches de bifidobactéries à 6°C (VI est exprimée en % cellules inhibées / h).	106
Tableau 26:	Cinétique d'inhibition de la viabilité de <i>B. cereus</i> ATCC 9884 (exprimée en % cellules inhibées) cocultivé à 37°C avec les différentes souches de bifidobactéries.	113
Tableau 27:	Vitesse d'inhibition (VI) de la viabilité de <i>Bacillus cereus</i> ATCC 9884 en coculture à 37°C avec les différentes souches de bifidobactéries (VI est exprimée en % cellules inhibées / h)... ..	115

<u>Tableau 28 :</u>	Cinétique d'inhibition de la viabilité de <i>B. cereus</i> ATCC 9884 (exprimé en % de cellules inhibées) soumis à l'antagonisme des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 37°C.	118
<u>Tableau 29 :</u>	Vitesse d'inhibition (VI) de la viabilité de <i>Bacillus cereus</i> ATCC 9884 soumis à l'antagonisme des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 37°C (VI est exprimée en % cellules inhibées).	122
<u>Tableau 30 :</u>	Cinétique d'inhibition de la viabilité de <i>B. cereus</i> ATCC 9884 (exprimée en % cellules inhibées) soumis à l'antagonisme des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 6°C.....	123
<u>Tableau 31 :</u>	Vitesse d'inhibition (VI) de la viabilité de <i>Bacillus cereus</i> ATCC 9884 soumis à l'antagonisme des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 6°C. (VI est exprimée en % cellules inhibées/ h).	130
<u>Tableau 32 :</u>	Les temps de rétention et les concentrations d'acide lactique et acétique synthétisé par des différentes souches de bifidobactéries obtenus par HPLC.....	138

Liste des figures

CHAPITRE I : PROBIOTIQUES

- Fig. 1: Les différents métabolites synthétisés par les bactéries lactiques (Deegan et al., 2006). 20

CHAPITRE II : *Bifidobacterium*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

- Fig. 2. Morphologie cellulaire de quelques espèces du genre *Bifidobacterium* (Tamime et al., 1995). 33
- Fig. 3: Fermentation du glucose par *Bifidobacterium* (Bourgeois et Larpent, 1996). 34
- Fig. 4 : *Staphylococcus aureus* sur un sol en PVC avec une poussière (Kaltenbach & Heitz 2004). 44
- Fig. 5: Aspect d'un syndrome de peau échaudée aux Staphylocoques (ou SSSS) généralisé chez un enfant de deux ans (Ladhani, 2003)..... 49

CHAPITRE III. BACTERIOCINES, TOXINES ET ANTAGONISME.

- Fig. 6: Structure de la nisine (Hechard, & Sahl, 2002). 59
- Fig. 7: Modèle général de formation de pores par les bactériocines (McAuliffe et al., 2001). 60

CHAPITRE V. RESULTATS ET DISCUSSION.

- Fig. 8: Diamètres des zones d'inhibition de *S. aureus* (en mm) confronté aux différentes souches de bifidobactéries après 24h de coculture sur milieu solide à 37°C (technique de Fleming et al., 1975)..... 87
- Fig. 9: Zones d'inhibition (halots clairs) de *S. aureus* confronté aux différentes souches de bifidobactéries après 24h de coculture sur milieu solide à 37°C (technique de Fleming et al., 1975)..... 87
- Fig. 10: Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 2h de coculture à 37°C avec un rapport bifidobactéries / *S. aureus* de 2 / 1
Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de souches bifides..... 89
- Fig. 11: Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 4h de coculture à 37°C dans un rapport bifidobactéries / *S. aureus* de 2 / 1.
Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de souches bifides..... 89

Fig. 12 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 6h de coculture à 37°C avec un rapport bifidobactéries / <i>S. aureus</i> de 2 / 1 Témoin : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de souches bifides.....	90
Fig. 13 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 12h de coculture à 37°C avec un rapport bifidobactéries / <i>S. aureus</i> de 2 / 1. Témoin : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de souches bifides.....	90
Fig. 14 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 24h de coculture à 37°C avec un rapport bifidobactéries <i>S. aureus</i> de 2 / 1. Témoin : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de souches bifides.....	92
Fig. 15 :	Cinétique d'inhibition des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries durant 36h de coculture à 37°C avec un rapport bifidobactéries / <i>S. aureus</i> de 2 / 1.	92
Fig. 16 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 2h de contact à la température de 37 °C. Témoin : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	95
Fig. 17 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 4h de contact à la température de 37 °C. Témoin : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	95
Fig. 18 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 6h de contact à la température de 37 °C. Témoin : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	97
Fig. 19 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 12h de contact à la température de 37°C. Témoin : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	97

Fig. 20 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 24h de contact à la température de 37°C. Témoïn : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	99
Fig. 21 :	Cinétique d'inhibition des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries durant 36h de contact à 37°C.	99
Fig. 22 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 2h de contact à la température de 6 °C. Témoïn : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	102
Fig. 23 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 4h de contact à la température de 6 °C. Témoïn : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	102
Fig. 24 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 6h de contact à la température de 6 °C. Témoïn : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	104
Fig. 25 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 12h de contact à la température de 6 °C. Témoïn : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	104
Fig. 26 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 24h de contact à la température de 6°C. Témoïn : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	105
Fig. 27 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 36h de contact à la température de 6 °C. Témoïn : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de souches bifides.....	105
Fig. 28 :	Viabilité des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 48h de contact à la température de 6 °C. Témoïn : - Culture pure de <i>S. aureus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	107

Fig. 29 : Cinétique d'inhibition des cellules de <i>S. aureus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries durant 36h de contact à 6°C.....	107
Fig. 30 : Diamètres des zones d'inhibition de <i>S. aureus</i> 49444 (en mm) confronté pendant 24h à 37°C aux surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries.	109
Fig. 31 : Diamètres des zones d'inhibition de <i>B. cereus</i> (en mm) confronté aux différentes souches de bifidobactéries après 24h de coculture sur milieu solide à 37°C (technique de Fleming et al., 1975).....	110
Fig. 32 : Zones d'inhibition (halots clairs) de <i>B. cereus</i> confronté aux différentes souches de bifidobactéries après 24h de coculture sur milieu solide à 37°C (technique de Fleming et al., 1975).....	110
Fig. 33 : Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 2h de coculture à 37°C dans un rapport cellulaire de bifidobactéries / <i>B. cereus</i> de 2 / 1. Témoin : - Culture de <i>B. cereus</i> en absence de souches bifides....	112
Fig. 34 : Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 4h de coculture à 37°C dans un rapport cellulaire de bifidobactéries / <i>B. cereus</i> de 2 / 1. Témoin : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de souches bifides.....	112
Fig. 35 : Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 6h de coculture à 37°C dans un rapport cellulaire de bifidobactéries / <i>B. cereus</i> de 2 / 1. Témoin : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de souches bifides.....	114
Fig. 36 : Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 12h de coculture à 37°C dans un rapport cellulaire de bifidobactéries / <i>B. cereus</i> de 2 / 1. Témoin : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de souches bifides.	114
Fig. 37 : Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 24h de coculture à 37°C dans un rapport cellulaire de bifidobactéries / <i>B. cereus</i> de 2 / 1. Témoin : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de souches bifides.....	116
Fig. 38 : Cinétique d'inhibition des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries durant 36 h de coculture à 37°C.	116

Fig. 39 :	Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 2h de contact à la température de 37 °C. Témoin : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	119
Fig. 40 :	Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 4h de contact à la température de 37°C. Témoin : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	119
Fig. 41 :	Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 6h de contact à la température de 37°C. Témoin : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	120
Fig. 42 :	Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 12h de contact à la température de 37°C. Témoin : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	120
Fig. 43 :	Cinétique d'inhibition des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés de différentes souches de bifidobactéries durant 36 heures de contact à 37°C.	122
Fig. 44 :	Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 2h de contact à la température de 6 °C. Témoin : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	125
Fig. 45 :	Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 4h de contact à la température de 6 °C. Témoin : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	125
Fig. 46 :	Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 6h de contact à la température de 6 °C. Témoin : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	126
Fig. 47 :	Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 12h de contact à la température de 6°C. Témoin : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	126

Fig. 48 :	Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 24h de contact à la température de 6 °C. Témoign : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	128
Fig. 49 :	Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 36h de contact à la température de 6°C. Témoign : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	128
Fig. 50 :	Viabilité des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 48h de contact à la température de 6 °C. Témoign : - Culture pure de <i>B. cereus</i> en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.....	129
Fig. 51 :	Cinétique d'inhibition des cellules de <i>B. cereus</i> (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés de différentes souches de bifidobactéries durant 36h de contact à 6°C	129
Fig. 52 :	Diamètres des zones d'inhibition de <i>S. aureus</i> (en mm) obtenus par la technique de l'Agar spot (méthode de Fleming et al., 1975) en testant l'effet inhibiteur du MRS comme témoin et des surnageants concentrés des cultures des souches de bifidobactéries à 37°C	132
Fig. 53 :	Diamètres des zones d'inhibition de <i>S. aureus</i> (en mm) obtenus par la technique de l'Agar spot (méthode de Fleming et al., 1975) en testant l'effet inhibiteur du MRS comme témoin et des surnageants concentrés des cultures des souches de bifidobactéries traités■ et non traités■ par le formaldéhyde (A), le chloroforme (B), l'acétone (C) et l'hexane (D).....	133
Fig. 54 :	Diamètres des zones d'inhibition de <i>S. aureus</i> (en mm) obtenus par la technique de l'Agar spot (méthode de Fleming et al., 1975) en testant l'effet inhibiteur du MRS comme témoin et des surnageants concentrés des cultures des souches de bifidobactéries traités■ et non traités■ par l'isobutanol (A) le méthanol, (B) et le diéthyl éther (C).	134
Fig. 55:	Diamètres des zones d'inhibition de <i>B. cereus</i> (en mm) obtenus par la technique de l'Agar spot (méthode de Fleming et al., 1975) en testant l'effet inhibiteur du MRS comme témoin et des surnageants concentrés des cultures des souches de bifidobactéries traités■ et non traités■ par le formaldéhyde (A), le chloroforme (B), l'acétone (C) et l'hexane (D).	135

- Fig. 56 :** Diamètres des zones d'inhibition de *B. cereus* (en mm) obtenus par la technique de l'Agar spot (méthode de Fleming et al., 1975) en testant l'effet inhibiteur du MRS comme témoin et des surnageants concentrés des cultures des souches de bifidobactéries traités ■ et non traités ■ par l'isobutanol, le méthanol, (B) et le diéthyl éther (C). 136
- Fig. 57:** Chromatogramme d'HPLC des acides organiques à une longueur d'onde optimisée à 220 nm d'une injection de 20 µl d'une solution étalon d'acide acétique (0.1 M/l) et lactique (0,1 M/l) (A), d'un échantillon préparé par addition de 100 µl d'HNO₃ 15.8N et 14.9 ml d'H₂SO₄ 9. 10⁻³N à 1.5 ml de surnageants non concentrés d'une culture de 48h de la souche bifide Bbv1 (B), Bbv2 (C), BLE (D) et BLR (E) sur colonne C18 parcourue par une phase mobile contenant H₂SO₄ 0.01N filtré à 0.22 µm et utilisé à la pression de 0.6ml/min..... 139

Table des matières

Introduction.....	1
Chapitre I : Probiotiques	
I.1. Définition et généralités	4
I.2. Populations microbiennes du tractus gastro-intestinal humain.....	4
I.3. Les effets des probiotiques sont-ils spécifiques à la souche, à l'espèce ou au genre?.....	7
I.4. Critères de sélection des probiotiques.....	7
I.5. Formes vectrices des probiotiques à l'état vivant.....	8
I.5.1. Les aliments fermentés.....	9
I.5.1.1. Les produits laitiers.....	9
I.5.1.2. Les produits carnés.....	9
I.5.2. Les aliments non fermentés.....	10
I.5.3. Les encapsulations.....	10
I.6. Comportement des probiotiques dans l'aliment vecteur avant ingestion....	10
I.6.1. Comportement des probiotiques sur milieu lait.....	11
I.6.2. La viabilité des probiotiques.....	11
I.6.3. Le pH.....	12
I.6.4. L'Oxygène.....	12
I.6.5. Les qualités organoleptiques.....	13
I.6.6. L'entreposage.....	13
I.7. Comportement des probiotiques après ingestion (durant le transit digestif)	14
I.7.1. Stabilité envers l'acidité gastrique et la bile.....	16
I.7.2. Faculté d'adhésion à la muqueuse intestinale.....	17
I.7.3. Colonisation du tractus intestinal humain.....	18
I.8. Effets des probiotiques sur la santé humaine.....	19
I.8.1. Production de substances antimicrobiennes.....	19
I.8.2. Effet immunostimulateur.....	21
I.8.3. Effet antagoniste	23
I.8.4. Effet anticarcinogène.....	24
I.8.5. Effet sur l'intolérance au lactose.....	27
I.8.6. Effet hypocholestérolémiant.....	28
I.9. La survie des bactéries probiotiques dans la lumière intestinale.....	29
I.10. Combinaison de souches probiotiques.....	29
Chapitre II : <i>Bifidobacterium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Bacillus cereus</i>	
II.1. <i>Bifidobacterium</i>	31
II.1.1. Taxonomie.....	31
II.1.2. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des bifidobactéries.....	32
II.1.2.1. Morphologie.....	32
II.1.2.2. Métabolisme.....	33

II.1.3. Niche écologique des bifidobactéries.....	33
II.1.4. Principales espèces du genre Bifidobacterium	36
II.1.6. Effets probiotiques des bifidobactéries.....	36
II.1.7. Incorporation des bifidobactéries dans les produits laitiers	38
II.1.8. Les bifidobactéries en tant qu'agents aromatisants.....	40
II.1.9. Les bifidobactéries comme indicateurs de contamination fécale.....	42
II.2. Staphylococcus aureus	42
II.2.1. Caractères microbiologiques	42
II.2.2. Nature et symptomatologie de l'infection.....	44
II.2.3. Nature des toxines secrétées.....	45
II.2.4. Diagnostic et fréquence de l'infection.....	46
II.2.5. Les aliments contaminés.....	47
II.2.6. Responsabilité de Staphylococcus aureus dans les différentes symptomatologies.	47
II.2.6.1. Les diarrhées associées aux antibiotiques (DAA)	47
II.2.6.2. Syndrome de peau échaudée aux staphylocoques.....	48
II.3. Bacillus cereus	49
II.3.1. Caractères microbiologiques	49
II.3.2. Nature et symptomatologie de l'infection.....	50
II.3.3. Nature des toxines secrétées.....	50
II.3.4. Diagnostic et fréquence de l'infection.....	51
II.3.5. Les aliments contaminés.....	51

Chapitre III. Bactériocines, toxines et antagonisme

III.1. Bactériocines.....	53
III.1.1. Définition et historique.....	53
III.1.2. Nomenclature des bactériocines.....	54
III.1.3. Biosynthèse et sécrétion des bactériocines.....	56
III.1.4. Structure chimique des bactériocines.....	56
III.1.5. Classification des bactériocines.....	58
III.1.6. Mode d'action des bactériocines.....	59
III.1.7. Les bactériocines des bactéries lactiques.....	59
III.1.7.1. Bactériocines des Lactococcus	60
III.1.7.2. Bactériocines des Lactobacillus	61
III.1.7.3. Bactériocines des Pediococcus	62
III.1.7.4. Bactériocines des Leuconostoc	63
III.1.7.5. Bactériocines des Carnobacterium	63
III.1.7.6. Bactériocines des Enterococcus	63
III.1.8. Bactériocines des Bifidobacterium	64
III.1.9. Les différentes applications des bactériocines.....	64
III.1.9.1. Applications thérapeutiques.....	64
III.1.9.2. Applications alimentaires.....	65
III.1.10. Dégradation des bactériocines.....	66
III.2. Toxines microbiennes.....	66
III.2.1. Généralités.....	66

III.2.2. Types de toxines.....	67
III.2.2.1. Les exotoxines.....	67
III.2.2.1. Les endotoxines.....	68
III.2.3. Conditions de production des toxines.....	68
III.2.4. Recherche des toxines.....	69
III.2.5. Mode d'action des toxines.....	69
III.2.6. Comportement du tractus gastro-intestinal envers les toxines.....	70
III.2.7. Additifs alimentaires et contaminants chimiques.....	70
III.3. Antagonisme des bactéries probiotiques.....	70
III.3.1. Envers <i>Bacillus cereus</i>	72
III.3.2. Envers <i>Staphylococcus aureus</i>	72
III.3.3. Envers <i>Helicobacter pylori</i>	72
III.3.4. Envers <i>Salmonella</i>	74
III.3.5. Envers <i>E. coli</i>	75
III.3.6. Envers <i>Listeria</i>	76
III.3.7. Envers <i>Clostridium</i>	77
Chapitre IV. Matériels et méthodes	
IV.1. Nature et origine des souches.....	80
IV.1.1. La souche de référence <i>Bifidobacterium longum</i> (BLR)	80
IV.1.2. Les souches bifides expérimentales.....	80
IV.1.3. Les souches pathogènes	80
IV.2. Milieux et conditions de culture.....	80
IV.2.1. Choix des milieux de culture.....	80
IV.2.2- Les conditions de croissance.....	82
IV.2.2.1- Les bifidobactéries	82
IV.2.2.2- Les bactéries pathogènes	82
IV.3. Préparation des surnageants concentrés.....	82
IV.4. Mise en évidence de l'activité antagoniste des bifidobactéries.....	83
IV.4.1. Méthode du contact cellulaire.....	83
IV.4.1.1. Sur bouillon.....	83
IV.4.1.1. Sur Gélose.....	83
IV.4.2. Méthode de contact des surnageants concentrés (Fleming et <i>al.</i> , 1975).....	83
IV.4.3. Méthode de l'agar spot.....	84
IV.4.4. Contact des surnageants concentrés traités par les solvants organiques.....	84
IV.4.5. Dosage des acides lactique et acétique par HPLC.....	85
IV.4.6. Analyse statistique.....	85
Chapitre V. Résultats et discussion.	
V.1. Antagonisme des bifidobactéries vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	86
V.1.1. Mise en évidence rapide de l'antagonisme des bifidobactéries vis-à-vis de <i>S. aureus</i> en milieu solide.	86
V.1.2. Cinétique d'inhibition de <i>S. aureus</i> en coculture à 37°C avec les différentes souches de bifidobactéries.	86

V.1.3. Relation entre viabilité de S. aureus et durée de sa coculture avec les souches de bifidobactéries à 37°C.	91
V.1.4. Cinétique d'inhibition de S. aureus cultivé à 37°C en présence des surnageants concentrés de cultures des différentes souches de bifidobactéries.....	94
V.1.5. Relation entre viabilité de S. aureus et durée de son contact avec les surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 37°C.....	98
V.1.6. Cinétique d'inhibition de la viabilité de S. aureus cultivé à 6°C en présence des surnageants concentrés de différentes souches de bifidobactéries.....	100
V.1.7. Relation entre viabilité de S. aureus et durée son contact avec les surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 6°C.....	106
V.1.8. Viabilité globale de S. aureus soumise à l'action des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries par la technique par la technique d'Agar spot (méthode de Fleming et al., 1975)	108
V.2. Antagonisme des bifidobactéries vis-à-vis de B. cereus ATCC 9884.....	109
V.2.1. Etendue des zones d'inhibition de B. cereus cocultivé 24h avec les différentes souches de bifidobactéries selon la technique Fleming et al. (1975)	109
V.2.2. Cinétique d'inhibition de B. cereus ATCC 9884 en coculture à 37°C avec les souches de bifidobactéries.....	111
V.2.3. Relation entre viabilité de B. cereus ATCC 9884 et durée de coculture avec les différentes souches de bifidobactéries à 37°C.....	115
V.2.4. Cinétique d'inhibition de la viabilité de B. cereus ATCC 9884 cocultivé à 37°C en présence des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries.	117
V.2.5. Relation entre viabilité de B. cereus ATCC 9884 et durée de son contact avec les surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 37°C.....	121
V.2.6. Cinétique d'inhibition de la viabilité de B. cereus ATCC 9884 cultivé à 6°C en présence des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries.	123
V.2.7. Relation entre viabilité de B. cereus ATCC 9884 et durée de son contact avec les surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 6°C.....	127
V.2.8. Viabilité globale de B. cereus ATCC 9884 soumis à l'action des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries par la technique de l'agar spot (méthode de Fleming et al., 1975).	131
V.3. Effet des solvants organiques sur l'activité inhibitrice des surnageants concentrés de cultures de bifidobactéries vis-à-vis de S.aureus et B. cereus .	131
V.4. Activité de synthèse d'acides organiques.....	137

Conclusion

Références bibliographiques

Introduction

INTRODUCTION

Depuis toujours, les bactéries ont été présentes dans notre alimentation. Certaines d'entre elles, dont les bactéries lactiques, sont utiles, d'autres comme les bactéries pathogènes ne le sont pas en raison des nombreux problèmes d'intoxications alimentaires et maladies qu'elles occasionnent, ainsi que des multiples altérations des denrées alimentaires qu'elles provoquent. Par conséquent, la préservation de l'innocuité alimentaire constitue une alerte permanente.

Parmi les nombreux moyens adoptés par l'homme pour faire face à ces microorganismes d'altération, l'application du froid donna une grande satisfaction et révéla le spectre des germes pathogènes psychrophiles (Noterman *et al.*, 1990 ; Palumbo, 1987). Les consommateurs d'aujourd'hui désirent des aliments les moins modifiés possible tout en démontrant une grande qualité et une bonne fraîcheur (Daeschel, 1989). Aux Etats-Unis, la tendance est à l'augmentation de la durée de commercialisation de certains aliments, en particulier les viandes et les produits camés, tout en réduisant l'usage d'agents antibactériens chimiques comme les nitrites (Richard, 1996).

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fabrication d'aliments fermentés depuis plusieurs siècles. En plus d'améliorer la saveur, la fermentation permet d'augmenter la durée de conservation du produit. En 1908 Metchnikoff fut le premier à observer l'effet bénéfique du lait fermenté sur la santé des bulgares, et c'est ainsi qu'il proposa de renforcer la microflore intestinale par celle du yaourt (Holzapfel *et al.*, 2001).

Les bifidobactéries, originaires du tube digestif, constituent un autre groupe de microorganismes qui intéresse l'homme en raison des nombreux effets bénéfiques qu'elles lui procurent et du potentiel antagoniste qu'elles recèlent. Elles font l'objet d'une recherche permanente visant à mieux les domestiquer et les adapter aux nombreuses contraintes de l'industrie alimentaire. Un certain nombre de souches lactiques et bifides répondent aux critères de sélection en tant que probiotiques tels qu'ils ont été définis par Saarela *et al.* (2000). Ces souches produisent des métabolites à activité antagoniste pouvant être de nature protéique (ie : bactériocines) et non protéique (peroxyde d'hydrogène, dioxyde de carbone, diacétyle, acétaldéhyde, acides organiques, antibiotiques).

La découverte des bactériocines remonte à 1933, époque à laquelle Whitehead et ses collaborateurs isolèrent un composé à action antibiotique de nature protéique : la nisine.

Depuis, plusieurs autres bactériocines ont été découvertes. Hirsch, en 1951, proposa l'utilisation de la nisine en tant qu'agent de biopréservation alimentaire.

La nisine est acceptée comme biopréservateur dans 46 pays à travers le monde, dont les États-Unis ([Delves-Broughton, 1990](#)). En 1988, la FDA (Food and Drug Administration) américaine a attribué à la nisine le statut de «GRAS» (Generally Recognized As Safe ou bien «innocuité généralement reconnue»).

Les perspectives d'avenir concernant l'application des bactériocines ne se limitent pas aux aliments. Les industries cosmétiques et pharmaceutiques pourraient éventuellement offrir des produits contenant des bactériocines ([Ryan et al., 1998](#)).

La recherche de nouvelles bactériocines permettra de combattre plus efficacement les diverses bactéries nuisibles ou pathogènes. L'antibiorésistance reste un phénomène préoccupant, et c'est pourquoi de nouveaux antibiotiques sont constamment recherchés. Cela s'applique aussi aux bactériocines puisque la sélection de bactéries devenues résistantes à ces peptides est possible. L'aspect de cette thématique ayant fait l'objet de la présente expérimentation vise les objectifs suivants :

1. La mise en évidence de l'activité antagoniste de souches de bifidobactéries issues de la collection du laboratoire de sécurité alimentaire et santé vis-à-vis de deux germes pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*).
2. Effets des solvants organiques et de la basse température (+6°C) sur l'activité antagoniste des surnageants de cultures bifides.
3. Dosage des acides organiques (acétate et lactate) par HPLC.

Revue Bibliographique

Chapitre I

Probiotiques

CHAPITRE I : PROBIOTIQUES

I.1. Définition et généralités

De nos jours, c'est la définition de [Fuller \(1989\)](#) qui prédomine : « un probiotique est un microorganisme vivant apporté sous forme de supplément alimentaire qui affecte de façon bénéfique la santé de l'hôte en améliorant l'équilibre de sa microflore intestinale ». Cette définition a, par la suite, évolué et s'étend maintenant à d'autres effets tels que l'immunomodulation ([Takagi et al., 2001](#)).

Les aliments fermentés sont depuis des siècles considérés comme sains et bénéfiques pour la santé. [Metchnikoff \(1908\)](#) (cité par [Guiliams, 1999](#)) fut le premier à rapporter que des patients bulgares qui consommaient de grandes quantités de lait fermenté avaient une longévité plus grande. Suite à cette observation, il avait essayé de modifier la microflore du côlon par l'ingestion de lait sucré par un bacille nommé Bulgarian bacillus ([Holzapfel et al., 2001](#)).

L'accumulation rapide des connaissances sur les effets bénéfiques des probiotiques a suscité un intérêt croissant pour leur incorporation dans divers types de produits alimentaires ([Matto et al., 2006](#)). Actuellement, plus de 90 produits probiotiques sont disponibles sur le marché dans le monde ([Thamaraj et Shah 2003](#)). Les bactéries probiotiques les plus utilisées dans l'alimentation humaine sont des lactobacilles et des bifidobactéries ([Tableau 1](#)) ([Vaughan et al., 2002](#)). Ces probiotiques sont véhiculés par des produits lactés fermentés ou administrés sous forme de suppléments alimentaires, et une fois dans le tube digestif, ils interagissent avec la flore intestinale, les cellules épithéliales intestinales et, dans une moindre mesure, avec les cellules immunitaires situées dans la *lamina propria* de l'intestin grêle et du côlon ([Collado et al., 2005a](#)).

I.2. Populations microbiennes du tractus gastro-intestinal humain

À la naissance, le tube digestif est stérile et il est vite colonisé par une population bactérienne qui dépend en partie de la flore vaginale et fécale maternelle où prédominent des germes anaérobies facultatifs ([Rasic et Kurmann, 1983](#)).

Cette colonisation est indépendante de l'alimentation pendant les premières 48 heures et elle est retardée chez les enfants nés par césarienne en ce qui concerne les anaérobies (bifidobactéries et lactobacilles) ([Gonzalez et al., 1990](#)).

La flore intestinale du nouveau-né allaité exclusivement au sein se compose

Tableau 1 : Espèces de lactobacilles et de bifidobactéries utilisées comme probiotiques (Vaughan et al., 2002).

Lactobacilles		Bifidobactéries
<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. jensenii</i> *	<i>B. adolescentis</i> *
<i>L. acidophilus</i> *	<i>L. johnsonii</i>	<i>B. angulatum</i> *
<i>L. agilis</i>	<i>L. kandleri</i>	<i>B. animalis</i>
<i>L. alimentarius</i>	<i>L. kefir</i>	<i>B. asteroides</i>
<i>L. amylophilus</i>	<i>L. kefiranoferens</i>	<i>B. bifidum</i> *
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. malefermentans</i>	<i>B. boum</i>
<i>L. avarius</i>	<i>L. mali</i>	<i>B. breve</i> *
<i>L. bifementans</i>	<i>L. minor</i>	<i>B. catenulatum</i> *
<i>L. brevis</i> *	<i>L. murinus</i>	<i>B. choerinum</i>
<i>L. buchneri</i> *	<i>L. oris</i> *	<i>B. coryneforme</i>
<i>L. casei ssp. casei</i> *	<i>L. parabuchneri</i> *	<i>B. cuniculi</i>
<i>L. collinoides</i>	<i>L. paracasei</i> *	<i>B. dentium</i> *
<i>L. confusus</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>B. gallicum</i>
<i>L. coryniformis</i>	<i>L. pontis</i>	<i>B. gallinarum</i>
<i>L. crispatus</i> *	<i>L. plantarum</i> *	<i>B. globosum</i> *
<i>L. curvatus</i> *	<i>L. reuteri</i> *	<i>B. indicum</i>
<i>L. delbrueckii</i> *	<i>L. rhamnosus</i> *	<i>B. infantis</i> *
<i>L. farciminis</i>	<i>L. ruminis</i> *	<i>B. lactis</i>
<i>L. fermentum</i> *	<i>L. sakei</i> *	<i>B. longum</i> *
<i>L. fructivorans</i> *	<i>L. salivarius</i> *	<i>B. magnum</i>
<i>L. fructosus</i>	<i>L. sanfrancisco</i>	<i>B. merycicum</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. sharpeae</i>	<i>B. minimum</i>
<i>L. gasseri</i> *	<i>L. suebicus</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i> *
<i>L. graminis</i>	<i>L. vacciniostercus</i>	<i>B. pseudolongum</i>
<i>L. halotolerans</i>	<i>L. vaginalis</i> *	<i>B. pullorum</i>
<i>L. hamsteri</i>	<i>L. viridescens</i>	<i>B. ruminantium</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>B. saeculare</i>
<i>L. hilgardii</i>		<i>B. subtile</i>
<i>L. homohiochii</i>		<i>B. suis</i>
<i>L. intestinalis</i>		<i>B. thermophilum</i>

* Espèces d'origine humaine

presque uniquement de bifidobactéries (95% de sa flore totale) et accessoirement de bactéroïdes et de *Clostridium* (O’Riordan et Fitzgerald, 1998).

L’implantation des bifidobactéries dépend des conditions environnementales et de la prescription éventuelle d’antibiotiques (Hoover, 1993). Toutefois, avec l’âge, on observe une modification de la flore qui serait en partie imputable à l’évolution du régime alimentaire (Molkhou, 2004).

Chez l’adulte, la distribution des espèces bactériennes diffère dans les compartiments du tube digestif. Une population moins dense est observée dans l’estomac et le duodénum (10^3 - 10^5 ufc/g de contenu) en raison des conditions acides, alors qu’une population plus diversifiée et plus dense est observée dans le jéjunum et l’iléum (10^8 cfu/g).

Le colon est la partie la plus colonisée du tube digestif avec 10^{11} ufc/g et plus de 400 espèces différentes (Fuller et Gibson, 1997). La flore dominante est constituée de bactéroïdes, on y retrouve aussi des bifidobactéries, des clostridies, des streptocoques, des eubactéries, des lactobacilles, des entérocoques, des coliformes et des bactéries sulfito-réductrices dans des proportions différentes (Fooks et al., 1999). L’important rôle défensif de l’intestin repose sur 3 composantes : la microflore, la barrière mucosale et le système immunitaire local (Bourlioux et al., 2003).

Néanmoins, la composition de la microflore intestinale d’un adulte, qui est relativement stable au cours du temps, reste spécifique pour chaque individu (Mackie et al., 1999).

I.3. Les effets des probiotiques sont-ils spécifiques à la souche, à l’espèce ou au genre?

Marteau et Shanahan (2003) ont montré que la survie de *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei* et de *L. johnsonii* dans l’intestin grêle et/ou le tube digestif entier de l’homme est différente. Linaje et al., (2004) précisent qu’au sein d’une même espèce, seules certaines souches sont parfois capables de synthétiser des bactériocines.

D’autres travaux (Beviellcqua et al., 2003 ; Santos et al., 2003 ; Gagnon et al., 2004) ont rapporté des différences dans les propriétés antimicrobiennes de diverses souches de bifidobactéries ou de lactobacilles. Ces différences portent aussi sur l’adhésion de ces bactéries à des cellules épithéliales modèles comme les Caco-7

(Tumuola et Salminen 1998) ou au mucus (Ouwehand *et al.*, 2001).

L'impact d'un probiotique sur le système immunitaire varie non seulement en fonction de l'espèce bactérienne, mais aussi, de son état de viabilité (Gill et Rutherford *et al.*, 2001), et de l'intensité de son métabolisme (Donnet-Hughes *et al.*, 1999).

Cette diversité des propriétés probiotiques des innombrables souches est généralement exploitée par les industriels pour la sélection des meilleures espèces. Par exemple, *L. rhamnosus* GG a été sélectionné pour ses propriétés de résistance à l'acide et à la bile et a, par la suite, manifesté des propriétés spécifiques *in vivo* par rapport à d'autres lactobacilles (Gorbach, 2002).

I.4. Critères de sélection des probiotiques

Plusieurs études rapportent la faible viabilité des bactéries probiotiques dans les aliments préparés (Shah *et al.*, 1995). La survie et la croissance des micro-organismes dans un aliment n'est pas affectée uniquement par sa composition chimique et les conditions de stockage mais également par sa structure (Wilson, *et al.*, 2002).

L'effet de la structure des aliments comprend la distribution mécanique de l'eau (Hills *et al.*, 1997) et la redistribution chimique des acides organiques (Wilson, *et al.*, 2002). Il est donc important de sélectionner une souche bactérienne peu affectée par les contraintes industrielles (Dave et Shah 1997). Collins *et al.*, (1998) ont suggéré une liste de 12 critères qui devraient être retenus lors de la sélection des souches probiotiques :

- bonne croissance sur milieu lait,
- fiabilité pendant le processus,
- résistance aux phages,
- bonnes propriétés de flaveur et de texture,
- stabilité dans le produit au cours du stockage,
- les souches doivent être isolées du tube digestif d'un individu sain,
- ne doivent pas être pathogènes,
- ne doivent pas avoir un lien avec des maladies infectieuses gastro-intestinales,
- ne doivent pas être porteuses de gènes de résistance aux antibiotiques,
- la résistance des souches sélectionnées à l'acide pour pouvoir survivre à l'hostilité gastrique,
- la résistance des souches à la salive et aux sels biliaires,
- leur bonne adhérence aux cellules épithéliales du tube digestif de l'être humain.

I.5. Formes vectrices des probiotiques à l'état vivant

L'acidité gastrique et les sécrétions bilio-pancréatiques constituent les principales causes endogènes d'inactivation des probiotiques ingérées. La protection contre l'acidité gastrique peut se faire par un passage rapide dans l'estomac ou en protégeant les bactéries en les couvrant par une forme vectrice.

Les vecteurs de probiotiques sont généralement divisés en deux grandes catégories : la première est celle des produits fermentés (surtout les produits laitiers) qui est la plus populaire à travers le monde et la deuxième est représentée par l'encapsulation de bactéries, pratique plus adoptée en Amérique du nord ([Leverrier et al., 2005](#)). Mais ceci n'exclue pas l'existence sur le marché d'aliments renfermant des probiotiques mais qui ne sont pas fermentés.

I.5.1. Les aliments fermentés

Les produits alimentaires fermentés véhiculant des probiotiques appartiennent à deux grands groupes : Les produits laitiers et les produits carnés.

I.5.1.1. Les produits laitiers

Des bactéries considérées comme probiotiques et comprenant *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus* et *Propionibacterium* sont incorporées aux produits laitiers. Etant donné que ces bactéries croissent lentement dans le lait destiné à être fermenté, elles sont utilisées en association avec les starters du yoghurt (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) ([Thamaraj et Shah, 2004](#)).

[Misra et Kuiba \(1992\)](#) ont constaté que le lait au bifidus est faiblement acidifié, en raison du faible pouvoir de croissance et d'adification du genre *Bifidobacterium* sur milieu lait.

I.5.1.2. Les produits carnés

Selon [Lücke \(2000\)](#), l'addition de micro-organismes désirables aux produits carnés peut avoir 4 objectifs :

- Amélioration de l'innocuité du produit carné (par l'inactivation des pathogènes),
- Amélioration de la stabilité du produit carné (augmentation de la durée de conservation par inhibition des changements indésirables causés par les microorganismes putréfiants),

- Diversification des propriétés sensorielles du produit carné par modification de la matière brute.

- Apport d'un effet bénéfique à l'organisme en assurant un meilleur équilibre de sa flore intestinale.

Le taux de cellules probiotiques ajoutées à la viande dépend de leur potentiel de croissance dans le produit. Ainsi, [Lücke \(2000\)](#) suggère l'addition de 10^6 cellules par gramme de produit, alors que dans le cas du probiotique *Lactococcus lactis*, [Coffey et al. \(1998\)](#) préconisent jusqu'à 10^8 germes/g pour avoir un effet désirable.

La formation *in situ* de bactériocines par des bactéries lactiques contribue à la dominance des souches productrices au dépens des autres souches durant la fermentation des saucisses ([Lücke, 2000](#)).

I.5.2. Les aliments non fermentés

Dans une étude réalisée par [Heenan et al. \(2004\)](#), des microorganismes probiotiques sont incorporés à un dessert congelé de soja sans laisser le temps de fermentation à un taux initial supérieur à 10^6 ufc/g qui a révélé une excellente survie de ces microorganismes et des caractéristiques sensorielles acceptables de ce produit.

I.5.3. Les encapsulations

L'encapsulation confère aux probiotiques une protection contre les taux élevés d'oxygène, le procédé de fabrication et les hostilités du tube digestif lorsqu'ils sont ingérés ([Picot et Lacroix, 2004](#)).

La technique d'encapsulation utilise un biopolymère non toxique pour les bactéries lactiques et pouvant assurer un taux de viabilité et une productivité cellulaire élevé. Les applications avec les bactéries lactiques font appel, en général, aux gels d'alginate ou de κ -carraghénane ([Champagne et al., 1994](#)). Le gel d'alginate est stabilisé par les ions Ca^{2+} qui ont l'inconvénient d'être complexés par les ions phosphates, lactates et citrates au cours de la fermentations lactique ([Groboillot et al., 1994](#)). Les gels de κ -carraghénane sont alors recommandés dans ces situations ([Audet et al., 1988](#)).

I.6. Comportement des probiotiques dans l'aliment vecteur avant ingestion

Dans la production commerciale, les souches qui se multiplient rapidement et qui ont peu d'exigences nutritives sont à favoriser, mais malheureusement, plusieurs

souches probiotiques ne répondent pas à ces critères.

Plusieurs facteurs affectent la survie des probiotiques (la nature de la souche probiotique utilisée, la présence d'autres microorganismes, les conditions de fabrication, le pH final du produit, les conditions d'entreposage, etc...) dans certains produits laitiers comme le yoghurt et les produits laitiers fermentés (Walker et al., 2005).

La viabilité des bifidobactéries est particulièrement affectée suite à la post-acidification des laits fermentés par les bactéries lactiques. Pour contrer ce problème plusieurs manufacturiers substituent la souche *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgoricus* par la souche *L. acidophilus*. Cette dernière causerait moins de post-acidification, mais l'utilisation de cette souche va prolonger le temps de fermentation dans la plupart des cas (Biavati et al., 1992).

I.6.1. Comportement des probiotiques sur milieu lait

Lactobacillus acidophilus et les bifidobactéries croissent lentement dans le lait durant le procès de fabrication du yoghurt, et c'est pour cela que l'on incorpore les culture bactériennes dites de yoghurt comme accompagnateurs (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*) (Dave et Shah, 1996).

Pour pallier à ce problème de déficit en croissance, plusieurs auteurs ont eut recours à l'utilisation de substances qui ont le potentiel de stimuler la croissance des bifidobactéries et dont les fructo-oligosacharides et les caseinomacropéptides font partie (Janer et al., 2004).

I.6.2. La viabilité des probiotiques

Le contrôle des produits probiotiques sur le marché révèle une déficience de la viabilité des souches probiotiques et ceci est particulièrement vrai dans le cas des produits contenant les bifidobactéries (Masco et al., 2005). Un probiotique doit non seulement survivre mais aussi rester métaboliquement actif pendant les dures conditions de fabrication de son vecteur (Leverrier et al., 2005).

L'interaction entre différentes souches lactiques et probiotiques peut stimuler ou inhiber la croissance et l'activité métabolique des bactéries probiotiques. Ces interactions devraient également être prises en compte pour sélectionner la meilleure combinaison de souches afin d'optimiser le procédé et la survie cellulaire dans le produit entreposé (Vinderola et al., 2002).

Une co-culture entre *L. fermentum* et *B. longum* peut offrir les nutriments ou les conditions qui maintiennent la viabilité de la souche bifide (Garro et al., 2004). Au cours de l'évaluation de la viabilité de souches probiotiques telles que *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium*, Dave et Shah (1997) avaient constaté que la viabilité de *L. acidophilus* était affectée par la présence de *Lactobucillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, alors que les souches de bifidobactéries démontraient une plus grande stabilité.

I.6.3. Le pH

Le facteur principal qui affecte la viabilité des microorganismes probiotiques est la baisse du pH faisant suite à l'accumulation des acides organiques issus de la fermentation (Shah, 2000). La tolérance des probiotiques à l'acidité est un facteur critique influençant leur fonctionnalité (Matto et al., 2006).

L'acidité de l'aliment vecteur peut causer une inhibition des bactéries lactiques sans modifier le métabolisme des sucres et la formation du produit (Garro et al., 2004). Par contre, Donkor et al. (2006) ont constaté que le déclin de la concentration des cellules au cours la période de conservation n'est pas dû au pH de fin de fermentation mais plutôt à la post-acidification du milieu. Taniguchi et al. (1987) ont observé que la concentration initiale de lactate et d'acétate qui freine la croissance des bactéries à gram positif est supérieure à 10g/l alors que celle acquise après post-acidification et qui provoque une inhibition totale est de 18g/l.

I.6.4. L'Oxygène

Plusieurs facteurs peuvent affecter la viabilité des probiotiques durant le stockage de l'aliment vecteur. Leur sensibilité à l'oxygène pose de réels problèmes de survie au cours de la fabrication et de l'entreposage (Bolduc et al., 2006). *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* tolère jusqu'à 10% dans le milieu (Meile et al., 1997) ; ce qui rend cette espèce plus adéquate à une utilisation industrielle par rapport à d'autres bifidobactéries (Masco et al., 2005 ; Collado et Sanz 2006).

I.6.5. Les qualités organoleptiques

Les ferments probiotiques sont définis comme étant des ferments composés de souches probiotiques telles les bifidobactéries et qui peuvent être utilisées seules mais plus souvent associées à d'autres bactéries (lactiques en l'occurrence) pour des raisons organoleptiques (Drouault et Corthier 2001) et technologiques, en particulier avec

L. acidophilus et/ou les ferments du yoghourt (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) (Saloff- Coste, 1997).

Au cours de la fermentation, les bactéries produisent des composés conférant à l'aliment ses propriétés organoleptiques comme l'acidité, la saveur, l'arôme et la texture. La qualité organoleptique est un critère essentiel dans les produits laitiers fermentés par les bactéries lactiques.

Le diacétyl et l'acétaldéhyde sont des composés intervenant fortement dans l'arôme des produits fermentés. En plus, la protéolyse due aux bactéries lactiques va surtout conduire à des peptides courts et à des acides aminés libres. Ces derniers sont des précurseurs d'arômes. Donc, les souches désignées pour l'industrie laitière doivent permettre l'obtention d'un lait fermenté ayant une bonne odeur et viscosité, ainsi qu'un meilleur goût (Saarela *et al.*, 2000).

La non production de saveurs à long terme est l'un des critères auxquels doit répondre une bactérie probiotique (Leverrier *et al.*, 2005).

I.6.6. L'entreposage

Lors de la fermentation lactique, différents composés impliqués dans la conservation des aliments sont synthétisés : acides organiques (lactate et acétate), diacétyl, peroxyde d'hydrogène et bactériocines ou polypeptides bactéricides (Lindgren *et Dobrogosz*, 1990).

La viabilité des souches et le maintien de leurs propriétés probiotiques au cours de l'entreposage du produit sont primordiaux (Iwana *et al.*, 1993 ; Shah *et al.*, 1995). C'est pourquoi que tous les efforts de sélection et d'entretien de souches probiotiques doivent être dirigés sur leur viabilité pendant l'entreposage.

Il semblerait que la température d'entreposage du yoghourt affecte la viabilité des bifidobactéries contrairement aux lactobacilles (Dave *et Shah* 1997).

I.7. Comportement des probiotiques après ingestion (durant le transit digestif)

Une fois ingérés, les probiotiques doivent franchir la barrière digestive (acidité stomacale, sécrétions biliaires, sécrétions enzymatiques) pour arriver vivantes dans le colon où elles sont sensées procurer une large gamme d'effets bénéfiques chez l'hôte (Tableau 2).

Tableau 2: Effets bénéfiques de souches probiotiques commerciales chez l'homme (Woodcock et al., 2004).

Souches	Producteur	Produits	Effets observés chez l'humain	Références
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Valio Dairy (Finlande)	Yoghurts à boire Yoghurts Capsules	Prévention des allergies Traitement des allergies Stimulation de la production d'IL-10 Diminution de l'incidence des diarrhées Diminution des diarrhées à rotavirus	Kalliomäki et al., 2001; Rautava et al., 2002 Majama et al., 1997, Isolauri et al., 2000 Pessi et al., 2000 Vanderhoof et al., 1999 Majama et al., 1995
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (Lj1)	Nestlé (Suisse)	Yoghurts à boire Yoghurts	Inhibition du développement de <i>helicobacter pylori</i> Stimulation de l'activité phagocytaire	Michetti et al., 1999 Schiffrin et al., 1997
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult (Japon)	Yoghurts à boire Laits fermentés	Augmentation de l'activité des cellules NK Diminution des diarrhées à rotavirus	Nagao et al., 2000 Marteau et al., 2001
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Rhodia (États-Unis)	Laits fermentés Yoghurts Formules infantiles Capsules	Diminution des diarrhées infantiles Facilite la digestion du lactose	Sanders et Klaenhammer 2001 Sanders et Klaenhammer 2001
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	ProViva (Suède)	Jus de fruits	Prévention des maladies cardiovasculaires	Naruszewicz et al., 2002
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Danone (France)	Yoghurts à boire	Stimulation de la production d'IgA Diminution de l'incidence des diarrhées	Faure et al., 2001 Pedone et al., 2000
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12	Chr. Hansen (États-Unis)	Formules infantiles	Stimulation de la production d'IgA Diminution de l'eczéma atopique Stimulation de l'activité phagocytaire Stimulation de la croissance des bébés Modulation de la composition de la flore Prévention des diarrhées à rotavirus	Fukushima et al., 1998 Isolauri et al., 2000 Schiffrin et al., 1997 Nopchinda et al., 2002 Kirjavainen et al., 2002 Saavedra et al., 1994
VSL#3 (mélange de 7 souches) <i>L. casei</i> ; <i>L. plantarum</i> ; <i>L. acidophilus</i> ; <i>L. bulgaricus</i> ; <i>B. longum</i> ; <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> ;	CSL (Italie)	Capsules	Prévention de la pouchite Prévention des rechutes de pouchite	Gionchetti et al., 2003 Gionchetti et al., 2000

Il est en effet admis qu'un nombre minimal de 10^6 à 10^7 cellules viables par gramme de produit au moment de la consommation est nécessaire pour observer un effet probiotique (Shah, 2000). Certains auteurs préconisent qu'un niveau supérieur à 10^8 ufc/ml serait satisfaisant (Lourens-Hattingh et Viljeon, 2001). Ce taux serait probablement lié au seuil limite de 10^6 à 10^7 cellules probiotiques vivantes par g de contenu intestinal, tel qu'il a été suggéré par Bouhnik (1993).

La survie des probiotiques durant le transit intestinal est estimée entre 10 et 40% du nombre total administré (Sanders, 2000).

Les microorganismes probiotiques influencent l'ensemble de la microflore intestinale dans sa composition et son activité métabolique (Ouwehand et al., 2002). Ils protègent l'hôte contre les infections intestinales en agissant par le biais d'une variété de mécanismes incluant l'exclusion compétitive des pathogènes des sites d'adhésion des entérocytes, la dégradation des toxines, production des facteurs antimicrobiens et l'immunomodulation (Jain et al., 2004 ; Vesterland et al. 2005).

I.7.1. Stabilité envers l'acidité gastrique et la bile

Le pH de l'estomac est de 0.9 mais la présence d'aliments l'augmente pour atteindre 3.0 (Erkkila et Petaja 2000). Marteau et Rambaud (1998) ont démontré que le taux de survie des bactéries à la sortie du compartiment gastrique est significativement plus faible pour *Lb. bulgaricus* (26%) et *S. thermophilus* (12%) que pour *Lb. acidophilus* (64%) et *B. bifidum* (67%). Les souches *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus* ont une résistance très faible à l'acidité et sont détruits très rapidement à pH 1 et après environ 1 h à pH 3 (Conway et al., 1987).

La bile joue un rôle fondamental dans le mécanisme de défense spécifique (Marteau et al., 1997) et non spécifique (Kalambaheti et al., 1994) de l'intestin et la magnitude de son effet inhibiteur est déterminée par la concentration des sels biliaires (Charties et al., 2000) qui est égale en moyenne à 0.3% p/v (Pennacchia et al., 2004).

On doit sélectionner les souches probiotiques en fonction de leur capacité à survivre et à croître dans les conditions *in vivo* car après l'ingestion alimentaire, il faut 2 à 4h pour que la digestion s'achève (Pennacchia et al., 2004).

La destruction des probiotiques ingérés est principalement causée par les conditions acides de l'estomac et les sécrétions du système digestif (Mainville et al., 2005). Ainsi, la tolérance à l'acidité est l'un des critères fondamentaux que doit remplir

un probiotique (Park et al., 2002).

Dans une étude *in vitro*, Riazi et Gacemi (2006) avaient montré que la survie de deux souches de bifidobactéries à l'acidité (pH≈2), à la bile (diverses concentrations : 0.2 ; 0.4 et 0.6%) et aux acides biliaires (0.03%) n'était pas affectée.

Selon Erkkila et Petaja (2000) plusieurs microorganismes peuvent réduire l'effet détergent des sels biliaires par leur pouvoir de les hydrolyser par le biais de l'enzyme « sels biliaires hydrolase ».

Les facteurs permettant la survie des bactéries probiotiques durant leur passage dans le tractus intestinal sont d'une part, la résistance intrinsèque de ces bactéries à l'acidité et d'autre part, les propriétés de l'aliment vecteur.

Les produits laitiers fermentés ont un fort pouvoir tampon qui s'exprime aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Marteau et al., 1992). Prasad et al. (1998) ont constaté que les souches d'origine humaine avaient une meilleure capacité à résister aux conditions acides et aux concentrations élevées en sécrétions biliaires comparativement aux souches d'origine laitière.

La sécrétion de la bile dans le duodénum réduit la survie des bactéries par la destruction de leur membrane cellulaire qui renferme des lipides. Ce processus n'affecte pas seulement la perméabilité et la viabilité de la cellule mais aussi son interaction avec l'environnement (Succi et al., 2005).

L'adaptation des souches à des concentrations élevées de sels biliaires peut être un précieux moyen pour augmenter la capacité de survie des microorganismes probiotiques dans le tractus gastrointestinal (Noriega et al., 2006).

L'acquisition d'une résistance à un apport de sels biliaires par des souches leur confère une résistance aux autres sels biliaires déconjugés et promet leur survie à des pH bas (Noriega et al., 2006) en augmentant leur possibilité de croissance en présence de bile (Margolles et al., 2003).

I.7.2. Faculté d'adhésion à la muqueuse intestinale

Une des fonctions principales de la muqueuse intestinale est la formation d'une barrière physique séparant le milieu extérieur (lumière intestinale) du milieu intérieur (compartiment systémique) (Silbernagl et Despopoulos, 1992). La muqueuse intestinale est en contact permanent avec la microflore intestinale résidente et des quantités massives d'antigènes d'origine alimentaire (plus d'une tonne d'aliments par année pour un adulte).

Pour préserver l'homéostasie, la muqueuse doit développer des stratégies de défense afin d'empêcher les antigènes intestinaux de pénétrer dans le compartiment systémique. Cette protection est assurée par des mécanismes de défense non spécifiques, tels que des facteurs physiques (péristaltisme) et chimiques (métabolites antimicrobiens, acidité stomacale), et par des mécanismes de défense spécifiques avec, entre autres, la production d'anticorps sécrétoires et l'activation du système immunitaire associé à la muqueuse (Salminen et al., 1998c).

Il est généralement conseillé d'utiliser des souches d'origine humaine. Ce critère, désigné sous le terme de spécificité d'espèce, est basé sur l'observation que seules les souches d'origine humaine peuvent adhérer aux muqueuses intestinales de l'homme (Collins et al., 1998). L'importance de l'habilité d'adhésion à la muqueuse intestinale réside dans sa persistance (Alander et al., 1997), c'est ainsi qu'elle améliore le rétablissement de la muqueuse endommagée (Elliott et al., 1998) et procure une barrière contre la colonisation des pathogènes.

Les probiotiques utilisent plusieurs moyens pour leurs interactions avec les cellules épithéliales de l'intestin. Le processus d'adhésion microbien inclut la force passive, l'interaction électrostatique et hydrophobique, la force stérique, les acides lipotéichoïques et les structures spécifiques impliquant la lectine (Servin et Coconnier, 2003).

Ouwehand et al. (1999a) ont évalué la capacité des lactobacilles à adhérer au mucus intestinal et ont constaté qu'il existait une différence significative entre les espèces pouvant varier entre 3% (*Lactobacillus casei*) et 43% (*Lactobacillus rhamnosus* GG). L'âge du sujet pourrait aussi jouer un rôle dans la capacité des probiotiques à adhérer aux muqueuses intestinales car Ouwehand et al., (1999b) ont observé que l'adhésion des bifidobactéries à la muqueuse intestinale serait en corrélation inverse avec l'âge du sujet.

I.7.3. Colonisation du tractus intestinal humain

Les probiotiques se heurtent à un problème majeur puisque la majorité des souches sélectionnées ne colonisent l'hôte que de façon temporaire. Dans la plupart des cas, les agents probiotiques ingérés peuvent être détectés dans les fèces quelques jours après la cessation de leur administration pour disparaître graduellement, ce qui indique une colonisation transitoire (Spanhaak et al., 1998; Ouwehand et al., 1999b).

En fait, le moment privilégié pour l'implantation d'un microorganisme exogène

semble être à la naissance, alors que l'intestin est relativement stérile et que les mécanismes de défense de l'hôte sont immatures. L'utilisation des souches d'*E. coli*, dépourvues de plasmides a, d'ailleurs, connu du succès (O'sullivan et Kullen, 1998).

Les probiotiques ne doivent pas provoquer la synthèse d'anticorps contre eux, ce qui implique une tolérance du système immunitaire. La non-pathogénicité des souches est un critère très important. Les souches ayant le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) sont d'ailleurs, à favoriser.

Les lactobacilles et les bifidobactéries possédant le statut GRAS ont acquis une grande popularité sur le marché alimentaire. Par ailleurs, à l'exception des streptocoques et des entérocoques, il est généralement reconnu que les bactéries lactiques soient rarement pathogènes pour les humains ou les animaux. Cependant, quelques cas d'infections systémiques impliquant des bactéries lactiques ont été rapportés (Oakey et al., 1995 ; Adams et Marteau, 1995).

I.8. Effets des probiotiques sur la santé humaine

I.8.1. Production de substances antimicrobiennes

Les probiotiques synthétisent un certain nombre de substances antimicrobiennes comportant des acides organiques du peroxyde d'hydrogène, du CO₂ et des bactériocines. Ces substances sont secrétées à proximité des microorganismes pathogènes cibles et contribuent à la baisse du pH de l'intestin et à l'expression d'un antagonisme direct contre ces germes indésirables (Reid et al., 1988).

Par ailleurs, les probiotiques entrent en compétition avec les pathogènes pour l'occupation des sites de fixation sur la muqueuse (Tharmaraj et Shah, 2004) pour les nutriments présents ainsi que pour la stimulation du système immunitaire (Collin et Gibson, 1999).

En fermentant les sucres (digestibles ou non), la microflore intestinale libère principalement des gaz (H₂, CO₂), de l'acide lactique et des acides gras à chaînes courtes (acétate, butyrate et propionate) (MacFarlane et MacFarlane, 2003).

Ces derniers, particulièrement le butyrate, sont absorbés au niveau du colon et sont utilisés comme source d'énergie par les cellules. Le butyrate stimule également la prolifération des cellules épithéliales et favorise l'absorption du Ca²⁺, Mg²⁺ et Fe²⁺ (Pryde et al., 2002).

Les mécanismes d'action antimicrobienne du CO₂ produit lors des fermentations

sont encore mal connus (Ammor et al., 2005a).

Les bactériocines sont les composés antimicrobiens, les plus puissants contre les bactéries pathogènes. Les souches productrices de bactériocines peuvent être identifiées par les zones d'inhibition produites autour de ces bactéries (Fig.1) (Deegan et al., 2006).

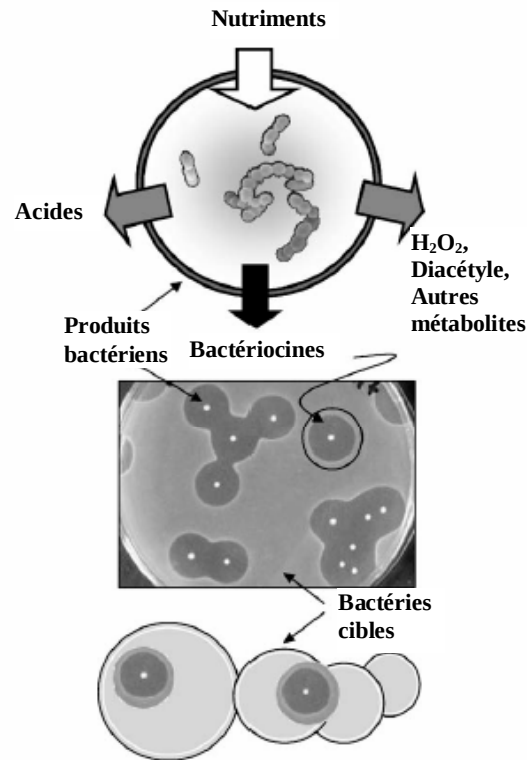


Figure 1: Les différents métabolites synthétisés par les bactéries lactiques (Deegan et al., 2006).

Le CO₂ peut aussi jouer un rôle en créant un environnement anaérobie qui inhibe la décarboxylation enzymatique et son accumulation dans les lipides membranaires cause un dysfonctionnement de la perméabilité de la membrane (Eklund, 1984). Il peut inhiber la croissance de plusieurs microorganismes qui dégradent les aliments, et spécialement les bactéries psychrotrophes à gram-négative (Farber, 1991).

I.8.2. Effet immunostimulateur

Les probiotiques jouent un rôle de barrière à l'intestin et améliorent les réponses immunitaires de l'hôte (Isolauri et al., 2001 ; Madsen et al., 2001 ; Brown et Valiere, 2004).

Cependant, des travaux ont montré que certains effets n'étaient obtenus qu'avec

des probiotiques ingérés vivants. [Kaila et al. \(1992\)](#) ont comparé les effets d'un lait fermenté contenant la souche *L. rhamnosus* GG (10^{10-11} ufc/jour) à ceux d'un yoghurt pasteurisé chez des enfants atteints de diarrhée aiguë à rotavirus.

Ces auteurs ont montré un raccourcissement de la durée des diarrhées et une amélioration de la réponse immunitaire contre le rotavirus plus importants dans le groupe recevant le probiotique vivant. Ce groupe avait un nombre significativement plus important de lymphocytes produisant des IgA, IgG, IgM et un titre en IgA anti-rotavirus significativement supérieur.

La consommation d'un lait fermenté contenant des souches probiotiques (10^{9-10} ufc/jour) pouvait augmenter la capacité phagocytaire des cellules sanguines. L'effet était associé à une augmentation de la population fécale en *Lactobacillus johnsonii* La1 ou en *Bifidobacterium lactis* Bb12 (selon le groupe considéré) ([Schiffrin et al., 1995](#)).

Un effet bénéfique de bactéries lactiques (et tout particulièrement du mélange probiotique VSL#3® qui contient des lactobacilles, des bifidobactéries et des streptocoques) a été observé pour la prévention des rechutes ou de l'apparition de pochites (les pochites sont des maladies inflammatoires du réservoir iléal réalisé après anastomose iléo anale en cas de rectocolite hémorragique) ([Gionchetti et al., 2003](#) ; [Mimura et al., 2004](#)).

[Viljanen et al. \(2005a\)](#) ont administré des probiotiques (lactobacilles seuls, ou un mélange de quatre souches différentes de lactobacilles, bifidobactéries et propionibactéries) à 102 nourrissons atteints de dermatite atopique et soumis à un régime d'éviction pour une allergie associée aux protéines du lait de vache.

À la quatrième semaine de l'étude, le taux des IgA sécrétoires a été significativement augmenté dans les selles des enfants ayant reçu des probiotiques, alors que leur perméabilité intestinale, appréciée par le taux fécal d' α 1-antitrypsine, a été significativement diminuée.

Les résultats de [Viljanen et al. \(2005b\)](#), qui confirment ceux d'études antérieures, suggèrent donc que, chez les enfants atteints de dermatite atopique associée à une allergie alimentaire, les effets bénéfiques des probiotiques pourraient être liés à leurs effets immunologiques sur l'intestin.

Ils sont d'ailleurs confirmés par ceux de deux autres études, effectuées dans des conditions sensiblement identiques, par d'autres équipes, chez des enfants traités

pendant six semaines consécutives et chez lesquels l'efficacité des probiotiques s'est maintenue pendant au moins huit semaines après l'arrêt du traitement (Rosenfeldt et al., 2004 ; Weston et al., 2005).

Saavedra et al. (2004) ont rapporté chez des nourrissons nourris avec des formules infantiles supplémentées en *Bifidobacterium lactis* et *Streptococcus thermophilus* et suivis pendant au moins 6 mois, une croissance normale, une tolérance digestive meilleure et une consommation d'antibiotiques moindre que celle des nourrissons recevant une formule classique sans probiotiques.

Dans l'étude de Spanhaak et al. (1998), 20 volontaires sains recevaient par voie orale soit 10^{11} ufc de *L. casei* Shirota par jour dans 3x100mL de lait fermenté, soit 3x100mL de lait non fermenté par jour, durant 28 jours.

Par rapport au groupe contrôle dans lequel la flore fécale restait inchangée durant toute l'étude, la prise du *L. casei* Shirota s'accompagnait d'une élimination fécale du probiotique à 10^7 ufc/ g selles et d'une augmentation significative mais transitoire des bifidobactéries.

Les nombreux autres groupes microbiens testés (anaérobies totaux, *Bacteroidaceae*, entérocoques, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*..) restaient inchangés comme chez les contrôles. Les paramètres fonctionnels suivis (activités enzymatiques des selles ou paramètres immunologiques) n'étaient pas modifiés de façon concluante.

Un peu plus tard, Collins et al. (2002) donnaient à 80 volontaires pendant 21 jours un lait fermenté contenant 10^{10} ufc de *L. salivarius* UCC118/jour en comparaison avec du lait frais ou les contrôles correspondants.

L'apport de *L. salivarius* entraînait une élévation significative du nombre de lactobacilles et d'entérocoques fécaux. Les Bifides, Bacteroides et entérobactéries n'étaient pas significativement modifiés. Une augmentation concomitante des IgA salivaires et de l'activité phagocytaire des granulocytes était observée avec le probiotique.

I.8.3. Effet antagoniste

Les bactéries pathogènes constituent un problème clinique et thérapeutique contre lequel les antibiotiques ne donnent pas une grande satisfaction (Hamilton-Miller, 2003). C'est dans ce sens que l'utilisation de probiotiques pouvant interférer avec la

colonisation des bactéries pathogènes représente une des alternatives à promouvoir (Sgouras et al., 2004).

L'effet probiotique des lactobacilles a été démontré « *in vivo* » et « *in vitro* » pour son effet antagoniste vis-à-vis d'*Helicobacter pylori* par la production d'acides organiques, inhibition compétitive en occupant les sites de la muqueuse intestinale ainsi que par l'immunomodulation (Bernet et al., 1994 ; Sgouras et al., 2004).

Le potentiel d'utilisation des bifidobactéries pour lutter contre les infections d'*H pylori* est moins documenté par rapport aux lactobacilles et la caractérisation de la synthèse des métabolites antibactériens autres que les acides organiques reste inexploré (Yildirim et Johnson, 1998).

Yildirim (1998) avait constaté que la bifidocine B est active vis-à-vis d'une large gamme de bactéries incluant les espèces de *Listeria*, *Enterococcus faecum*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus* et les espèces de *Pediococcus* ; par contre elle n'est pas active vis-à-vis d'autres Gram + et toutes les Gram- testées (Tableau 3).

La fermentation des saucisses en utilisant les bactéries probiotiques réduit la viabilité d'*E. coli* O157:H7 (Muthukumarasamy et Holley, 2007).

I.8.4. Effet anticarcinogène

Lo et al. (2004) résument les travaux de nombreux auteurs sur l'effet anti-cancérigène de plusieurs probiotiques qui agiraient par :

- La production d'acides organiques qui réduisent le pH intestinal et inhibent la croissance des bactéries putréfiantes (Rasic et Kurmann, 1983).
- Suppression des enzymes bactériennes telles que : Azoréductase, 7- α -déhydroxylase, β -glucuronidase et la nitroréductase qui sont impliquées dans les activités procarcinogènes (Goldin et al., 1980).
- L'activation du système immunitaire de l'hôte (Sekine et al., 1985).

Par ailleurs, Rafter (2003) remarque que la réduction de la production des métabolites indésirables dans le colon joue un rôle dans la prévention contre le cancer.

Les travaux de Le Leu et al. (2005) résument l'effet des bifidobactéries sur les facteurs cancérigènes (Tableau 4).

Tableau 3: Spectre d'effet antimicrobien de la bifidocine B (Yildirim, 1998).

Souche bactérienne et source	Activité antimicrobienne	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	+	26±1,0
<i>Listeria murrayi</i> ATCC 33090	+	23±,3
<i>Listeria innocua</i> ATCC 25401	+	18±1,1
<i>Listeria grayi</i> ATCC 19120	+	26±1,0
<i>Listeria seeligeri</i> ATCC 35967	+	24±1,1
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A USDA	+	18±0,8
<i>Listeria monocytogenes</i> 587 CHRL	+	16±0,5
<i>Enterococcus faecalis</i> Dan Fung	+	16±1,2
<i>Enterococcus faecium</i> Dan Fung	+	16±0,9
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 232	+	12±0,4
<i>Lactobacillus viridans</i> Univ. Wisconsin	+	15±0,5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B1910	+	14±1,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCDO 955	+	23±1,3
<i>Lactobacillus casei</i> UMRL	+	15±0,7
<i>Leucocostoc oenos</i> UMRL	+	16±0,5
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Univ. Wisconsin	+	17±0,9
<i>Pediococcus acidolacrici</i> UMRL	+	19±0,2
<i>Pediococcus dextrinicus</i> ATCC 19371	+	26±1,1
<i>Pediococcus parvulus</i> ATCC 19371	+	17±1,0
<i>Pediococcus urinaequi</i> ATCC 29723	+	16±0,5
<i>Strep. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i> Univ. Wisconsin	+	13±0,8
<i>Micrococcus roseus</i> Univ. Wisconsin	-	ND
<i>Bacillus substilis</i> Univ. Wisconsin	-	ND
<i>Bacillus megaterium</i> Univ. Wisconsin	-	ND
<i>Listeria welshimeri</i> ATCC 35897	-	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	ND
<i>Clostridium perfringens</i> Univ. Wisconsin	-	ND
<i>Clostridium sporogenes</i> Univ. Wisconsin	-	ND
<i>Micrococcus lutens</i> ATCC 4698	-	ND
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	-	ND
<i>Streptococcus thermophilus</i> Univ. Wisconsin	-	ND
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	-	ND
<i>Aerococcus viridans</i> Univ. Wisconsin	-	ND
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 43200	-	ND
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 31834	-	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Univ. Wisconsin	-	ND
<i>Proteus vulgaris</i> Dan Fung	-	ND
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	-	ND
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	-	ND
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-	ND
<i>Enterobacter aerogene</i> Univ. Arkansas	-	ND
<i>Pseudomonas aerogene</i> ATCC 10145	-	ND
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	-	ND

+ : Inhibée; - : Non inhibée; ND: Non détectable

Tableau 4: Effets des bifidobactéries aux différents stades du cancer (Le leu et al., 2005).

Différents stades de cancer	Etudes menées	Effets des bifidobactéries
Initial	<i>In vitro</i> <i>In vitro</i> <i>In vitro</i> (animal)	• Inhibition des nitrites et nitrosamines. • Fixation des amines hétérocycliques. • Prévention des modifications de l'ADN induites par des carcinogènes dans les cellules du colon
Initial	<i>In vivo</i> (homme)	• Diminution de l'activité de l'enzyme fécale β glucoronidase. • Diminution des taux de métabolites de putréfaction : p. Crésol, Indole, ammoniac.
Lésion pré-cancéreuses	<i>In vitro</i> (homme)	• Réduction de la formation de foyers glandulaires aberrants.
Cancer	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> (animal)	• Inhibition de la croissance de lignée cellulaire de cancer du sein. • Diminution de la fréquence des tumeurs du côlon.

Plusieurs études ont également rapporté que les bifidobactéries pouvaient avoir un effet anticancérigène. Ainsi, certains auteurs (Modler et al., 1990) ont suggéré que le risque du cancer pouvait être réduit par la diminution du pH de l'intestin car cet abaissement empêcherait la colonisation de l'intestin par les bactéries putréfiantes et aurait pour conséquence la réduction de composés potentiellement carcinogènes tels que les produits N-nitrosamines, les produits phénolés, etc...

I.8.5. Effet sur l'intolérance au lactose

L'intolérance au lactose est due à une déficience en enzyme lactase intestinale. Le lactose non digéré dans l'intestin grêle est fermenté dans le côlon par les bactéries coliques conduisant à la production d'acides organiques à chaîne courte et de gaz tels que l'hydrogène, le méthane et le gaz carbonique. Ces produits présents en quantités excessives dans le côlon peuvent provoquer des flatulences, des spasmes intestinaux, des douleurs abdominales, des ballonnements et des diarrhées osmotiques (De Villiers, 1995).

Marteau et al. (1990) ont montré que plus de 90% du lactose du yoghurt est digéré chez des sujets déficients en lactase.

L'effet bénéfique du yoghurt par rapport au lait est indépendant de la quantité de lactose dans le produit et n'est donc pas dû à une plus faible teneur en lactose du yoghurt. Trois hypothèses ont été proposées sur cet effet bénéfique :

▼ La première stipule une digestion du lactose dans la lumière intestinale par la lactase des bactéries lactiques du yoghurt. Plusieurs auteurs suggèrent que la bile contenue dans l'intestin grêle augmenterait la perméabilité des cellules bactériennes, permettant au lactose d'y entrer et pour y être dégradé (Noh et Gilliland, 1995). La lyse des bactéries lactiques dans le tractus digestif avec relargage de leur lactase intracellulaire est également possible (Martean et al., 1997).

▼ La seconde attribue cet effet bénéfique du yoghurt à un ralentissement de la vidange gastrique et du transit gastro-intestinal dus à la texture plus épaisse et visqueuse du yoghurt par rapport au lait (Martean et al., 1990). Ceci laisserait plus de temps à la lactase intestinale résiduelle et aux bactéries lactiques du yoghurt pour agir.

▼ La troisième hypothèse met en avant une stimulation de l'activité lactasique de la muqueuse intestinale par les bactéries lactiques du yoghurt (Besnier et al., 1983). Ces mêmes auteurs ont observé chez la souris une l'activité lactasique dans la

bordure en brosse chez des souris normales et des souris axéniques après 14, 28 et 42 jours de consommation de yoghurt. Cependant les résultats d'une étude ultérieure menée en 1989 chez 16 sujets présentant une déficience en lactase contredisent ces données (Lerebours *et al.*, 1989).

Il est aussi reconnu que les bifidobactéries ont un effet probiotique imputable à leur métabolisme étant donné qu'elles atténuent l'intolérance au lactose chez l'homme en le métabolisant.

Ainsi, la teneur en lactose des produits laitiers fermentés par des bifidobactéries est moins importante que celle des produits fermentés sans bifidobactéries ; ce qui rend ces produits attrayants pour les gens souffrants d'intolérance au lactose.

Par ailleurs Blanchette *et al.* (1996) avaient noté que la teneur en lactose d'un fromage type « Cottage » fait avec *B. infantis* était 40% moins importante que celle du même fromage sans bifidobactéries, après une journée d'entreposage. Le même phénomène a été observé par l'équipe de Roy *et al.* (1997) dans le cas de yoghurts contenant des bifidobactéries et ceux n'en contenant pas.

I.8.6. Effet hypocholestérolémiant

La concentration en cholestérol sérique diminue suite à la consommation de grandes quantités (680 à 5000 ml par jour) de produits laitiers fermentés (Draouelt *et Corthier*, 2001).

Gilliland (1990) a montré que plusieurs bactéries, notamment *Lb. acidophilus* et *B. longum*, sont capables de limiter le taux de cholestérol sanguin chez des porcs nourris avec un régime riche en cholestérol.

Ces mêmes bactéries sont capables d'assimiler le cholestérol *in vitro* en présence de taurocholate de sodium (Dambekodi *et Gilliland*, 1998 ; Riaz *et Gacemi*, 2006). Une partie de ce cholestérol assimilé (environ 20%) a notamment été retrouvée dans la membrane cellulaire de ces bactéries lactiques (Dambekodi *et Gilliland* 1998).

La présence des bifidobactéries permet aussi de réduire le niveau de cholestérol sérique. Les bifidobactéries aident à la déconjugation des acides biliaires, la réduction des nitrosamines et l'inhibition de la réduction des nitrates (Nagengast *et al.*, 1988).

I.9. La survie des bactéries probiotiques dans la lumière intestinale

Les études qui décrivent le devenir des bactéries du yoghurt, *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus*, démontrent que leur survie est faible dans les parties hautes du tractus

digestif (Marteau et al., 1993). Lindwall et Fonden (1984) ont notamment observé qu'après consommation d'un yoghurt contenant 10^9 *Lb. bulgaricus*.g⁻¹, leur concentration dans l'iléon était de 10^5 chez 3 sujets et 10^6 chez le quatrième.

Les autres bactéries majoritairement étudiées sont *Lb. acidophilus* et les bifidobactéries. Marteau et Rambaud (1998) ont notamment montré qu'après ingestion d'un lait fermenté contenant *Lb. acidophilus* (10^8 .g⁻¹) et *Bifidobacterium lactis* (10^7 .g⁻¹), il y avait environ 1,5% des *Lb. acidophilus* et 37,5% des *Bifidobacterium lactis* ingérés qui étaient retrouvés dans les contenus iléaux.

I.10. Combinaison de souches probiotiques

L'efficacité de la combinaison des souches probiotiques est plus effective et consistante envers les pathogènes que l'utilisation d'une seule souche probiotique. Cela est due à l'utilisation de l'association de la diversité des propriétés antimicrobiennes de chacune d'elles (les acides organiques, peroxydes d'hydrogène et les bactériocines) (Timmerman et al., 2004).

L'utilisation d'une culture mixte de bactéries probiotiques présente un effet thérapeutique supérieur par rapport à l'utilisation traditionnelle des antibiotiques ou même à une seule souche de probiotique dans le traitement de l'ulcère (Gionchetti et al., 2002 ; Shibolet et al., 2002).

Dans une étude de Paubert-Braquet, et al., 1995, la combinaison entre souches, comme le montre le tableau 5, augmente plus efficacement le taux de survie des souris infectées par *Salmonella typhimurium* par rapport à l'utilisation d'une seule souche.

En plus de la combinaison de l'efficacité des souches contre les pathogènes, il y a l'effet symbiotique entre elles car les lactobacilles sont capables de produire des facteurs de croissance bifidogènes sous forme de polysaccharides extracellulaires qui peuvent former une capsule autour des cellules bactériennes et les couvrir contre les facteurs antimicrobiens (Timmerman et al., 2004).

Les polysaccharides extracellulaires produits par *L. sanfranciscensis* font fonction de prébiotique ou facteur de croissance pour les bifidobactéries (Bello et al., 2001). Avec la croissance, l'activité métabolique est également influencée par cette relation symbiotique (Timmerman et al., 2004).

Tableau 5: Effets comparés de cinq différents laits fermentés et de deux laits témoins, l'un non fermenté et l'autre sans supplément sur le taux de survie des souris infectées par *Salmonella typhimurium* (Paubert-Braquet, et al., 1995).

Nombre de jours d'administration des différents laits	Témoins		traitement par les probiotiques				
			Monosouches			Multisouches	
	* Sans supplément	Lait non fermenté	<i>L. casei</i> (LAB-1)	<i>L. casei</i> (LAB-2)	<i>L. casei</i> Shirota	ferments du Yoghurt	<i>L. casei</i> (LAB-1) + ferments du Yoghurt
2	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
6	62.5%	62.5%	87.5%	62.5%	62.5%	75%	87.5%
10	25%	37.5%	75%	50%	50%	50%	87.5%
14	0%	12.5%	75%	50%	50%	50%	87.5%

* Sans supplément : souris n'ayant reçu aucun supplément de lait fermenté ou de lait standard (non fermenté).

Chapitre II

*Bifidobacterium, Staphylococcus aureus
et Bacillus cereus*

Chapitre II : Bifidobacterium, Staphylococcus aureus et Bacillus cereus

II.1. Bifidobacterium

II.1.1. Taxonomie

La découverte des bifidobactéries remonte au début du siècle lorsque Henri Tissier (Tissier, 1900 cité par O'sullivan & Kullen 1998) les a isolées de selles nourries au lait maternel.

Ces bactéries jouent un rôle majeur dans l'équilibre et la stabilité de la flore intestinale, d'où l'appellation de culture probiotique (Hekmat et McMahon, 1992).

Le genre *Bifidobacterium* comprend les espèces de *Gardnerella* et *Bifidobacterium* et qui appartiennent à la famille des *Actinomycetacea*, (elle-même comprend aussi les : corynébactéries, mycobactéries et streptomyces) ordre des *Bifidobacterium*, sous-classe des *Actinobactériidae*, classe des *Actinobacteria*, division des *Firmicutes*, domaine des *bacteria* ou Eubacteria (Klijn et al., 2005).

A la date du 28 novembre 2002, le genre *Biidobacterium* ressemblait 31 espèces. Depuis le 29 novembre 2002, le nombre d'espèces est réduite à 29 car Sakata et al. (2002), ont montré que *B. infantis* et *B. suis* étaient des synonymes ultérieurs et hétérotypiques de *B. longum* (Tableau 5).

Parmi ces espèces de bifidobactéries répertoriées, 10 sont considérées comme étant d'origine humaine, alors que les autres sont isolées des matières fécales d'animaux divers (Curk et al., 1994).

En 2003, la présence d'une fructose-6-phosphate phosphocétolase permet à Simpson et al. de placer 160 souches bactériennes isolées d'un caecum de porc dans le genre *Bifidobactérium*.

L'analyse des fragments de macrorestriction et l'étude de la séquence des ARNr 16S permettent à ces auteurs de reconnaître deux nouvelles espèces qu'ils dénomment « *Bifidobacterium psychroaerophilum* » et « *Bifidobacterium aerophilum* ».

L'analyse phylogénétique révèle que « *Bifidobacterium psychroaerophilum* » appartient au genre *Bifidobacterium sensu stricto*. En revanche, la détermination du G + C p. cent et le séquençage du gène codant pour la protéine du choc thermique, montre que « *Bifidobacterium aerophilum* » constitue un nouveau genre, le genre *Aeriscardovia* (Simpson et al., 2004).

B. longum, *B. bifidum*, *B. infantis* et *B. breve* ont été les plus étudiées à cause de leur aptitude à fermenter le lait ou à être dans les aliments (Stanton et al., 1998).

II.1.2. Caractéristiques physiologiques et biochimiques des bifidobactéries

II.1.2.1. Morphologie

Le genre *Bifidobacterium* regroupe des bacilles à Gram positif, asporogènes, immobiles se présentant sous forme de bâtonnets incurvés aux contours irréguliers et ondulés (Delcenserie et al., 2007). Ce sont des bactéries anaérobies strictes et non productrices de gaz exceptée la souche *Bifidobacterium psychraerophilum* qui est aéro-anaérobie (Simpson et al., 2004). Ces cellules doivent leur nom à leurs extrémités qui sont souvent bifurquées, ou spatulées donnant des formes en Y ou en V qui apparaissent dans certaines conditions de culture (Scardovi, 1986).

Différentes morphologies cellulaires sont obtenues selon les conditions de culture (Tamime et al., 1995) (Fig. 2). Ce polymorphisme est en relation étroite avec la composition du milieu de culture (Romond & Romond, 1989). En effet, l'apparition de la forme bifide peut être activée en additionnant dans le milieu de culture des carbonates, de l'acétate de sodium, du chlore et de nombreux cations monovalents (Tamime et al., 1995).



Figure 2. Morphologie cellulaire de quelques espèces du genre *Bifidobacterium* (Tamime et al., 1995).

Les espèces de bifidobactéries ont des formes et des arrangements cellulaires différents pouvant être résumés comme suit :

- *Bf. bifidum* : groupement de formes cellulaires typiques ayant des bifurcations.
- *Bf. breve* : petites cellules courtes et incurvées.
- *Bf. longum* : cellules relativement fines, très allongées, aux contours irréguliers avec de rares bifurcations.
- *Bf. adolescentis* et *infantis* : elles ont une morphologie cellulaire non spécifique et similaire à celle de plusieurs autres espèces de bifidobactéries (Tamime et al., 1995).

II.1.2.2. Métabolisme

Les bifidobactéries dégradent le glucose par la voie du fructose- 6-phosphate communément appelée « voie du bifid-shunt ». L'enzyme clef de cette voie métabolique est la fructose-6-phosphate phosphokétolase (F6PPK), qui est spécifique aux bifidobactéries et qui scinde le fructose-6-phosphate en acétylphosphate et en érythrose-4-phosphate (Fig. 3) (Bourgeois et Larpent, 1996).

Une étude faite sur 22 souches de bifidobactéries d'origine humaine a démontré que toutes les souches testées possédaient les activités α et β galactosidases et une activité α -glucosidase. L'activité β -glucuronidase, a été détectée chez 6 souches de *Bifidobacterium dentium*.

La voie métabolique Bifid-shunt produit de l'acide lactique et de l'acide acétique comme métabolites primaires en proportion de 2:3. Toutefois, certaines souches de bifidobactéries vont produire plus d'acide acétique et moins d'acide lactique.

Le surplus d'acide acétique formé provient d'une autre voie métabolique des bifidobactéries qui convertit le pyruvate en acide formique et en acétate plutôt qu'en acide lactique. Par la suite, une partie de l'acide acétique est transformé en éthanol (Bourgeois et Larpent, 1996).

II.1.3. Niche écologique des bifidobactéries

Les bifidobactéries, habitants normaux du tube digestif, sont reconnues comme des probiotiques qui composent presque la totalité (85% à 95%) de la flore intestinale d'un nouveau-né nourri au lait maternel (Garro et al., 2004). Les principales espèces retrouvées sont *Bifidobacterium infantis* et *B. bifidum*.

Les entérocoques, les coliformes et les lactobacilles représentent environ 1-15% de la flore fécale alors que les bactéroïdes et les clostridies sont absents (Rasic et Kurmann, 1983 ; Guarner & Malagelada, 2003).

Cependant, on constate que tout au long de la vie, il y a une diminution du nombre de bifidobactéries au profit des clostridies, des lactobacilles, des streptocoques et des entérobactéries pour atteindre une concentration de $10^9 - 10^{10}$ cellules / g de fèces (Tannock, 1995).

De plus, les espèces et les biovariétés typiques de l'adulte remplacent celles de l'enfant. Ces modifications de la flore seraient en partie imputables à l'évolution du régime alimentaire (Molkhou, 2004).

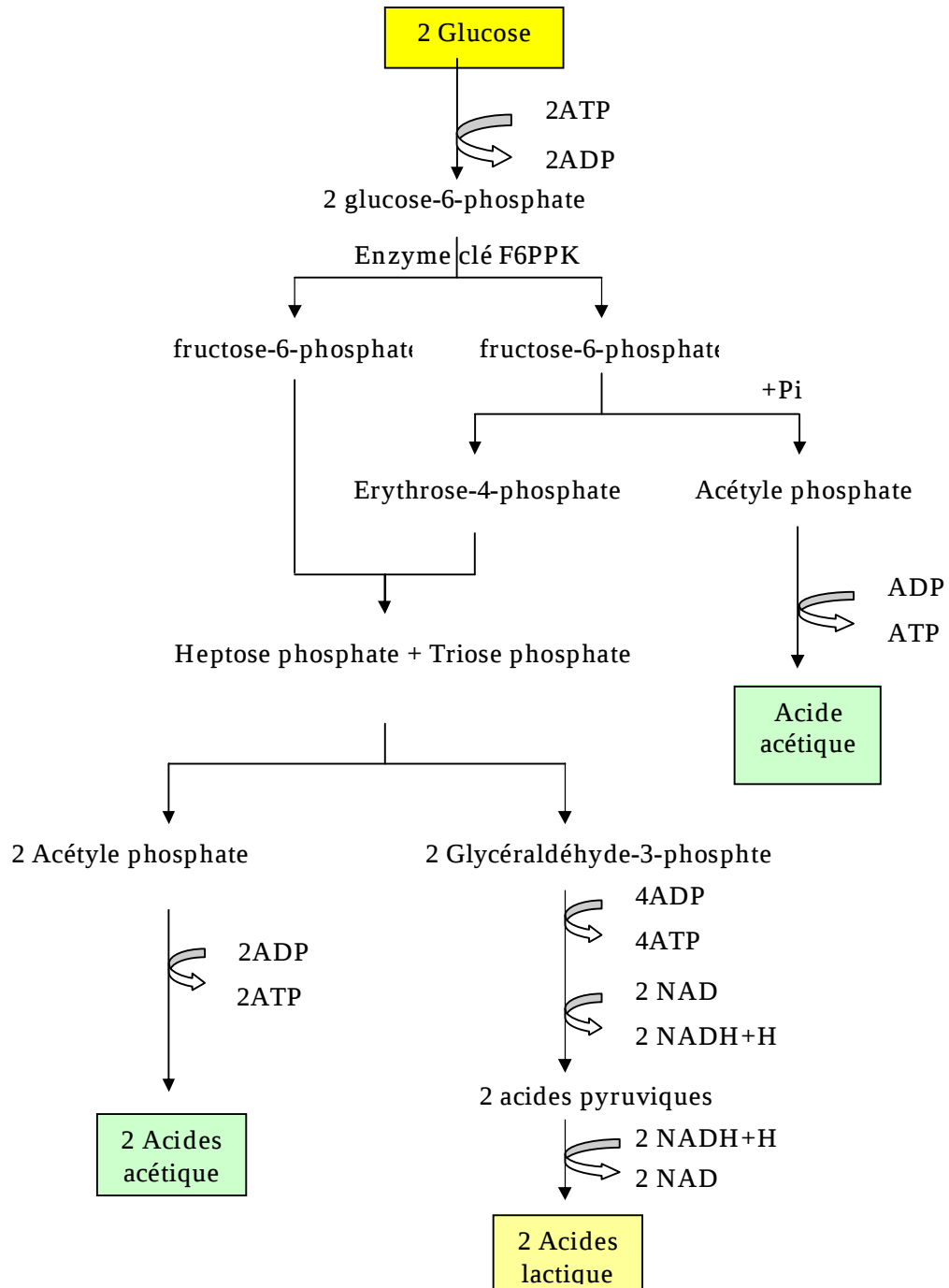


Figure 3: Fermentation du glucose par le genre *Bifidobacterium* (Bourgeois et Larpent, 1996).

Le lait maternel procure une protection significative contre les maladies de la petite enfance, probablement par la modulation de la flore intestinale du nourrisson, au profit notamment des bifidobactéries (Huet et al., 2006). Il contient des facteurs bifidogènes, tels que les oligosaccharides comme le galactose, le fructose et le N-acetylglucosamine, qui stimulent la croissance des bifidobactéries.

L'absence de ces facteurs dans les préparations lactées pourrait expliquer la différence observée entre les flores des enfants nourris au lait maternel et ceux nourris au lait de vache (Tamime et al., 1995). À ce titre, l'emploi de probiotiques comme suppléments alimentaires vivants de nature microbienne, représente un concept intéressant en nutrition infantile (Rochat, 2004).

La flore des enfants sevrés représente une transition entre la flore infantile et la flore adulte. Plusieurs espèces telles que les bactéroïdes, les eubactéries, les peptostreptocoques et les clostridies apparaissent dans la flore fécale. Les bifidobactéries deviennent moins prédominantes (Rasic et Kurmann, 1983 ; Guarner & Malagelada, 2003). La flore adulte devient plus complexe et la flore dominante est composée de bactéroïdes.

Bien que les bifidobactéries ne soient plus prédominantes, elles demeurent un des groupes les plus importants de la flore intestinale (Matsuki et al., 1999). Les espèces de bifidobactéries les plus retrouvées chez l'adulte sont *Bifidobacterium adolescentis* et *B. longum* (Tamime et al., 1995). Certains autres

facteurs tels que l'origine ethnique de l'homme, les troubles intestinaux et le type d'alimentation expliquent la différence de composition de la flore intestinale observée entre individus.

II.1.4. Principales espèces du genre *Bifidobacterium*

À partir de 1974, le genre *Bifidobacterium* a été reconnu par les éditeurs du manuel «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology», comme étant composé de 11 espèces. Selon Crociani et al. (1996), 32 espèces de bifidobactéries ont été répertoriées et parmi lesquelles 12 seraient d'origine humaine, 3 proviendraient de l'abeille, 14 seraient d'origine animale à sang chaud et 2 proviendraient d'eau d'égout. Récemment, une nouvelle sous-espèce, *Bifidobacterium Iactis*, a aussi été isolée des produits laitiers fermentés (Meile et al., 1997 ; Hoyles et al., 2002). C'est ainsi que la seconde édition du «Bergey's Manual of Systemic Bacteriology» a répertorié 35 espèces de bifidobactéries (Tableau 6) (Garritty et al., 2002).

Tableau 6 : Différentes espèces bifides identifiées à ce jour (Euzéby, 2005).

Espèce bifide	Origine	Référence
Origine humaine		
<i>B. adolescentis</i>	Fèces d'adultes	(Reuter, 1963)
<i>B. angulatum</i>	Fèces d'adultes et d'enfants	(Scardovi et Crociani, 1974)
<i>B. bifidum</i>	Fèces d'adultes, d'enfants et du vagin	(Orla-jensen, 1924)
<i>B. breve</i> syn <i>B. parvulorum</i>	Fèces d'enfants et du vagin	(Reuter, 1963)
<i>B. catenulatum</i>	Fèces d'enfants, d'adultes et du vagin	(Scardovi et Crociani, 1974)
<i>B. dentium</i>	Carie dentaire et fèces d'adultes	(Scardovi et Crociani, 1974)
<i>B. gallicum</i>	Fèces d'adultes	(Lauer, 1990)
<i>B. longum</i> biovar <i>infantis</i>		(Sakata et al., 2002)
<i>B. longum</i> biovar <i>longum</i>	Fèces d'adultes	(Reuter, 1963)
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Fèces d'enfant	(Scardovi et al., 1979)
<i>B. scardovii</i>	Divers prélèvements (sangs, urines...)	(Hoyles et al., 2002)
Origine alimentaire et environnementale		
<i>B. animalis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Laits fermentés principalement	(Masco et al., 2004)
<i>B. minimum</i>	Eaux usées	(Biavati et al., 1982)
<i>B. substile</i>	Eaux usées	(Biavati et al., 1982)
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>Thermacidophilum</i>	Eaux usées	(Dong et al., 2000)
Origine animale		
<i>B. animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	Fèces de rats	(Masco et al., 2004)
<i>B. asteroides</i>	Intestins d'abeilles <i>Apis mellifera</i> (subsp. <i>Mellifera</i> , <i>ligustica</i> , <i>caucasica</i>)	(Scardovi et Trovatelli, 1969)
<i>B. boum</i>	Fèces de porcelets et de rumen	(Scardovi et al., 1979)
<i>B. choerinum</i>	Fèces de porcelets	(Scardovi et al., 1979)
<i>B. coryneforme</i>	Intestins d'abeilles <i>Apis mellifera</i> (subsp. <i>Mellifera</i>)	(Scardovi et Trovatelli, 1969)
<i>B. cuniculi</i>	Fèces de lapins	(Scardovi et al., 1979)
<i>B. gallinarum</i>	Caecum de poulets	(Watabe et al., 1983)
<i>B. indicum</i>	Intestins d'abeilles <i>Apis cerana</i> et <i>Apis dorsta</i>	(Scardovi et Trovatelli, 1969)
<i>B. longum</i> biovar <i>suis</i>	Fèces de porcelets	(Sakata et al., 2002)
	Fèces de lapins	(Scardovi et Zani, 1969)
<i>B. merycicum</i>	Rumen	(Biavati et Mattareli, 1991)
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>Pseudolongum</i>	Fèces de porcelets, poulets, veaux, rats et de rumen	(Biavati et al., 1982)
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>Globosum</i>	Fèces de porcelets, poulets, veaux, rats et de rumen	(Biavati et al., 1982)
<i>B. pullorum</i>	Fèces de poulets	(Trovatelli et al., 1974)
<i>B. psychraerophilum</i>	Caecum de porcs	(Simpson et al., 2004)
<i>B. ruminantium</i>	Rumen	(Biavati et Mattareli, 1991)
<i>B. saeculare</i>	Fèces de lapins	(Biavati et al., 1992)
<i>B. thermophilum</i> syn <i>B. ruminale</i>	Fèces de porcelets, poulets, veaux, rats et de rumen	(Mitsuoka, 1969)
<i>B. thermophilum</i> subsp. <i>Porcinum</i>	Fèces de porcelets	(Zhu et al., 2003)

II.1.6. Effets probiotiques des bifidobactéries

Les bifidobactéries exercent une influence sur la microflore intestinale de l'hôte, en fermentant les oligosaccharides indigestes et en créant de la compétition nutritionnelle et spatiale avec les autres bactéries (Makras et De vuyst, 2006).

Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour l'action inhibitrice des bifidobactéries contre les pathogènes à Gram -, incluant la diminution du pH local par la production d'acides organiques, l'action inhibitrice des molécules d'acides organiques indissociables, la compétition pour les nutriments, et les sites d'adhésion, la stimulation du système immunitaire et la production de substances antimicrobiennes (De Vuyst et al., 2004).

Les acides organiques, en particulier l'acide lactique et acétique, ont un grand effet inhibiteur contre les bactéries à Gram -, et c'est ce qui a amené certains auteurs à suggérer qu'ils représentent le seul facteur responsable de l'activité antagoniste des bifidobactéries (Ibrahim & Bezkorovainy, 1993 ; Fooks & Gibson, 2003).

Mais cette suggestion reste peu vraisemblable étant donné que de nombreuses autres études ont mis en évidence d'autres substances inhibitrices (en l'occurrence protéique : ie : bactériocines) à haut potentiel antagoniste (Yildirim & Johnson, 1998 ; Servin, 2004).

L'équipe de Tojo et al. (1987) avait remarqué que les personnes atteintes d'entérites causées par *Campylobacter* guérissaient plus vite lorsque des comprimés contenant *Bifidobacterium breve* leur étaient administrés.

Il a aussi été constaté que les bifidobactéries ont un rôle nutritionnel car elles produisent des vitamines du groupe B, des acides aminés tels que la valine, l'alanine, l'acide aspartique et la thréonine. De plus, les bifidobactéries produisent seulement la forme L+ de l'acide lactique qui est complètement métabolisé par l'humain (Rasic et Kurmann, 1983).

II.1.7. Incorporation des bifidobactéries dans les produits laitiers

Bien que les bifidobactéries fassent déjà partie de la flore intestinale indigène chez l'humain, un apport quotidien de bifidobactéries pourrait être utile pour stimuler ou suppléer la population déjà existante. L'ingestion de bifidobactéries permet aussi de remplacer la flore qui est détruite par des infections ou encore par la prise d'antibiotiques.

Pour que l'apport de bifidobactéries soit efficace, certaines conditions doivent être observées. En premier lieu, la consommation de produits contenant des bifidobactéries doit se faire sur une base régulière et ceux-ci doivent contenir un minimum de 10^6 UFC/g de produit au moment de la consommation. Les espèces de bifidobactéries utilisées doivent être d'origine humaine et doivent survivre au passage de la barrière gastrique (Tamime et al., 1995).

De plus, la survie des bifidobactéries dans les produits laitiers doit être assurée jusqu'à la consommation du produit par le consommateur.

Ainsi, la viabilité des bifidobactéries dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels on retrouve le degré d'acidification, l'espèce utilisée, les conditions de fermentations, la température d'entreposage, la post-acidification et les méthodes de conservation (Kneifel et al., 1993).

Présentement, il y a deux façons d'incorporation des bifidobactéries aux produits laitiers : elles sont soit ajoutées aux produits laitiers déjà fermentés, soit ajoutées aux bactéries lactiques lors de l'ensemencement.

Lorsqu'elles sont ajoutées au moment de la fabrication du produit, les bifidobactéries sont utilisées en monoculture ou encore en culture mixte avec des bactéries lactiques (Patel et al., 1991). Les espèces de bifidobactéries les plus utilisées dans le domaine laitier sont *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. animalis* et *B. infantis* (Tamime et al., 1995).

L'incorporation des bifidobactéries s'est faite pour la première fois en 1948 par Mayer (cité par Rasic & Kurman, 1983), en Allemagne. *Bifidobacterium bifidum* a été incorporé à de la nourriture pour bébés prescrite à des enfants ayant des carences nutritionnelles.

Par la suite, en 1968, l'équipe de Schuler-Malyoth (cité par Rasic & Kurman, 1983) a démontré que les bifidobactéries pouvaient être cultivées dans des produits laitiers. Aujourd'hui, environ 80 types de produits contenant des bifidobactéries sont retrouvés sur le marché à travers le monde mais plus particulièrement au Japon et en Europe (Hugues et Hoover, 1991).

Cela fait plus de 20 ans que des produits contenant des bifidobactéries ont été mis en marché aux États Unis et au Canada (Kim, 1988 ; Hugues et Hoover, 1991). Les bifidobactéries sont retrouvées dans une grande variété de produits laitiers tels que le

yoghurt, la crème glacée, les laits fermentés et dans plusieurs types de fromage tels que le fromage cheddar, et le fromage cottage (Tamime et al., 1995).

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* est tolérante à l'acidité par rapport aux autres souches bifides (Janer et al., 2004).

La croissance des bifidobactéries est améliorée en présence de souches protéolytiques telles que *L. bulgaricus* mais la cinétique d'acidification dans le yoghurt est rapide en présence de cette dernière ce qui engendre une perte importante de viabilité des bifidobactéries au cours du stockage à pH 4.5 (Shah, 1997).

Contrairement aux autres espèces de bifidobactéries, *Bifidobacterium lactis* est capable de croître à des concentrations élevées d'oxygène (supérieures à 5%) (Janer et al., 2004 ; Simpson et al., 2004).

II.1.8. Les bifidobactéries en tant qu'agents aromatisants

Certaines études ont mis en évidence le rôle des bifidobactéries en tant qu'agents aromatisants. Les produits laitiers contenant des bifidobactéries ont un goût et un arôme typiques qui est distinct des saveurs habituellement produites par les bactéries lactiques (Rasic et Kurman, 1983).

Ainsi, Yuguchi et al. (1989), ont évalué la capacité de cinq souches de *Bifidobacterium*, de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus*, en monoculture ou en culture mixte, à produire des composés volatils.

Il a été constaté que les espèces *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum* et *B. breve* produisaient de petites quantités de composés aromatiques tels l'acétaldéhyde, le diacétyl, le 2- butanol et le sulfure de diméthyle.

Dans la fermentation en monoculture, il est rapporté que la souche *B. breve* ATCC 15700 est la souche produisant la plus grande concentration d'acétaldéhyde alors que la souche *B. longum* BB-536 produisait de très grandes quantités d'éthanol. Pour ce qui est des fermentations faites en culture mixte, il a été remarqué que la production d'acétaldéhyde et de diacétyl était plus importantes en monoculture alors que la production d'éthanol l'était moins.

L'équipe de Imhof et al. (1995) a fait une étude exhaustive sur le dosage des composés volatils présents en faible concentration (<1µg/kg) produits par différents ferments lactiques.

Dans cette étude, les espèces *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum* et *B. infantis* produisaient de l'éthanol, du propanol, du 2,3-butanediol, du butanol, du 2- pentanol, du 2,3-pentanediol, du pentanal, du pentan-2-ol-4-01 ainsi que du 2- heptanol lorsqu'elles étaient ensemencées en monoculture dans du lait.

Ces chercheurs ont aussi constaté que la formation des composés volatils organiques avait lieu principalement durant les 6 premières heures de fermentation ou durant les 24 premières heures de l'entreposage du produit.

Il a aussi été remarqué que seuls quelques-uns des composés dosés avaient une influence sur l'arôme des produits. Ces composés étaient le diacétyl, le 2,3-pentanediol, le sulfure de diméthyle et le benzaldéhyde.

L'équipe de [Murti et al. \(1992\)](#) a aussi mis en évidence l'effet de la croissance de *Bifidobacterium* sp sur les composés aromatiques dans un extrait de soja et dans le lait de vache.

La souche de *Bifidobacterium* sp. utilisait et réduisait les concentrations initiales de n-hexanal et de pentanal, présents dans l'extrait de soja, et qui sont considérées comme responsables du goût désagréable des produits faits à base d'extrait de soja. De plus, la souche produisait de l'éthanol, de l'acétone, du butanal et de l'acétaldéhyde.

Une étude menée par l'équipe de [Roy et al. \(1997\)](#) sur la production de yoghurts avec des bifidobactéries démontre que l'ajout des bifidobactéries modifie la concentration de certains composés aromatiques au cours de l'entreposage du produit.

En effet, la production d'éthanol était plus importante pour les yoghurts contenant des bifidobactéries variable selon la souche utilisée. De plus, il n'y avait pas de différence significative entre le yoghurt témoin (sans bifidobactéries) et les yoghurts contenant des bifidobactéries, en ce qui concerne la quantité d'acétaldéhyde, d'acétone et de diacétyl.

Une autre étude faite par l'équipe de [Huang et Huang \(1997\)](#), a consisté à préparer du yoghurt avec une culture lactique composée de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* et *Bifidobacterium* spp.

Les principaux composés volatils dosés sont le diacétyl, acétaldéhyde, l'acétone, l'alcool 2-butylique et l'éthanol. Il a été constaté qu'à l'exception de l'acétaldéhyde et du diacétyl, les autres composés provenaient du lait cru ou encore du traitement thermique appliqué au lait.

Lorsque les auteurs ont comparé la production des différents composés volatils entre le yoghurt fait avec bifidobactéries et celui fait sans bifidobactéries, ils ont

constaté qu'il n'y avait pas de différence entre les deux yoghurts à l'exception de la concentration d'acide acétique qui était plus importante dans les yoghurts contenant des bifidobactéries.

II.1.9. Les bifidobactéries comme indicateurs de contamination fécale

Les bifidobactéries ont été proposées comme indicateurs de contamination fécale puisqu'elles représentent l'un des plus importants groupes bactériens des fecés humaines et animales (Matsuki et al., 1998; 1999).

Puisque les espèces de bifidobactéries dominantes dans les fecés humaines et animales sont différentes (Gavini et al., 1991), il est possible de déterminer l'origine de la contamination (Delcenserie et al., 2005). Ces bactéries ont récemment été proposées comme indicateurs de contamination fécale de l'eau (Nebra et al., 2003), de la viande ainsi que des échantillons de lait cru (Gavini & Beerens, 1999 ; Beerens et al., 2000).

II.2. *Staphylococcus aureus*

Les bactéries contaminent de nombreux produits alimentaires et peuvent constituer un grave danger pour leur qualité et leur conservation. Plusieurs espèces présentent un danger au point de vue sanitaire. Ces bactéries pathogènes ont des conditions favorables de vie (Tableau 7).

L'apparition de la maladie infectieuse peut résulter de l'absorption d'un nombre très faible de micro-organismes. Ainsi quelques centaines de cellules sont parfois suffisantes. Donc la présence de ces micro-organismes ne peut être acceptée dans les aliments. Les micro-organismes les plus souvent incriminés sont *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*. Parmi les autres micro-organismes rencontrés, on trouve *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* etc (Guiraud, 1998).

II.2.1. Caractères microbiologiques

S. aureus est une bactérie sphérique (coccus) dont l'examen microscopique la montre en paires, courtes chaînes, ou formant des grappes à gram positif (Figure 4). Plusieurs souches sont capables de produire des toxines bactériennes hautement thermostables qui causent des troubles chez l'humain (Redman, 2000).

Les *Staphylococcus* sont présents dans le passage nasal, la gorge, les cheveux et la peau de 50% ou plus des individus sains sans causer de malaise (Fueyo, et al., 2005).

Tableau 7 : Comportement de diverses bactéries pathogènes en fonction du pH, de la température et de l'activité de l'eau a_w (conditions de toxinogénèse) (Guiraud, 1998).

Souches bactériennes	pH favorable	Température favorable (°C)	a_w limite
<i>Aeromonas</i>	4.5/9.0	2/45	0.94
<i>Bacillus cereus</i>	4.5/9.3	5/55	0.95
<i>Brucella</i>	4.5/8.8	6/42	-
<i>Campylobacter</i>	4.9/9.0	32/45	0.98
<i>Clostridium botulinum</i>	4.5/8.5 (4.5/8.5)	10/50 (12/48)	0.935
<i>Clostridium perfringens</i>	5.5/8.0	15/50	0.93
<i>Escherichia coli</i>	4.4/9.0	7/46	0.95
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.4/9.4	8/45	0.93
<i>Plesiomonas</i>	4.0/9.0	5/46	-
<i>Salmonella</i>	3.8/9.5	7/46	0.945
<i>Shigella</i>	5.0/9.2	7/46	0.94
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0/9.8 (4.5/9.6)	7/48 (10/48)	0.83 (0.86)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4.8/9.3	10/45	-
<i>Vibrio cholerae</i>	5.0/9.6	10/43	0.97
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4.8/11	5/43	0.94
<i>Vibrio vulnificus</i>	5.0/10	8/43	0.96
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4.2/9.6	-1.3/42	0.945

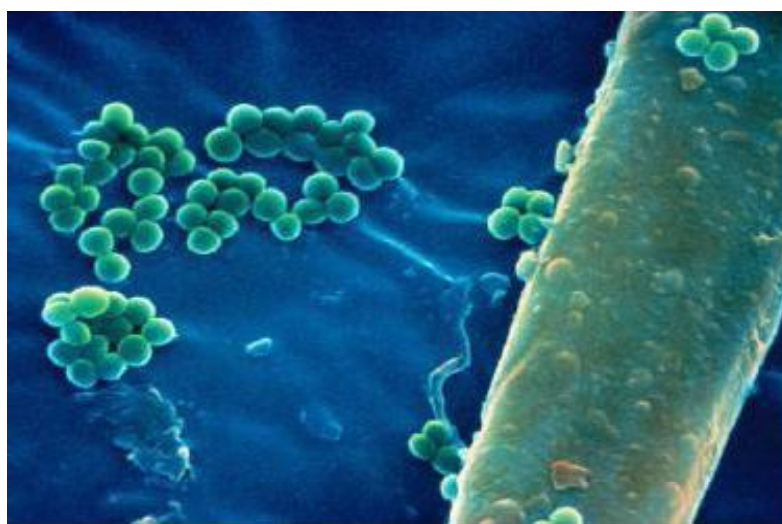


Figure 4 : *Staphylococcus aureus* sur un sol en PVC avec une poussière x 4000 (Kaltenbach & Heitz 2004).

Staphylococcus peut survivre dans l'air, la poussière, les égouts, l'eau, le lait, les équipements alimentaires et les surfaces.

Puisqu'elle est tellement omniprésente, il est difficile de prévenir sa transmission. Elle a été fréquemment détectée comme contaminant de produits alimentaires (Laukova et al., 1999). Quoique le nombre de cas constatés est relativement faible. Le nombre actuel est probablement plus élevé puisque plusieurs cas passent sans déclarations parce que la durée de la maladie est trop courte, et les symptômes ne sont pas sévères (Redman, 2000).

II.2.2. Nature de l'infection

De nombreux biotypes de l'espèce *Staphylococcus aureus* sont toxiques pour l'homme. Ces biotypes sont entérotoxiques par l'intermédiaire d'une toxine thermorésistante qui est libérée dans les aliments pendant la croissance.

Sept types d'enterotoxines sont actuellement connus : A, B, C1, C2, C3, D, E (une toxine F ou H est parfois mentionnée).

Les staphylocoques sont fréquemment impliqués dans des toxi-infections alimentaires et collectives après consommation de viandes ou laitages, ils sont responsables d'un tableau brutal associant diarrhées et vomissements survenant 2 à 6 heures après l'ingestion d'aliments contaminés, notamment par des porteurs chroniques (Aumaître et al., 2004).

Le champ le plus courant de l'intoxication alimentaire par les *Staphylococcus* est l'apparition très rapide des symptômes qui débutent 3 à 6 heures après l'ingestion, brutalement dans un contexte non fébrile, en associant des vomissements, une diarrhée aqueuse abondante, des douleurs abdominales et des céphalées. Ces signes évoluent favorablement en 24 à 48 heures (Delmee, 2003).

Plusieurs individus contaminés peuvent ne pas présenter tous les symptômes associés à la maladie. Dans les cas les plus sévères on constate des migraines, des crampes musculaires, des changements transitoires de la tension artérielle et du rythme cardiaque. Le rétablissement prend en général deux jours. Quoique, ce n'est pas inhabituel de prendre trois jours pour un rétablissement complet et parfois plus dans les cas sévères (Redman, 2000).

II.2.3. Nature des toxines secrétées

La plupart des souches de *S. aureus* produisent des toxines SHT ayant des activités biologiquement distinctes (Piemont, 1997).

Après colonisation, *S. aureus* sécrète des entérotoxines staphylococciques thermorésistantes dans les aliments qui peuvent engendrer des intoxications alimentaires après leur ingestion (Le Loir et al., 2003 ; Delmee, 2003). Au moins cinq entérotoxines antigéniquement distinctes ont été identifiées (Delmee, 2003).

Le début des symptômes de l'intoxication alimentaire aux *staphylococcus* dépend de la susceptibilité individuelle aux toxines, la quantité d'aliment et de toxine ingérées, et l'état de santé générale de la victime (Redman, 2000).

L'ingestion de 0.2 à 1µg d'enterotoxines des staphylocoques sécrétées par approximativement 10⁶ germes de *S. aureus* sont suffisants pour déclencher les symptômes décrits précédemment (Le loir et al., 2003).

II.2.4. Diagnostic et fréquence de l'infection

Le diagnostic de l'infection aux *Staphylococcus* commence par un entretien convenable avec les victimes, suivi de la récolte et de l'analyse épidémiologique des données. La présence d'un nombre relativement élevé de staphylocoques enterotoxiques est un indicateur de la présence de toxines. Dans les cas où l'aliment est traité pour tuer les staphylocoques, comme dans la pasteurisation ou la cuisson, une observation microscopique directe de l'aliment peut servir au diagnostic (Redman, 2000).

Le diagnostic peut aussi se faire par détection de la toxine par Elisa (isolable à partir de l'aliment incriminé) mais est rarement réalisé en raison de la labilité de la symptomatologie (Aumaître et al., 2004).

Staphylococcus aureus est la bactérie pathogène à responsabilité majeure d'une large gamme d'infections humaine et animale comportant des toxi-infections (Ananou et al., 2005).

Dans plusieurs pays, *S. aureus* occupe la troisième place des germes pathogènes responsables d'intoxications alimentaire après *Salmonella* et *Clostridium perfringens* (Bean et al., 1996). De telles épidémies sont fréquentes durant les mois chauds et sont classiques dans les repas de groupe (barbecue...) (Delmee, 2003).

L'incidence exacte de l'intoxication alimentaire par les staphylocoques est inconnue pour plusieurs raisons :

- Les maigres réponses des victimes durant le questionnaire avec les médecins
- Mauvais diagnostic de la maladie vue les symptômes similaires avec les autres causes d'intoxications alimentaires (comme les vomissements causés par *Bacillus cereus*)

- Mauvais conditionnement des échantillons
- Erreurs de manipulation de laboratoires.

Aux Etats-Unis, on a enregistré 1257 cas en 1983, 1153 cas en 1984, 412 cas en 1985, 250 cas en 1986 et 100 cas en 1987 (Redman, 2000).

II.2.5. Les aliments contaminés

Les aliments généralement soupçonnés dans les intoxications alimentaires aux staphylocoques sont les viandes et les produits carnés (incluant les saucisses fermentées) ; volaille et ovoproduits ; thon ; macaroni (Bryan, 1988; Floret, 2001).

Etant donné que cette bactérie est fréquente sur la peau et les mains, elle contamine souvent les aliments non cuits où elle peut proliférer si la "chaîne du froid" n'est pas respectée : pâtisserie, mayonnaises, charcuteries, crevettes, filet américain, salades de pommes de terre, sandwiches et lait (Delmee, 2003).

Les aliments qui subissent des manipulations considérables durant la préparation et qui sont entretenus à des températures légèrement élevées après la préparation sont aussi impliqués dans les intoxications alimentaires dues aux staphylocoques (Redman, 2000).

Les staphylocoques existent dans l'air, la poussière, l'eau, le lait, l'humain et l'animal. L'homme et l'animal en sont le principal réservoir car ces bactéries sont présentes dans le passage nasal, la gorge, sur les cheveux et la peau de 50% ou de la plupart des individus sains (Damm et al., 2004).

Généralement, L'intoxication alimentaire des humains est causée parce que l'aliment est entreposé soit à des températures suffisamment élevées (60°C et plus) soit suffisamment basses (7.2°C et moins) (Redman, 2000).

II.2.6. Responsabilité de *Staphylococcus aureus* dans les différentes symptomatologies.

II.2.6.1. Les diarrhées associées aux antibiotiques (DAA)

Leur incidence varie dans la population générale de 5 à 25 % en fonction de l'antibiotique prescrite et du terrain. Elles représentent un des effets indésirables les plus fréquemment rencontrés lors d'une antibiothérapie (Bartlett, 2002). Ces diarrhées sont le plus souvent bénignes, liées à un déséquilibre de la flore digestive favorisée par le traitement antibiotique, et régressent à l'arrêt de l'antibiothérapie (Kaltenbach & Heitz 2004).

Toute diarrhée, même apparemment banale, peut entraîner chez une personne âgée fragile une déshydratation ou aggraver une dénutrition, et contribuer à déstabiliser une situation précaire (Jeandel *et al.*, 1996 ; Slotwiner-Nie & Brandt, 2001).

La responsabilité de *S. aureus* en tant qu'agent étiologique des diarrhées associées aux antibiotiques (DAA) et des colites pseudomembraneuses a été évoquée dès 1950 car la bactérie a été isolée de façon prédominante dans les selles de patients présentant des diarrhées survenues après une antibiothérapie (Oeding & Austarheim, 1954 ; Altemeier *et al.*, 1963).

À partir de 1990, la responsabilité de *S. aureus* dans certaines diarrhées postchirurgicales et postantibiotiques a été évoquée à nouveau ; ces souches de *S. aureus* sont presque toujours méticilline-résistantes (Kodama *et al.*, 1997) et produisent une entérotoxine A et une leucotoxine LukE-LukD (Gravet *et al.*, 1999), qui expérimentalement dégradent l'épithélium intestinal après ligature des anses chez le lapin.

Les diarrhées à *S. aureus* surviennent essentiellement après la prescription de fluoroquinolones, associées ou non à d'autres molécules anti-infectieuses (Kaltenbach *et al.*, 2003). Elles entraînent un déséquilibre de la flore digestive et permettent la sélection de *S. aureus* méticilline-résistants, retrouvés dans la majorité des DAA à *S. aureus*.

Le traitement des DAA sévères à *S. aureus* reposerait sur la prescription de vancomycine par voie orale (500 mg deux fois par jour) ; dans les diarrhées banales, l'arrêt de l'antibiotique responsable semble suffisant (Gravet *et al.*, 1999).

II.2.6.2. Syndrome de peau échaudée aux staphylocoques

Le syndrome de peau échaudée aux staphylocoques [Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS)] est rarement fatal chez les enfants mais cause la mortalité à plus de 50% d'adultes ayant un sérieux problème médical sous-jacent (Cribier, *et al.*, 1984). Les toxines exfoliatives de *Staphylococcus aureus* sont responsables des lésions de peau des SSSS (Figure 5) (Ladhani, 2003).

L' α toxine est l'hémolysine la plus commune et elle est extrêmement puissante causant la lyse de érythrocytes et de plusieurs autres types de cellules. Elle est également connue pour son effet destructif des fibres musculaires lisses et tue les cellules dermales (dermonécrose) (Ongawa, 2002).



Figure 5: Aspect d'un syndrome de peau échaudée aux Staphylocoques (ou SSSS) généralisé chez un enfant de deux ans (Ladhani, 2003).

II.3. *Bacillus cereus*

II.3.1. Caractères microbiologiques

Bacillus cereus est une bactérie gram positive en bâtonnet, aérobie facultative, sporulaire non déformante (Delmee, 2003 ; Jaaskelainen et al., 2004). Les spores sont thermorésistantes (Aumaître et al., 2004). Ces caractéristiques sont communes avec *B. cereus* var. mycoides, *B. thuringiensis* et *B. anthracis*. La différenciation de ces microorganismes dépend de la détermination de la motilité, la présence de cristal de toxines et de leur activité hémolytique (Redman 2000).

La bactérie *B. cereus* comme les autres bacilles produit de grandes quantités d'enzymes protéolytiques qui dégradent la caséine et causent une flaveur et une odeur anormale du lait (Asano et al., 1997).

II.3.2. Nature et symptomatologie de l'infection

Une intoxication alimentaire causée par *B. cereus* est une description générale, quoique deux types reconnus de maladies sont causées par deux types distincts de métabolites (Redman 2000). En se développant dans les aliments mal cuits, ces bactéries sont responsables de toxi-infections alimentaires et collectives.

Bacillus cereus produit une entérotoxine, des hémolysines et une lécithinase (Beecher, & Wong, 1997 ; Granum, & Lund, 1997).

Les réponses émétiques sont associées avec la consommation de riz, pâtes et pâtisseries qui sont des lieux de prédilection de *B. cereus* qui y produit ses toxines

(Granum, & Lund, 1997). Les syndromes diarrhéiques sont causés par les entérotoxines produits durant la croissance végétatif de la bactérie dans le gros intestin.

Par ailleurs, une grandes variété d'aliments incluant les viandes, les plats végétaux, les soupes et les produits alimentaires sont impliqués dans ces malaises (Gilbert, 1979 ; Granum et al., 1993).

II.3.3. Nature des toxines secrétées

Les symptômes des types de diarrhées causées par une intoxication alimentaire due à *B. cereus* sont semblables à ceux de *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus* (Redman, 2000 ; Delmee, 2003).

Le type émétique des intoxications alimentaires à *B. cereus* est caractérisé par les nausées et les vomissements dans le délai de 0.5 à 6 heures après consommation d'aliments contaminés.

L'identification de l'agent responsable de ce type d'intoxications alimentaires, dont *B. cereus* est impliqué, a révélé l'existence d'une toxine thermostable formée dans les aliments (Turnbull et al., 1979 ; Delmee, 2003).

Il s'agit d'une molécule nommée cereulide (un peptide cyclique de 1.2 kDa) extrêmement stable, et pour laquelle on n'a pas trouvé de méthodes d'inactivation (Jaaskelaine et al., 2004). En outre, elle résiste aux pH acides et aux enzymes protéolytiques (Andersson et al., 1998).

B. cereus sécrète une autre toxine, qui par contre, est thermolabile et provoquerait plutôt une diarrhée hydrique profuse avec crampes abdominales (Aumaître et al., 2004). Les symptômes durent généralement moins de 24 heures et sont comparables à ceux causés par *Staphylococcus aureus* (Redman, 2000).

La présence d'un nombre élevé de *B. cereus* (supérieur à 10^6 germes/g) dans un aliment est un indicateur d'une croissance active et d'une prolifération de ce micro-organisme et cela constitue un danger potentiel pour la santé (Redman, 2000 ; Delmee, 2003).

II.3.4. Diagnostic et fréquence de l'infection

La confirmation de *B. cereus* comme agent étiologique dans l'explosion de l'intoxication exige l'isolement de la souche du même sérotype de l'aliment suspect et des fèces ou du vomi du patient (Redman, 2000).

Différentes géloses sélectives existent pour l'isolement, l'identification et la numération de *Bacillus cereus* à partir de produits alimentaires. La recherche à partir de selles est possible, de même que la recherche de l'entérotoxine (kits commercialisés). Mais ces recherches ne sont pas routinières (Aumaître et al., 2004).

II.3.5. Les aliments contaminés

Une large variété d'aliments englobant les viandes, le lait, les poissons et les produits végétaux est associée avec le type d'intoxication alimentaire diarrhéique. L'expression du type vomitoire a généralement été associée avec le riz. Néanmoins, les autres aliments comme les pommes de terre et les produits fromagers ont aussi été incriminés. Les mélanges alimentaires tels que les sauces, desserts, soupes, gâteaux et les salades ont fréquemment été incriminés dans l'incidence de l'intoxication alimentaire (Redman, 2000 ; Delmee, 2003).

La germination des spores peut être déclenchée par plusieurs facteurs, incluant des nutriments (sucres et acides aminées) et des minéraux comme le calcium (Paidhungat et al., 2001).

Les microorganismes psychrotrophes s'adaptent au froid par changement de la composition de leurs lipides membranaires (Tableau 8) pour maintenir la fluidité des membranes (Abriouel et al., 2002).

D'autres manifestations cliniques dues à l'invasion par *B. cereus* telles que les mastites bovines, systémiques sévères, infections pyogéniques, gangrènes, méningites septiques, cellulites, panophtalmites, abcès pneumonique, morts infantiles et les endocardites ont été rapportées (Redman, 2000).

Tableau 8 : La composition en acides gras de *B. cereus* LWL1 en croissance sous différentes températures (Abriouel et al., 2002).

Acides gras en %	à 37°C	à 5°C
Acide Dodecanoïque	0.22 ± 0.41	1.12 ± 0.25
acide 11-Méthyllaurique	0.21 ± 0.34	12.14 ± 0.74
acide Tridecanoïque	0.12 ± 0.15	1.42 ± 0.56
acide Tetradecanoïque	1.70 ± 0.45	16.74 ± 1.02
acide 13-Méthylmyristique	3.18 ± 0.87	0.25 ± 0.1
acide Hexadecanoïque	70.28 ± 1.38	37.73 ± 0.87
acide Octadecanoïque	24.83 ± 0.74	30.78 ± 1.23

Chapitre III

Bactériocines, Toxines et Antagonisme

CHAPITRE III. BACTERIOCINES, TOXINES ET ANTAGONISME

III.1. Bactériocines

L'utilisation de substances antimicrobiennes dans la lutte contre la détérioration des aliments par les micro-organismes a suscité un regain d'intérêt motivé par la demande des consommateurs pour des aliments sécurisés et naturellement préservés (Garcia et al., 2003).

Ainsi, la notion de biopréservation des aliments est une nouvelle tendance de plus en plus réclamée par le grand public qui est de moins en moins rassuré par les préservateurs chimiques ou autres jusqu'ici largement utilisés dans l'industrie alimentaire.

Les bactériocines font partie de ces nouveaux biopréservateurs dont tout le monde en parle et que le législateur n'a pas encore autorisé leur large utilisation en raison de l'insuffisance des connaissances accumulées sur le sujet

III.1.1. Définition et historique

Les bactériocines sont des substances de nature protéique, de synthèse ribosomiale et de libération extracellulaire (Garneau, et al., 2002), possédant une activité antimicrobienne, et qui sont produites par plusieurs types de bactéries (Garcia et al., 2003).

La production d'une bactériocine peut être considérée comme une façon d'éliminer des bactéries envahissantes qui font compétition à la bactérie productrice pour les nutriments (Rammelsberg, & Radler, 1990). L'élimination de micro-organismes contaminants est meilleure lorsqu'on utilise des bactéries productrices de bactériocines (Ogawa et al., 2001).

Le spectre d'activité d'une bactériocine se définit comme étant la diversité des bactéries sensibles à l'action bactéricide ou bactériostatique du peptide (Dykes, 1995). On a d'abord attribué aux bactériocines un spectre d'activité limité aux bactéries taxonomiquement proches de la bactérie productrice (Tagg et al., 1976).

Nous savons aujourd'hui que certaines bactériocines possèdent un large spectre d'activité qui touche des bactéries phylogénétiquement éloignées (Tableau 9) (Baba & Schneewind, 1998).

Tableau 9 : Résumé des propriétés des bactériocines (Baba & Schneewind, 1998).

Bactériocine	Hôte	Taille ^a	Modifi- cation ^b	Organisme cible	Fonction
Colicines à Pore	<i>Escherichia coli</i>	25-80 kDa	Non	Bactérie à Gram -	Tension ouverte de pore
Colicine nuclease E9	<i>Escherichia coli</i>	583 aa	Non	Bactérie à Gram -	Nucléase
Colicine M	<i>Escherichia coli</i>	271 aa	Non	Bactérie à Gram -	inhibiteur des Lipid-carrier
Microcine C7	<i>Enterobacterie s</i>	7 aa	C, N	<i>E. coli</i>	Synthèses des Protéines
Microcine B17	<i>Escherichia coli</i>	43 aa	B	Bactérie à Gram -	Inhibiteur d'ADN gyrase
Colicine V	<i>Escherichia coli</i>	103 aa	Non	<i>E. coli</i> Enterobactéries	Pore
Microcine 25	<i>Escherichia coli</i> AY25	20 aa	N	Bactérie à Gram -	Inhibiteur de division cellulaire
Trifolitoxine	<i>Rhizobium leguminosaru m^d</i>	11 aa	B	<i>Rhizobium</i> spp.	Inhibiteur de nodulation
Nisine	<i>Lactococcus lactis</i>	34 aa	L	Bactérie à Gram +	Pore
Subtiline	<i>Bacillus subtilis</i>	32 aa	L	Bactérie à Gram +	Pore
Pep5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	34 aa	L, N	Bactérie à Gram +	Pore
Gallidermine	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	21 aa	A, L	<i>Propionibacterium acnes</i>	Pore
Epidermine	<i>S. epidermidis</i>	21 aa	A, L	Bactérie à Gram +	Pore
Cinnamycine	<i>Streptomyces spp.</i>	19 aa	L	Bactérie à Gram+	Inhibiteur de phospholipase A2
Cytolysine LL/LS	<i>Enterococcus faecalis</i>	38 aa/ 21aa ^f	L	Streptococci	Pore / hémolytique
Carnocine U148	<i>Carnobacterium piscicola</i>	4635 Da	L	Bactéries lactiques	Pore
Lactocine S	<i>Lactobacillus sake</i>	37 aa	D, L, N	Bactérie à Gram +	Pore
Lactacine F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	48 aa/ 57aa ^f	Non	Lactobacilli, <i>E. faecalis</i>	Pore
Sakacine A	<i>Lactobacillus sake</i>	41 aa	Non	<i>Listeria</i> spp.	Pore
Pediocine PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	44 aa	Non	<i>Listeria</i> spp.	Pore
Lactococcine A	<i>Lactococcus lactis</i>	68 aa	Non	Bactérie à Gram +	Pore

Tableau 9 : (Suite et fin)

Lactococcine Gα/β	<i>Lactococcus lactis</i>	35 aa/ 39aa ^f	Non	Bactérie à Gram +	Canal de potassium
AS 48	<i>Enterococcus faecalis</i> ^g	70 aa	Non	Une variété de microorganismes	Pore
Lysostaphine	<i>Staphylococcus simulans</i> ^h	22 kDa	Non	Staphylococci	Glycylglycin endopeptidase

^a représente le nombre d'acides amines(aa) ou la masse (Da).

^b A : cercle d'aminovinyle au carboxyle terminus ; B : Modification de microcineB17 –like avec oxazole et/ou thiazole ; C : Modification du carboxy-terminale avec un nucléotide ; D : D, alanine contenant un peptide ; L : L, lanthionine contenant un peptide ; N : Blocage de l'Amine terminale

^c Secrété par les bactéries à Gram -.

^d *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*.

^e Secrété par les bactéries à Gram +.

^f deux composés de bactériocines

^g *Enterococcus faecalis* subsp. *Liquefaciens* S-48.

^h *Staphylococcus simulans* bv. *staphylolyticus*

La découverte des bactériocines date de 1925 quand Gratia a observé l'inhibition de la croissance d'*E. coli* par la souche V (virulente en infection expérimentale) de la même espèce bactérienne.

La substance inhibitrice produite était thermostable et dialysable à partir du milieu liquide. Elle conservait ses propriétés antagonistes à haute dilution. Ce produit fût nommé colicine (Gratia, 1925).

Les connaissances au sujet des colicines sont surtout attribuables aux travaux de Fredericq (1948, 1957). La colicine V est classée comme une microcine (Faith et al., 1992). Les microcines ont un poids moléculaire inférieur à 10 kDa, sont produites par les Enterobacteriaceae et sont actives contre d'autres bactéries à Gram négatif (Bacquero et Moreno, 1984).

III.1.2. Nomenclature des bactériocines

La nomenclature des bactériocines doit être standardisée. Actuellement plusieurs auteurs utilisent la dérivée du nom soit de l'espèce soit du genre de la souche

productrice suivi d'un code alphabétique ou numérique qui désigne la spécificité de cette souche.

Par exemple, la lactococcine est produite par *Lactococcus lactis* et monocine par *Listeria monocytogene* (Dykes, 1995). Le résultat de cette pratique est la nomination de la même bactériocine avec différents noms, par exemple, la bactériocine produite par *Carnobacterium piscicola* a pris les noms de piscicoline, pisciocine, carnobactériocine et carnocine. Dans d'autres cas, l'appellation canocine est utilisée pour la bactériocine produite par *Leuconostoc carnosum* (LA54A).

Un autre cas est celui de la bactériocine produite par *Lactobacillus acidophilus* qui recoit les noms de lactacine, ecidocine, acidoline et acidophilutine. Ces exemples montrent la nécessité d'uniformiser cette nomenclature pour éviter les confusion (Schillinger, & Holzapfel, 1996).

III.1.3. Biosynthèse et sécrétion des bactériocines

Les bactériocines sont codées par des gènes organisés sur un opéron contenant: un gène structural, un gène d'immunité, un gène codant pour les protéines de transport et de sécrétion et un gène codant pour les protéines de maturation (Klaenhammer, 1993).

La production des bactériocines dépend principalement du pH, de la source de nutriments et de la température d'incubation (Todorov et al., 2005). Le niveau d'activité des bactériocines n'est pas toujours en corrélation avec la masse cellulaire ou avec le taux de croissance de la souche productrice (Kim et al., 1997 ; Bogovic-Matijasic & Rogelj, 1998).

La biosynthèse de la plupart des bactériocines a lieu durant ou à la fin de la phase exponentielle de croissance (Ammor et al., 2005b). Le mécanisme de biosynthèse et de sécrétion des bactériocines comporte deux étapes:

▼ La première étape concerne la synthèse d'une pré-probactériocine, précurseur de la bactériocine, est synthétisée par un mécanisme conventionnel ribosomique via la transcription et la traduction de l'information génétique (Hurst & Patersson, 1971).

▼ La deuxième étape consiste en un transport de la protéine à la surface de la membrane cellulaire. La bactériocine biologiquement active est obtenue après clivage du précurseur par des enzymes de maturation (Koponen et al., 1998).

Ces enzymes sont produites en phase exponentielle de croissance et sont thermolabiles, et leur activité est réduite après 30 min à 30°C. Certaines bactériocines,

surtout celles ne comportant pas de lanthionine, sont caractérisées par un dipeptide Gly-Gly où se produit le clivage du prépeptide pour produire la bactériocine mature (Jack et al., 1995).

III.1.4. Structure chimique des bactériocines

Plusieurs bactériocines produites par différentes bactéries lactiques ont été étudiées, mais les travaux portant sur leur nature chimique sont plus rares. La nisine est la bactériocine la plus étudiée du point de vue structure chimique et déterminants génétiques (Buchman et al., 1988). L'existence d'acides aminés non usuels, comme la lanthionine ou la β -méthyllanthionine, a été observée dans la structure de la nisine, de la lactocine S et de la lactacine 481 d'où leur nom de lantibiotiques (Schnell et al., 1988).

Les bactériocines diffèrent les unes des autres en fonction de leur sensibilité aux variations de pH et de température. Plusieurs bactériocines produites par les bactéries lactiques sont stables à pH acide et à pH neutre et elles sont inactivées à pH supérieur à 8. La résistance à la chaleur, qui est une caractéristique majeure de plusieurs bactériocines des bactéries lactiques, peut varier considérablement dans une marge de 60°C ou 100°C pour plus de 30 min à une température de 121°C pendant 15 à 20 min (De Vuyst & Vandamme, 1994).

III.1.5. Classification des bactériocines

Les bactériocines représentent une large classe d'hétérogénéité qui varie considérablement variable sur le plan du poids moléculaire, des propriétés biochimiques (tableau 10), de la sensibilité et du mode d'action (Klaenhammer, 1988). En 1993, Klaenhammer a défini quatre classes distinctes de bactériocines des bactéries lactiques selon les caractéristiques de leur composé actif :

- I) les lantibiotiques qui sont de petits peptides stables à la chaleur et comportant des acides aminés non usuels de type lanthionine et des résidus déhydratés l'exemple le plus connu des lantibiotique est la nisine (Fig. 6).
- II) les bactériocines A ont un faible poids moléculaire (10 kDa), sont relativement stables à la chaleur et dépourvues de lanthionine. Elles sont subdivisées en fonction de leur activité contre *Listeria*, en trois sous-classes:

IIa- les peptides avec une séquence N-terminale comportant, le motif -Tyr- Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys.

IIb- les complexes nécessitant deux peptides différents pour leur activité.

IIc- les peptides ayant des fonctions thiols actifs et nécessitant des résidus réduits de cystéine pour leur activité.

III) les peptides de haut poids moléculaire (> 30 kDa) sensibles à la chaleur.

IV) les bactériocines complexes contenant en plus d'une partie protéique des lipides ou des glucides qui sont nécessaires pour leur activité antimicrobienne.

Tableau 10 : Principales caractéristiques chimiques et physicochimiques de certaines bactériocines de type lantibiotiques produites par certaines bactéries lactiques (De Vuyst & Vandamme, 1994).

Bactériocines	Organismes	PM (Da)	Composition	Propriétés
Nisine	<i>Lactobacillus lactis</i>	3488	34aa, 1 Ianthionine 4-P-méthyllanthionines 1 déhydroalanine 2 déhydrobutyrines précurseur de 57aa séquence leader de 23 aa, site de clivage=Pro-Arg. Ile	sensible à l' α -chymotrypsine résistante à la trypsine, stable à la chaleur et à pH acide, instable à pH 6.8 ou supérieur. Active contre les bactéries à Gram positif
Lacticine 481	<i>Lactobacillus lactis</i> 481	2901	27aa, 2 Ianthionines 1 P-méthyllanthionine 1 déhydrobutyrine précurseur de 51 aa séquence leader de 24aa, site de clivage=Gly-Ala, LyS	sensible à l' α -chymotrypsine résistante à la trypsine, stable à la chaleur (pH 4,5-7,0), action bactéricide sur <i>Clostridium tyrobutyricum</i>
Lactocine S	<i>Lactococcus Sake</i> L45	3778	37aa, 2 Ianthionines 3 déhydroalanines 1 déhydrobutyrine précurseur de 68aa séquence leader 31 aa	Sensible à 100°C. pH 6.5 action bactéricide sur <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostocs</i>

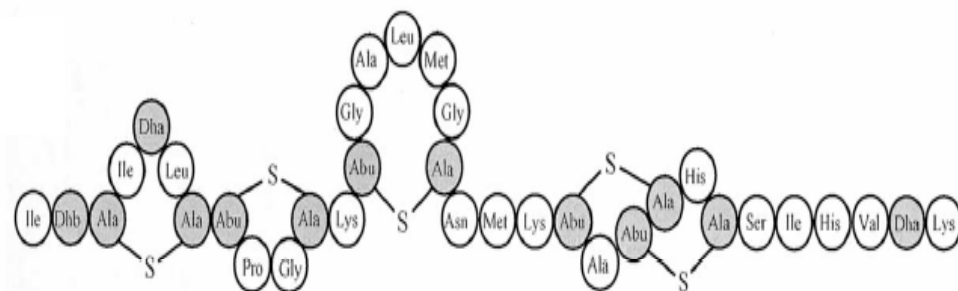


Figure 6 : Structure de la nisine (Hechard, & Sahl, 2002).

III.1.6. Mode d'action des bactériocines

Les bactériocines des bactéries lactiques agissant de différentes façons pour exercer leurs effets antimicrobiens, mais l'enveloppe cellulaire reste généralement la cible (Deegan *et al.*, 2006). Le mécanisme général d'action est la formation de pores (ou de canaux) dans la membrane de la bactérie cible (Figure 7) (Mathot *et al.*, 1996 ; McAuliffe *et al.*, 2001).

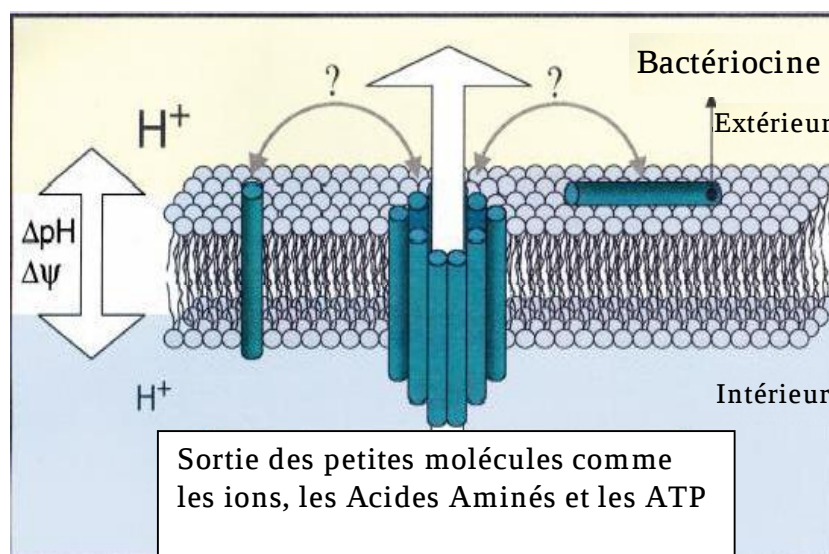


Figure 7 : Modèle général de formation de pores par les bactériocines (McAuliffe *et al.*, 2001).

Quoique la structure protéique des bactériocines diffère grandement, le mécanisme par lequel elles accomplissent leur activité bactériostatique ou bactéricide est remarquablement similaire.

Le déploiement de la force proton motrice transmembranaire est un mécanisme commun des bactéries lactiques et de plusieurs autres bactéries. La formation de pores ou canaux ioniques dans la membrane bactérienne par la bactériocines provoque une diminution du potentiel membranaire et une perte de la transduction membranaire et par conséquent l'épuisement de la force proton motrice de cette membrane cellulaire.

Ces canaux permettent la sortie des ions nécessaires pour la transduction de l'énergie. Après que la force proton motrice soit intégralement reliée avec l'énergie générée par la cellule, le résultat net est la mort cellulaire ou l'inhibition de la croissance (Dykes, 1995).

III.1.7. Bactériocines des bactéries lactiques

Même si les bactériocines peuvent être produites par plusieurs bactéries à Gram+ et à Gram-, ce sont celles des bactéries lactiques qui ont attiré une attention particulière durant ces dernières années en raison de leur potentiel biopréservateur utilisable en industrie alimentaire (Papagianni, 2003).

Jydegaard et al. (2000) avaient démontré que l'inhibition produite par les bactériocines dépendait de la phase de croissance de la bactérie cible. Cependant, les souches de lactobacilles et de bifidobactéries qui développent une activité antimicrobienne *in vitro* peuvent être inactives *in vivo* (Servin, 2004). Il est important de prendre en considération la tolérance ou la résistance de certaines espèces bactériennes cible des bactériocines commerciales comme la nisine vis-à-vis de laquelle, elles sont normalement sensibles (Ennahar et al., 2000).

III.1.7.1. Bactériocines des *Lactococcus*

La nisine est une des bactériocines produites par certains lactocoques. Elle possède un large spectre d'action englobant les lactocoques et d'autres bactéries lactiques à Gram positif, incluant des espèces de *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* et *Streptococcus* et plusieurs contaminants redoutables des aliments, mais elle n'a pas d'effet inhibiteur sur les bactéries à Gram négatif (Vandenbegh et al., 1993).

La lacticine 481 est une bactériocine du groupe des lantibiotiques de poids moléculaire de 17kDa, produite *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. Cette bactériocine exerce un effet antibactérien contre les autres lactocoques, les lactobacilles, les leuconostokes et *Clostridium tyrobutyricum* (Mackay et al., 1997).

La lactococcine G est une bactériocine produite par les souches de *Lactococcus lactis*, dans sa lutte contre la bactérie cible cette bactériocine forme des canaux sélectifs pour potassium (Moll et al., 1996).

III.1.7.2. Bactériocines des *Lactobacillus*

Le surnageant de *L. plantarum* inhibe les bactéries à Gram- : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, et *Salmonella typhimurium* par des valeurs supérieurs à 90% comparé au témoin (Lash et al., 2005).

Curvaticin FS47 est une bactériocine produite par *Lactobacillus curvatus* FS47 et qui a un effet inhibiteur contre *L. monocytogenes* (Mackay et al., 1997).

A 8°C, la bactériocine produite par *L. sakei* 1 inhibe *L. monocytogenes* et ce peptide reste stable durant toute l'expérimentation (Martinez & De Martinis, 2005).

III.1.7.3. Bactériocines des *Pediococcus*

Les pédiocoques sont importants dans la fermentation d'une variété de végétaux et viandes où elles jouent un rôle majeur dans la production d'acides et le développement de la flaveur (Klaenhammer et al., 1988). La production des substances inhibitrices par les souches de *Pediococcus* a été découverte par Fleming et al., (1975), qui avaient trouvé que *P. cerevisiae* FBB-61 inhibait la croissance de *Lactobacillus plantarum* et d'autres espèces de *Pediococcus* (Tableau 11).

Tableau 11 : Inhibition des microorganismes par *Pediococcus cerevisiae* FBB-61 cultivée sur agar (Fleming et al., 1975).

Cultures inhibées	Cultures non inhibées
<i>P. cerevisiae</i> (FBB-39, L-728, B-1325, B-1326, E-66, ATCC 8081)	<i>P. cerevisiae</i> L-7230
<i>P. pentosaceus</i> (183-IW, P-20, P-2)	<i>Lactobacillus brevis</i> 50
<i>P. acidilactici</i> (135, 146, SP-4, SP-5, SP-7)	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>L. plantarum</i> (WSO, 442, 68, 15)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 42	<i>Escherichia coli</i> (K-12, B)
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Aerobacter aerogenes</i>
<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i> NRRL Y-1627
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC10537	<i>Debaryomyces membranaefaciens</i> NRRL Y-1455
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Saccharomyces rosei</i> NRRL Y-1567
	<i>Candida krusei</i> NRRL Y-105

Par la suite, Graham & McKay (1985) ont isolé une bactériocine de la souche *P. cereviceae* EBB-63 et avaient suggéré qu'elle était liée aux plasmides.

La pédiocine est plus efficace contre les bactéries pathogènes putréfiantes comme *L. monocytogenes* et *S. aureus* (Cintas et al., 1998 ; Eijsink et al., 1998).

III.1.7.4. Bactériocines des *Leuconostoc*

La bactériocine produite par *Leuconostoc* sp. 20 inhibe la croissance de *Leuconostoc mesenteroides* A13 et *Lactobacillus plantarum* 33 (De Martinis & Freitas, 2003). *Leuconostoc gelidum* A-UAL187 et *Leuconostoc mesenteroides* TA33a, isolés

des viandes conservées sous vide et sous froid, produisent des bactériocines appelées respectivement leucocine A-UAL et leucocine TA33a et leurs spectre d'action comprend les bactéries lactiques, *L. monocytogenes* et *Enterococcus faecium* (Hugas, 1998).

Hechard et al. (1992) avaient montré que la mésentéricine Y105, bactériocine produite par *Leuconostoc mesenteroides*, fait preuve d'action bactéricide contre les souches de *Listeria*.

III.1.7.5. Bactériocines des *Carnobacterium*

Carnobacterium piscicola KLV17B isolée des viandes conservées sous vide produit deux types de bactériocines, nommées carnobactériocine B1 et B2, qui sont actives contre d'autres carnobactéries, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Listeria* et *Enterococcus*. De son côté la souche *Carnobacterium piscicola* JG126, isolée du jambon, produit une bactériocine nommée piscicoline 126 et manifeste une grande activité contre la listeria (Hugas, 1998).

La divercine V41 est une bactériocine produite par *Carnobacterium divergens* V41 (Vaz-Velho et al., 2005). Une fois appliquée sur des filets de saumons inoculés avec différentes souches de *L. monocytogenes*, la divercine V41 inhibe les souches pathogènes (Duffes et al., 2000).

III.1.7.6. Bactériocines des *Enterococcus*

De nombreuses souches d'entéroques associées aux aliments, principalement *E. faecalis* et *E. faecum*, sont capables de produire une variété de bactériocines, regroupées sous l'appellation «entérocline», avec activité contre *Listeria monocytogene*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., incluant *Clostridium botulinum* et *Clostridium perfringens* ainsi que *Vibrio cholerae*, *Salmonella choleraesuis* et *Bacillus cereus* (Abriouel, et al., 2002 ; Lasagno et al., 2002 ; Sarantinopoulos et al., 2002).

Eraso & Ines (2004) ont trouvé que les bactéries sont plus sensibles au stress oxydatif en présence de l'entérocline B comparé aux leucocytes, donc cette propriété peut être utilisée pour une application antimicrobienne potentielle de cette nouvelle bactériocine.

III.1.8. Bactériocines des *Bifidobacterium*

La bifidine est une bactériocine produite par *B. bifidum* NCDO 1452, qui inhibe la croissance d'*E. coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus* et

Pseudomonas fluorescens (Anand et al., 1985).

Yildirim & Johnson (1998) ont isolé une bactériocine appelé bifidocine B à partir de *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454 produite durant la phase exponentielle. Cette bactériocine était résistante aux enzymes catalase, peroxydase, lipase, lysosyme, cellulase, ribonucléaseA et l'amylase ainsi qu'aux solvants organiques comme l'acétone, l'héxane, chloroforme, méthanol, éther mais sensible à la protéase IV, pronase E, protéase XVII, protéinase K, trypsine, α -chymotrypsine, papaine et la pepsine. Avec un poids moléculaire de 3.3kDa la bifidocine B inhibait la croissance de différentes espèces de pathogènes comme *Listeria*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*.

III.1.9. Les différentes applications des bactériocines

La production des bactériocines est souvent proposée comme caractéristique bénéfique des bactéries probiotiques (Fooks, & Gibson, 2002), et elle est exploitée à des fins thérapeutiques et alimentaires.

III.1.9.1. Applications thérapeutiques

Etant donné leur antagonisme envers les bactéries pathogènes, les bactériocines et leurs organismes producteurs ont un grand intérêt dans les industries pharmaceutiques les utilisant comme probiotique (Green et al., 1999 ; Folli et al., 2003).

Les bactériocines facilitent l'implantation des souches probiotiques qui les produisent dans un environnement compétitif de l'intestin (Klaenhammer & Kullen, 1999).

La nisine est utilisée dans les formulations dermatologiques pour lutter contre les infections de la peau (Howell, et al., 1993).

Les bactériocines des *L. gasseri* déploient une bonne activité contre différentes espèces de *Clostridium* incluant *C. perfringens* et *C. difficile* (Bogovic-Matijasic, & Rogelj, 2000).

III.1.9.2. Applications alimentaires

La contribution des bactériocines au développement du créneau de la biopreservation des aliments prend, chaque jour, un peu plus d'ampleur (Jennifer et al., 2001 ; Klaenhammer, 1988). Tout comme les substances antagonistes non protéiques (acides organiques, H₂O₂, etc...), les bactériocines permettent d'augmenter la stabilité des produits alimentaires (Salminen et al., 1996).

Les bactériocines peuvent être appliquées sur les préparations carnées sous deux formes : soit par l'ajout brut ou une préparation de bactériocines semi-purifiées, soit par l'ajout de cultures pures de souches bactériocinogéniques (Ananou et al., 2005).

Pour réduire la prévalence de *Staphylococcus aureus* dans les produits laitiers, l'application des bactériocines et/ou des cultures produisant de bactériocines est efficace (Laukova et al., 1999).

L'enterocine EJ97 montre une activité antimicrobienne contre les bactéries impliquées dans la détérioration des aliments (*B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*) (Galvez et al., 1998).

L'utilisation des bactériocines seules ou en combinaison avec des traitements physicochimiques pour arrêter le développement sporulaire et la production d'entérotoxines peut être moyen efficace pour empêcher un empoisonnement par *B. cereus* (Jaquette & Beuchat, 1998).

Les résultats d'une étude réalisée par Huet et al. (2006) montrent que la formule alimentaire enrichie en probiotiques et à teneur réduite en protéines a une efficacité comparable aux formules classiques sur la croissance des nourrissons, et qu'elle est bien tolérée.

III.1.10. Dégradation des bactériocines

La dégradation des bactériocines est attribuée à deux processus différents : l'adsorption par les cellules productrices ou la dégradation protéolytique par les protéinases (De Vuyst et al., 1996 ; Bogovic-Matijasic, et al., 2001).

Cette dégradation a été observée simultanément avec la mort cellulaire, ce qui laisse penser que la lyse cellulaire et la libération des protéases intracellulaires induit la détérioration des bactériocines (Avonts et al., 2004).

III.2. Toxines microbiennes

III.2.1. Généralités

Divers microorganismes responsables de maladies graves peuvent être transmis par les aliments. Il s'agit d'infections locales (tube digestif) ou générales.

Le pouvoir pathogène d'une bactérie peut être dû à la production de différents types de toxines pouvant avoir diverses actions.

L'intoxication peut être provoquée par des germes non pathogènes qui peuvent,

s'ils se multiplient abondamment, produire des substances toxiques spécifiques (toxines « enzymatiques » pouvant favoriser un pouvoir infectieux), mais aussi des métabolites toxiques : ceci peut se produire *in vivo* mais survient le plus souvent en dehors de l'organisme, par exemple dans les aliments qui deviennent toxiques. Par ailleurs, des endotoxines peuvent, après lyse des microorganismes, contribuer à la toxicité.

Les intoxications sont provoquées par des microorganismes qui secrètent ou libèrent une ou plusieurs toxines spécifiques *in vivo* (diphtérie botulinique, entérotoxines staphylococciques). Dans ces derniers cas, la présence de la toxine est indépendante de celle des germes producteurs : on peut rencontrer la toxine seule, les germes ayant été éliminés après sa production, ou les deux conjointement. A l'opposé, la présence d'un germe réputé toxigène ne se traduit pas forcément par la présence de la toxine, car les conditions de production doivent être favorables et ne sont pas toujours identiques à celles du développement (Guiraud, 1998).

Les toxines microbiennes ont des poids moléculaires élevés et des propriétés antigéniques. La toxine qui ne correspond pas à ces critères sera considérée tout simplement comme poison.

La plupart des toxines microbiennes sont des protéines ou mucoprotéines ayant de multiples propriétés enzymatiques. Elles incluent plusieurs des substances les plus toxiques connues, comme les toxines du tétanos, toxines botuliques et toxines diphtériques (Cope et al., 2004).

Il en existe plus d'une centaine et elles sont produites aussi bien par des bactéries Gram + ($\approx 65\%$) que Gram - ($\approx 35\%$) (Guiraud, 1998).

Les toxines bactériennes peuvent être extrêmement dangereuses aux mammifères et peuvent affecter une variété de systèmes organiques, incluant le système nerveux et le système cardiovasculaire. Donc la gamme des empoisonnements provoqués par les bactéries est large (Cope et al., 2004).

Aussi, des composés peuvent être utilisés pour des causes bénéfiques, par exemple, les propriétés insecticides de *Bacillus thuringiensis*, dues à une toxine qui a été utilisée dans la lutte biologique contre les insectes (Cope et al., 2004).

III.2.2. Types de toxines

On subdivise les toxines en deux groupes, les exotoxines et les endotoxines, et on appelle entérotoxine, celles qui provoquent des altérations de la perméabilité

membranaire et en particulier du transport de l'eau et des électrolytes dans l'intestin. Les entérotoxines peuvent être aussi bien des exotoxines que des endotoxines et se rencontrent aussi bien chez les Gram + que chez les Gram - (Guiraud, 1998).

III.2.2.1. Les exotoxines

Les exotoxines sont surtout produites par des Gram + et libérées facilement dans le milieu. Il s'agit de protéines solubles, relativement thermolabiles, à fort pouvoir antigénique. Leur déterminisme génétique est chromosomique (toxine cholérique) ou plasmidique (entérotoxines d'*E. coli*).

Les exotoxines ont une toxicité forte et spécifique. Cependant elles permettent l'obtention facile d'anatoxines (vaccins) et de sérum antitoxiques. Le pouvoir toxique peut être énorme : la dose minimale mortelle varie selon la toxine et les hôtes de 10^{-3} à 10^{-6} mg (Guiraud, 1998).

III.2.2.1. Les endotoxines

Les endotoxines sont libérées après lyse cellulaire, souvent comme conséquence des réactions de défense. En général, elles sont produites par des bactéries Gram- liées au corps cellulaires. Il s'agit de complexes de nature lipoglycoprotéique issues de structure cellulaire (souvent membrane externe des Gram -).

La fraction protéique est responsable de l'antigénicité (faible) dont la spécificité est liée à la fraction glucidique ; alors que la fraction lipidique est impliquée dans l'activité toxique. Les endotoxines sont thermostables, leur toxicité est modérée : elles provoquent des troubles divers (Guiraud, 1998).

III.2.3. Conditions de production des toxines

On a trouvé que la production de cereulide par les différentes souches de *B. cereus* est minime ou non détectable aux environs de 37 °C et l'optimal de production est entre 15 et 30 °C (Tableau 12) (Haggbloom et al., 2002). Donc la production de toxine dans l'intestin de l'homme est minime ou absente, ce qui revient à dire que l'ingestion de toxine présente dans les aliments est la seule cause d'intoxication alimentaire par *B. cereus* (Jaaskelainen et al., 2004).

III.2.4. Recherche des toxines

Trois méthodes pour la détection des toxines émétiques ont été décrites : les essais de cytotoxicité et ceux à base de spermes (Ehling-schulz et al., 2004).

Tableau 12 : Effet de la température d'incubation sur la production des cereulides par *B. cereus* NC7401 (Haggbloom et al., 2002).

Température (°C)	Production de cereulide (µg / ml de culture)
4	0.016 ± 0.002
8	0.071 ± 0.003
21	13.2 ± 2.3

III.2.5. Mode d'action des toxines

Plusieurs bactéries pathogènes produisent des toxines qui provoquent la lyse de la cellule cible par interaction avec sa membrane. Ces toxines agissent sur la membrane cellulaire en formant des pores (Alouf, 2001).

Ce sont des cytotoxines qui agissent sur la couche lipidique de la membrane cellulaire : sphingomyelinases (β toxine de *S. aureus*) et phospholipases (α toxine de *C. perfringens*). Certaines de ces toxines existent sous forme de monomères hydro-solubles.

Après reconnaissance d'un récepteur cellulaire, elles adoptent une organisation oligomérique qui favorise l'insertion dans la membrane et la formation de pores (Berche, 2002).

Grâce à sa nature ionophorique, la cereulide abîme la mitochondrie et bloque la phosphorylation oxydative nécessaire pour la motilité des spermatozoïdes du porc (Ehling-schulz et al., 2004).

III.2.6. Comportement du tractus gastro-intestinal envers les toxines

La motilité du tractus intestinal joue un rôle significatif sur l'absorption des produits toxiques. Par exemple, le mouvement excessivement rapide du contenu gastrique peut réduire l'absorption par réduction du temps de résidence. La présence d'aliment dans l'estomac peut retarder le progrès des drogues de l'estomac vers l'intestin où se passe la plus grande absorption.

Les populations bactériennes résidentes peuvent métaboliser les toxines dans l'intestin mais la biotransformation dans le tractus intestinal suivie par l'absorption peut avoir un impact significatif sur la biodisponibilité des produits toxiques.

Si ces produits toxiques résistent aux réactions bactériennes et chimiques dans l'estomac et l'intestin grêle, ils seront absorbés dans le tractus intestinal et portés par les veines portes hépatiques au foie, qui est le site majeur du métabolisme (Baynes & Hodgson 2004).

III.2.7. Additifs alimentaires et contaminants chimiques

Actuellement, la tendance des consommateurs reflète l'augmentation de sa sensibilisation contre les risques dérivés non seulement des pathogènes mais aussi des conservateurs chimiques utilisés pour les contrôler (Abee et al., 1995).

Il y a certainement un millier d'additifs alimentaires utilisés à travers le monde (quelques exemples au tableau 13) dont plusieurs n'ont pas subi de tests adéquats. La question des interactions avec les composés alimentaires n'a pas été suffisamment explorée.

Les produits chimiques sont additionnés aux aliments pour plusieurs raisons : pour les préserver grâce à leurs propriétés antibactériennes, antifongiques ou antioxydantes ; pour leur changer les caractéristiques physiques particulièrement durant le procédé de fabrication ; ainsi que pour changer leur goût, couleur et leur odeur.

En général, les additifs alimentaires ont fait leurs preuves d'agents préservateurs sans toxicité chronique. Il ne sont utilisés qu'après étude toxicologique (Cope et al., 2004).

III.3. Antagonisme des bactéries probiotiques

L'effet inhibiteur que certaines bactéries exercent sur d'autres microorganismes est la propriété recherchée dans le but de contrôler les contaminations et le développement des infections (Eraso & Ines, 2004). Dans ce sens, les probiotiques sont utilisés pour réduire les troubles gastro-intestinaux (Davidson, Butler, 2000) et les bactéries inhibitrices employées par les différents auteurs sont isolées principalement des produits laitiers et de la microflore intestinale (Isolauri et al., 2000).

III.3.1. Envers *Bacillus cereus*

Lactococcus lactis subsp. *lactis* lac 952, *Lactobacillus casei* 2756 et *Lactobacillus plantarum* 2741 inhibent complètement *B. cereus* (<10⁴ ufc/ml) après 24h. Par contre la coculture des souches *Lb. acidophilus* NCFB 1748, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, *Lactobacillus brevis* 226 et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* 184L avec *B. cereus* induit une forme de résistance chez cette dernière qui survit sous

Tableau 13 : Exemples de produits utilisés comme additifs alimentaires (Cope et al., 2004)

Fonction	Classe	Exemples
Préservateurs ou conservateurs	Antioxydants Agents fongistatiques	Butylatedhydroxyanisole Acide ascorbique Acide methyl α -benzoic Propionates Nitrite de sodium
Structurants	Agents Anticaking Emulsifiant agents Chelateurs Stabilisateurs	Silicate de calcium Aluminosilicate de sodium Propylene glycol Monoglycerides EDTA Tartrate de sodium Gum ghatti Alginate de sodium Glycérol
Modification de la flaveur et du goût	Sucrants synthétiques Flaveurs synthétiques	Saccharin Mannitol Aspartame Pipéronal Vanilline
Modification de la couleur	Colorant synthétiques	Tartrazine (FD&C yellow5) Sunset Yellow
Supplément nutritionnel	Vitamines Acides aminés Suppléments inorganiques	Thiamine Vitamine D3 Alanine acide aspartique Sulfate de manganèse sulfate de zinc

forme de spore entre 10^3 - 10^6 ufc/ml selon la souche de bactérie lactique utilisée (Rossland et al., 2005).

La bactériocine AS-48 produite par la souche *Enterococcus faecalis* S-48 inhibe le développement de *B. cereus* qui se trouve dans l'incapacité de produire des toxines (Abriouel et al., 2002).

III.3.2. Envers *Staphylococcus aureus*

Eraso et Ines (2004) ont observé un changement dans la production d' O_2^- par *Staphylococcus aureus* traité par l'entérocline B conduisant à un stress oxydatif de cette bactérie.

Par contre Ammor et al. (2005b) trouvent que *S. aureus* est pratiquement insensible à la présence d'espèces d'*Enterococcus faecium*; alors qu'en présence d'espèces de *Vagococcus carniphilus* cette population pathogène est réduite de 2.7 log ufc/ml.

L'étude de Jamuna et al. (2005) a montré que l'effet de la nisine seule sur la croissance de *S. aureus* n'est pas important par rapport à une combinaison avec d'autres bactériocines et surtout avec celle de *L. casei* DFR JJ14 (LABB) (Tableau 14).

III.3.3. Envers *Helicobacter pylori*

H. pylori est devenue un problème clinique et thérapeutique et ses infections sont largement contrôlées par les antibiotiques, qui à long terme ne donnent pas satisfaction ; dans ce sens, l'utilisation des probiotiques qui peuvent interférer avec la colonisation des bactéries pathogènes apparaît comme une alternative intéressante pour pallier à ce fléau (Sgouras et al., 2004 ; Felly et Michetti, 2003).

Plusieurs espèces probiotiques ont provoqué une diminution significative de l'activité uréase d'*H. pylori* dont l'éradication est devenue possible (Sheu et al., 2002; Wang et al., 2004). L'effet probiotique des lactobacilles a été démontré *in vivo* et *in vitro* pour leur effet antagoniste contre *H. pylori* soit par la production d'acides organiques, soit par inhibition compétitive en occupant les sites de la muqueuse intestinale ainsi que par l'immunomodulation (Sgouras et al., 2004).

Les mécanismes d'inhibition de *H. pylori* par les lactobacilles ont montré l'implication des cellules probiotiques elles mêmes et de l'acide lactique qu'elle produisent dans le blocage de l'enzyme uréase du pathogène (Sgouras et al., 2004).

Tableau 14 : Effet d'une seule bactériocine ou de deux bactériocines associées sur la croissance de *S. aureus* (Jamuna et al., 2005).

Bactériocines (AU/ml)	log ufc/ml			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Nisine				
0	5.6±0.09	10.7±0.05	13.1±0.08	14.7±0.06
40	5.6±0.09	7.3±0.05	8.6±0.07	10.3±0.13
80	5.6±0.09	6.8±0.11	7.7±0.12	8.1±0.13
160	5.6±0.09	ND	ND	ND
LABB				
0	6.3±0.20	9.6±0.06	12.8±0.11	13.7±0.13
40	6.3±0.20	9.1±0.14	10.9±0.13	12.7±0.14
80	6.3±0.20	7.6±0.16	9.6±0.08	12.5±0.15
160	6.3±0.20	4.7±0.15	6.7±0.16	9.7±0.14
LABP				
0	6.1±0.13	12.6±0.32	14.2±0.13	14.7±0.22
40	6.1±0.13	10.9±0.18	13.7±0.20	13.9±0.36
80	6.1±0.13	10.7±0.15	12.7±0.12	12.9±0.14
160	6.1±0.13	ND	ND	ND
Nisine+LABB				
0	6.8±0.20	9.5±0.30	12.8±0.15	13.8±0.16
40	6.8±0.20	9.5±0.13	11.6±0.14	12.7±0.13
80	6.8±0.20	8.7±0.24	9.7±0.15	11.5±0.14
160	6.8±0.20	ND	ND	ND
Nisine+LABP				
0	6.1±0.22	11.9±0.32	12.7±0.12	13.5±0.15
40	6.1±0.22	ND	ND	ND
80	6.1±0.22	ND	ND	ND
160	6.1±0.22	ND	ND	ND

Les valeurs sont des moyennes ± écart type de trois expériences

ND—Non détecté ; AU— Activity Units

LABB: Bactériocine isolée de *L. acidophilus* DFR JJ13 ; LABP: Bactériocine isolée de *L. casei* DFR JJ14

III.3.4. Envers *Salmonella*

Une étude menée par Chaalel (2005) avait montré que *Salmonella paratyphi* présentait un pourcentage d'inhibition qui dépasse les 43% après 4h de coculture avec des souches de bifidobactéries.

De telles observations ont été également rapportées par Liévin *et al.* (2000) qui avaient constaté l'inhibition de la croissance *Salmonella typhimurium* ainsi que sa translocation intestinale par deux souches de bifidobactéries.

Bielecka *et al.* (1998) ont également testé plusieurs souches de bifidobactéries cocultivées pendant 48h avec différentes espèces de *Salmonella*. Ces auteurs ont constaté que pour *S. typhimurium* cocultivée avec *Bifidobacterium globosum* 40, ils obtiennent 58.7% d'inhibition, et pour *S. enteridis* 464 cocultivée avec *B. globosum* 6, ils enregistrent 59.4% d'inhibition.

En ce qui concerne l'espèce bifide *Bifidobacterium animalis*, Bielecka *et al.* (1998) constatent que la souche 21 cocultivée avec *S. enteridis* K1 exerce une inhibition de l'ordre de 60.9%; de même que les souches 49 et 31 cocultivées respectivement avec *S. enteridis* 968 et *S. enteridis* 9 provoquent 100% d'inhibition.

Par ailleurs, d'autres études *in vivo* (Bovee-Oudenhoven *et al.*, 1996) avaient montré que certaines souches de bifidobactéries augmentent la résistance des rats aux infections à *Salmonella*.

Tuomola et Salminen, 1998 ont observé que *Salmonella* survit et persiste avec un taux élevé dans les fèces des souris conventionnelles traitées avec un apport quotidien de *L. casei rhamnosus* GG.

III.3.5. Envers *E. coli*

L'exemple de l'inhibition de la colonisation de la toxine shiga d'*E. coli*, par *L. casei shirota* est probablement le résultat de l'augmentation de la réponse immunitaire locale (Ogawa *et al.*, 2001).

Gopal *et al.* (2001) qui avaient observé une décroissance de la viabilité d' *E. coli* comprise entre 5 et 6 log, lorsque ce germe pathogène était en contact pendant 3h avec certaines souches de bifidobactéries que ces auteurs avaient isolées et testées.

De même, Chaalal (2005) avait observé que les souches bifides isolées exercent un important effet inhibiteur, de l'ordre de 100%, après 4 heures de coculture.

De telles observations avaient également été faites par Gonzalez *et al.* (1993) (cités par Bielecka *et al.*, 1998) lorsqu'ils avaient cocultivé *E. coli* avec *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus acidophilus*.

Shu et Gill (2001) ont montré que la consommation de *Bifidobacterium lactis* HNO19, peut réduire la sévérité de l'infection à *E. coli* 0157: H7 entérohémolytique chez la souris, et diminuer la translocation du pathogène dans le sang, le foie et la rate. Ces effets sont accompagnés d'une augmentation de la capacité phagocytaire ainsi que de l'accroissement du titre des anticorps IgA spécifiques dirigés contre *E. coli*.

Hara *et al.* (1978), ont également démontré l'inhibition d' *E. coli* K-12 par *Bifidobacterium bifidum* N4. D'autres études réalisées par Suzuki *et al.* (1997), avaient rapporté l'inhibition de la croissance d'*E. coli* C 25 et de sa translocation intestinale par *Bifidobacterium longum*.

Muthukumarasamy et Holley, 2007 ont remarqué que la fermentation des saucisses en utilisant les bactéries probiotiques suivi de séchage réduisait la viabilité d'*E. coli* O157 :H7.

III.3.6. Envers *Listeria*

Les bactériocines de la classe IIa sont les plus forts inhibiteurs de la *Listeria monocytogene* et ont une séquence terminale de YGNGVXC (Ennahar *et al.*, 2000).

La bactériocine produite par *Carnobacterium piscicola* a montré un effet inhibiteur envers *Listeria monocytogene*, qui consiste à une réduction immédiate du nombre de cellules vivantes après exposition à la bactériocine (Bhugaloo *et al.*, 1996).

L'un des facteurs qui influencent l'inhibition de la *listeria monocytogene* par certains biopréservateurs incluant les bactériocines, est la phase de croissance à laquelle se trouvait la bactérie pathogène au moment du traitement avec la substance antimicrobienne (Jydegaard *et al.*, 2000).

En général, la bactérie est plus sensible à l'effet de cuisson et aux agents antimicrobiens durant la phase exponentielle de croissance (Schobitz *et al.*, 2003). Explicitement, la nisine et à moindre degré la pédiocine AcH, ont montré un plus grand effet inhibiteur sur les cellules de *L. monocytogene* durant la phase exponentielle de croissance qu'à la fin de la phase stationnaire (Jydegaard *et al.*, 2000).

Mataragas *et al.* (2003) trouvent que *Lactobacillus curvatus* L442 et *Leuconostoc mesenteroides* L124 ont un effet inhibiteur vis-à-vis différentes souches de *Listeria* comme le montre le tableau 15.

Tableau 15 : Activité antimicrobienne des souches *Lactobacillus curvatus* L442 et *Leuconostoc mesenteroides* L124 vis-à-vis de quelques souches de *Listeria* (Mataragas et al., 2003).

Souches	Zone d'inhibition (mm)	
	<i>Lactobacillus curvatus</i> L442	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> L124
<i>L. innocua</i> S1	10	6
<i>L. innocua</i> S2	10	6
<i>L. innocua</i> S3	8	6
<i>L. innocua</i> S4	8	4
<i>L. innocua</i> 7510 S1	6	6
<i>L. innocua</i> 7510 S2	10	6
<i>L. monocytogenes</i> S1	8	6
<i>L. monocytogenes</i> S2	6	6
<i>L. monocytogenes</i> S3	10	8
<i>L. monocytogenes</i> S4	10	8
<i>L. monocytogenes</i> S5	8	8
<i>L. monocytogenes</i> S6	8	6
<i>L. monocytogenes</i> S7	6	6
<i>L. monocytogenes</i> 6510	8	6
<i>L. monocytogenes</i> 5310	6	6

Dans une étude menée par Jamuna et al. (2005), l'effet de la nisine seule sur la croissance de *L. monocytogenes* n'est pas important comparé à celui d'une combinaison avec d'autres bactériocine et surtout avec celui de *L. casei* DFR JJ14 (LABB) (Tableau 16).

III.3.7. Envers *Clostridium*

Les différents membres du genre *Clostridium* sont sensibles à la pédiocine PD-1 produite par *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 (Dicks et al., 1995).

D'un autre côté, Trejo et al. (2006) ont constaté que le surnageant de la souche *Bifidobacterium longum* CIDCA 5323 contient des substances inhibitrices actives contre *C. difficile* à un pH neutre.

Lievin et al. (2000) n'avaient enregistré aucun effet inhibiteur de deux souches de bifidobactéries envers *C. perfringens* après 3 heures de contact.

De même, De Kwaadsteniet et al. (2005) ont constaté un effet positif avec un diamètre d'inhibition supérieur à 6mm du surnageant d'*Enterococcus mundtii* ST15 envers *C. sporogenes* LMG 13570 mais sans avoir d'effet sur *C. tyrobutyricum* LMG 13571.

Tableau 16: Effet d'une seule bactériocine ou de deux bactériocines associées sur la croissance de *L. monocytogenes* (Jamuna et al., 2005).

Bactériocines (AU/ml)	log ufc/ml			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Nisine				
0	6.1±0.10	12.2±0.13	12.9±0.14	13.3±0.16
40	6.1±0.10	8.6±0.15	9.3±0.10	9.6±0.10
80	6.1±0.10	3.3±0.14	7.3±0.13	9.2±0.11
160	6.1±0.10	ND	3.5±0.09	4.7±0.13
LABB				
0	5.9±0.10	12.0±0.13	12.3±0.17	12.6±0.11
40	5.9±0.10	8.6±0.09	8.6±0.13	8.9±0.13
80	5.9±0.10	6.7±0.12	7.3±0.15	7.8±0.13
160	5.9±0.10	ND	ND	ND
LABP				
0	5.9±0.20	12.1±0.09	12.7±0.19	12.9±0.10
40	5.9±0.20	9.5±0.13	9.8±0.10	9.9±0.15
80	5.9±0.20	8.6±0.08	8.9±0.09	9.0±0.11
160	5.9±0.20	ND	ND	ND
Nisine+LABB				
0	6.2±0.10	12.2±0.13	13.3±0.10	13.9±0.06
40	6.2±0.10	ND	ND	5.7±0.10
80	6.2±0.10	ND	ND	ND
160	6.2±0.10	ND	ND	ND
Nisine+LABP				
0	5.7±0.15	11.5±0.09	12.0±0.08	12.6±0.06
40	5.7±0.15	5.9±0.13	6.9±0.07	8.9±0.06
80	5.7±0.15	ND	ND	ND
160	5.7±0.15	ND	ND	ND

Les valeurs sont des moyennes ± écart type de trois expériences

ND—Non détecté ; AU— Activity Units

LABB: Bactériocine isolée de *L. acidophilus* DFR JJ13 ; LABP: Bactériocine isolée de *L. casei* DFR JJ14.

Chapitre IV

Matériels et Méthodes

CHAPITRE IV. MATERIELS ET METHODES

IV.1. Nature et origine des souches

IV.1.1. La souche de référence *Bifidobacterium longum* (BLR)

La souche *Bifidobacterium longum* de référence (BLR) (Tableau 17) nous a été aimablement fournie par le professeur Anna Maria Ferrari (Microbiologia Agaria Alimentare Ecologica Università Deglizi Studi, Milano, Italia).

IV.1.2. Les souches bifides expérimentales

Les souches expérimentales de *Bifidobacterium breve* codées Bbv1 et Bbv2, ainsi que celle de *Bifidobacterium longum* codées BLE proviennent de la collection de notre laboratoire (Laboratoire de Sécurité Alimentaire et Santé, Mostaganem) et ont été isolées à partir d'échantillons de selles de bébés allaités exclusivement au sein (Tableau 17).

IV.1.3. Les souches pathogènes

Les deux bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*) proviennent de collection de référence (Tableau 17).

IV.2. Milieux et conditions de culture

IV.2.1. Choix des milieux de culture

Pour les bifidobactéries, le milieu MRS (De Man *et al.*, 1960) additionné de cysteine-HCL pH 6.5 (Tableau 18) a été utilisé sous forme de bouillon (pour mettre en culture les bactéries) ou solide (pour le dénombrement). Il est préalablement stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

La mise en culture des bactéries pathogènes nécessite aussi un milieu liquide « Bouillon cœur cerveau » (milieu d'enrichissement) utilisé pour les deux souches et leur dénombrement se fait sur milieu solide « Agar au Mannitol au chlorure de sodium et au rouge de phénol » pour *Bacillus cereus* et « Baird Parker agar additionné d'une émulsion de jaune d'œuf tellurite 20% pour *Staphylococcus aureus* (Tableau 18).

Le milieu de dilution utilisé est le milieu de Ringer (Tableau 18) qui est réparti dans des tubes à essais (9 ou 10 ml par tube selon la dilution recherchée). Tous les milieux de cultures sont autoclavés à 121°C pendant 20 minutes.

Tableau 17: Souches utilisées dans la présente expérimentation.

Souche	Origine
1- Souches expérimentales de collection de notre laboratoire. - <i>Bifidobacterium breve</i> Deux souches Bbv-1 et Bbv-2 - <i>Bifidobacterium longum</i> (BLE)	Laboratoire de sécurité alimentaire et santé (Mostaganem)
2- Souche de référence. <i>Bifidobacterium longum</i> (BLR)	Université de Milan Italie
3- Souches pathogènes <i>Staphylococcus aureus</i> souches 49444 <i>Bacillus cereus</i> souches ATCC 9884	Microbiologics CE, St Cloud MN, USA American Type Culture Collection ; Rockville, MD, USA

Tableau 18: Milieux de culture utilisés dans l'expérimentation

Souche	Milieux	Origine du milieu de culture
<i>Bifidobacterium</i>	MRS agar (Réf. Cat.104300) De Man Rogosa et Sharpe, 1960) (milieu solide pour dénombrement)	Pronadisa laboratoire conda "Espagne"
	Bouillon MRS-C pH 6.5 (Réf. 1.10661.0500) De Man Rogosa et Sharpe, 1960) (milieu liquide pour culture)	Merck, "Germany"
<i>Staphylococcus aureus</i>	Baird Parker agar (Réf. 1.05406) additionné d'émulsion jaune d'œuf tellurite 20% (Réf. 1.03785) (milieu solide pour dénombrement)	Merck, "Germany"
<i>Bacillus cereus</i>	Agar au Mannitol au chlorure de sodium et au rouge de phénol (Réf. 1.05404)	Merck, "Germany"
<i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Bacillus cereus</i>	Bouillon cœur cerveau (Réf. 5 100.9) (milieu d'enrichissement)	Bio-merieux, "France"
	Milieu de Ringer (Réf. 1.155.25.01) (Milieu de dilution)	Merck, "Germany"

IV.2.2- Les conditions de croissance

IV.2.2.1- Les bifidobactéries

L'oxygène n'est pas toléré par la plupart des bifidobactéries, car il provoque la formation de composés oxygénés toxiques comme le peroxyde d'hydrogène, l'ion superoxyde ou les radicaux hydroxylés. Cette intolérance à l'oxygène est due à l'absence des deux enzymes la superoxyde dismutase et la catalase chez ces bactéries qui sont anaérobies strictes.

Les milieux exempts d'oxygène ou additionnés de substances sulfito-réductrices comme la cystéine chlorhydrique Cys-Hcl à 0.05% sont nécessaires pour la culture des bifidobactéries (Scardovi, 1986). Dans cette étude, Les conditions d'anaérobiose sont assurées par l'utilisation de jarres d'anaérobiose sans catalyseur (le système Anaerocult A, Merck, France) pour l'incubation.

IV.2.2.2- Les bactéries pathogènes

Bacillus cereus et *Staphylococcus aureus* sont des bactéries anaérobies facultatives à Gram +. L'incubation se fait à 37°C en aérobie sur milieu solide ou liquide.

IV.3. Préparation des surnageants

La préparation des surnageants s'effectue par la mise en culture des souches bifides qui seront par la suite centrifugées à 7000 tours/min à 4°C pendant 20min. On sépare le culot de la suspension dans des conditions stériles.

Cette suspension est ensuite filtrée sous vide (filtre millipore de 0.45 µm de diamètre) dans des conditions stériles.

En dernière étape, on effectue une concentration par lyophilisation de quantités bien précises de surnageant filtré. Ce lyophilisat est additionné de PBS stérile (phosphate-buffer-saline) à raison du 1/10^{ème} de la quantité initiale de ce surnageant.

IV.4. Mise en évidence de l'activité antagoniste des bifidobactéries

IV.4.1. Méthode du contact cellulaire

IV.4.1.1. Sur bouillon

Elle consiste à cultiver les souches bifides en même temps que les souches pathogènes (*Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*) avec la mise en route d'un témoin ne contenant que la souche pathogène additionné de MRS-C. L'incubation se

fait à 37°C à différents temps T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 et T7 correspondant respectivement à : 0h, 2h, 4h, 6h, 12h, 24h, 36h et 48h.

Les bifidobactéries sont cultivées sur bouillon MRC-C pendant 24h aux conditions d'anaérobiose et les pathogènes dans le bouillon cœur- cervelle , pendant 3 heures en aérobiose. Après le comptage et l'ajustement du nombre de souches expérimentales (pour avoir un nombre total au contact de 1.10^8 pour les cellules bifides et 5.10^7 pour les cellules pathogènes avec un rapport de 2 cellules bifides/1 cellule pathogène), les deux cultures sont mises en contact à raison de 200 µl chacune pour être incubées en anaérobiose à 37°C.

A chacun des temps précités, on prélève les cultures correspondantes et on effectue des dilutions décimales de -3 et -4 et on étale 100µl de chacune d'elles sur une boîte de milieu spécifique (Agar au Mannitol au chlorure de sodium et au rouge de phénol pour *Bacillus cereus* et Baird Parker agar additionné à une émulsion de jaune d'œuf tellurite 20% pour *Staphylococcus aureus*). L'incubation se fait en aérobiose à 37°C pendant 24h (Cocconier *et al.*, 1998). Ensuite, on effectue un comptage des colonies obtenues.

IV.4.1.1. Sur Gélose

La méthode de contact cellulaire sur gélose décrite par Fleming *et al.*, 1975 consiste à mettre des points de souches de bifidobactérie sur MRS-C gélosé et de les cultiver 24h en anaérobiose à 37°C. Après, on coule 10ml de milieu gélosé additionné avec les différentes souches pathogènes ajusté à 5×10^7 ufc/ml et on mesure les halos clairs d'inhibition.

IV.4.2. Méthode de contact des surnageants (Fleming *et al.*, 1975)

Le contact des surnageants a été réalisé à deux températures différentes : 37 et 6°C pendant des intervalles de temps allant de 0h à 48h. Après avoir cultivé les pathogènes dans du bouillon cœur- cervelle , pendant 3 heures en aérobiose et après le comptage et l'ajustement du nombre des souches expérimentales, les deux cultures de pathogènes (*S. aureus* et *B. cereus*) sont mises en contact avec les surnageants concentrés des souches bifides préalablement préparés en plus du témoin, qui ne contient que la souche pathogène additionnée de MRS-C également concentré au 1/10ème, à raison de 200µl (avec 5.10^7 de cellules pathogènes /ml) chacune pour être incubées en aérobiose à 37°C ou 6°C à des intervalles de temps T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 et T7 correspondant respectivement à : 0h, 2h, 4h, 6h, 12h, 24h, 36h et 48h.

A chacun des temps précités, on prélève les cultures de pathogènes correspondantes et on effectue des dilutions décimales de 10^{-3} et 10^{-4} et on étale 100µl de chacune d'elles sur une boîte de milieu spécifique (Agar au Mannitol au chlorure de sodium et au rouge de phénol pour *Bacillus cereus* et Baird Parker agar additionnée à une émulsion de jaune d'œuf tellurite 20% pour *Staphylococcus aureus*). L'incubation se fait en aérobie à 37°C pendant 24h (Cocconier *et al.*, 1998). Ensuite on effectue un comptage des colonies obtenues. Dans le cas de l'expérience à 6°C, nous avons effectué 7 prélèvements à des temps T1 (2h), T2 (4h), T3 (6h), T4 (12h), T5 (24h), T6 (36h), T7 (48h).

IV.4.3. Méthode de l'agar spot

Selon le protocole décrit par Fleming *et al.* (1975), l'ensemencement des pathogènes (*Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*) est effectué en répartissant chaque souche sur son milieu de culture spécifique avec une concentration finale de 10^8 UFC/ml pour être ensuite coulée sur des boîtes de Pétri. 10µl de chaque surnageant des souches bifides Bbv1, Bbv2, BLE et BLR, en plus du MRS-C concentré, est déposée sur chaque culture sous forme de petit puits, l'incubation se fait en aérobie à 37°C pendant 24h et après on effectue la lecture des résultats par mesure du diamètre des zones d'inhibition.

IV.4.4. Contact des surnageants traités par les solvants organiques

L'influence de solvants dilués à 10% (V/V) (formaldéhyde, chloroforme, acétone, hexane, iso-butanol, méthanol, éther diéthylique) sur l'activité antagoniste des surnageants de bifidobactéries vis-à-vis des deux germes pathogènes a été testée selon la méthode décrite par Bhunia *et al.* (1988). Cela consiste à mélanger 10ml de surnageant de culture bifide à 100µl de chaque solvant et à laisser agir pendant 1 heure à 25°C. Après élimination du solvant par évaporation, le résidu contenant les substances antagonistes est testé pour son activité antimicrobienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* par la méthode de l'agar spot précédemment décrite.

IV.4.5. Dosage des acides lactique et acétique par HPLC.

L'HPLC des acides lactique et acétique a été réalisée suivant le protocole décrit par Dubey & Mistry (1996).

L'appareil HPLC est de marque water 2487 (Water associates, Inc., Milford, MA,

USA) avec une pompe Water 1525 et une colonne RP18 (250mm de longueur, 4.6mm de largeur et un diamètre de porosité du gel de 5 µm)

100µl d'acide nitrique HNO₃ de normalité de 15.8N et 14.9 ml d'acide sulfurique H₂SO₄ de normalité de 0.009N sont additionnés à 1.5ml de surnageant de chaque souche bifide (préalablement centrifugé à 5000 tours/min pendant 10min et filtré avec des filtres millipores de 0.22µm) pour constituer l'échantillon à injecter. La solution standard est préparé avec de l'acide lactique et acétique à 0.1 mole/l.

La phase mobile (H₂SO₄ 0.01N filtré à 0.22µm) est utilisée avec une pression de 0.6ml/min.

20 µl de l'échantillon préparé sont injectés au système pour une détection optimisé à une longueur d'onde de 220nm. Chaque échantillon est analysé en double.

IV.4.6. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats (ANOVA) a été réalisée par un logiciel statistique (Statbox V. 6.40 copyright Grimmer logiciels 1997-2002 Paris) après trois répétitions de chaque paramètre. La comparaison des moyennes est évaluée lorsque $P < 0.05$.

Chapitre V

Résultats et Discussion

CHAPITRE V. RESULTATS ET DISCUSSION.

V.1. Antagonisme des bifidobactéries vis-à-vis de *S. aureus*.

V.1.1. Mise en évidence rapide de l'antagonisme de bifidobactéries vis-à-vis de *S. aureus* en milieu solide.

Les résultats de la mise en évidence rapide (Méthode de Fleming et al., 1975) de l'antagonisme des souches de bifidobactéries vis-à-vis de *S. aureus* après 24h de coculture à 37°C sont illustrés par les figures 8 et 9 où l'on constate que les diamètres des zones d'inhibition atteints sont, respectivement, de 8.33 ± 0.58 mm pour la souche bifide Bbv1 et d'environ 9.00 ± 1.00 mm pour les souches bifides Bbv2, BLE et BLR. Cette interaction positive entre le pathogène et les bifidobactéries démontre que ces dernières recèlent un potentiel antagoniste à explorer et à confirmer par des mesures plus précises.

Topisirovic et al., (2006) ont étudié l'effet antagoniste de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGSM1-19 qui exerce une inhibition se manifestant par des halos clairs supérieurs à 2 mm pour *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ; alors qu'aucun effet inhibiteur n'est observé sur *Staphylococcus aureus* MR427. Par contre, d'autres souches expérimentales de bactéries lactiques présentent des effets antagonistes qui apparaissent sous forme de halos clairs supérieurs à 4 mm contre ces mêmes souches de *Staphylococcus aureus* (ATCC25923 et MR427).

Par ailleurs, De Kwaadstenist et al. (2005) ont trouvé que la souche *Enterococcus mundtii* ST15, testée par la méthode d'agar spot, exerce un effet inhibiteur par des zones d'inhibition supérieures à 6 mm.

V.1.2. Cinétique d'inhibition de *S. aureus* en coculture à 37°C avec les différentes souches de bifidobactéries.

Après deux heures de coculture des différentes souches bifides avec *Staphylococcus aureus* 49444, elles exercent une légère action inhibitrice (perte de cellules pathogènes variable de 0.17 et 0.22 log UFC/ml), mais avec des différences significatives ($P < 0.05$) qui donnent statistiquement trois groupes (le premier groupe est celui du témoin, le deuxième comporte les souches Bbv1 et Bbv2 et le troisième est composé de BLE et BLR) (Fig. 10).

Ceci nous fait remarquer qu'au début du contact, les souches *B. longum* exercent une inhibition de *S. aureus* plus importante que *B. breve*.

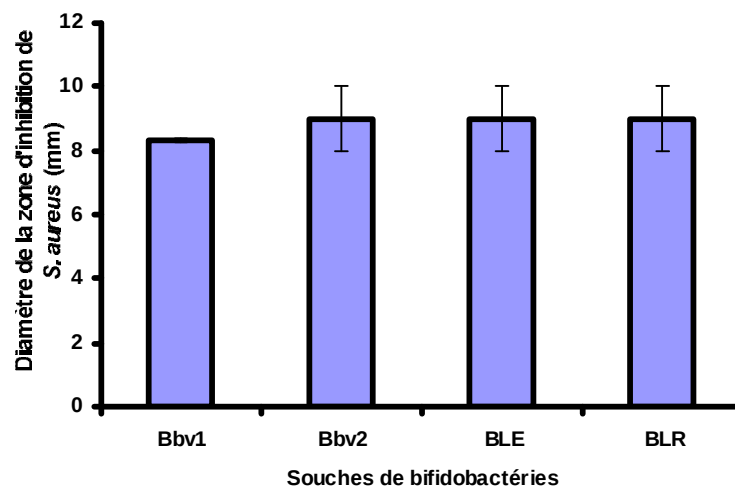


Figure 8 : Diamètres des zones d'inhibition de *S. aureus* (en mm) confronté aux différentes souches de bifidobactéries après 24h de coculture sur milieu solide à 37°C (technique de [Fleming et al., 1975](#)).

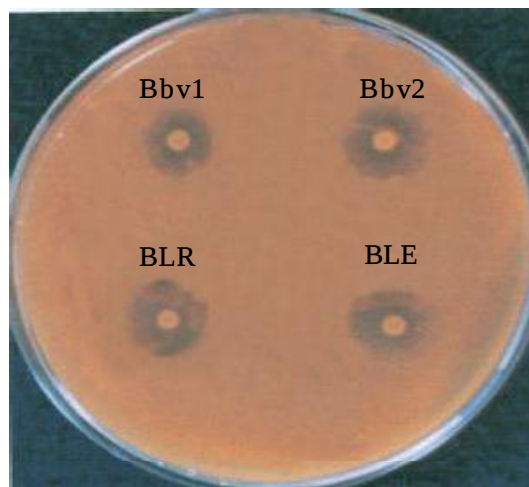


Figure 9 : Zones d'inhibition (halots clairs) de *S. aureus* confronté aux différentes souches de bifidobactéries après 24h de coculture sur milieu solide à 37°C (technique de [Fleming et al., 1975](#)).

Lorsque le contact cellulaire entre pathogène (*S. aureus*) et souches bifides est prolongé à 4h (Fig. 11), la viabilité de *S. aureus* s'altère davantage étant donné que son taux d'inhibition est multiplié par les facteurs de 6.08 ; 5.95 ; 5.24 et 5.04 respectivement avec Bbv1, Bbv2, BLE et BLR (Tableau 19).

Tableau 19: Cinétique d'inhibition de la viabilité de *S. aureus* (en % de cellules inhibées) cocultivé à 37°C avec les différentes souches de bifidobactéries.

Souches bifides	Temps de coculture				
	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h
Bbv1	2.29	13.94	20.19	60.51	100
Bbv2	2.53	15.07	20.92	62.17	100
BLE	3.03	15.89	23.09	58.15	100
BLR	2.89	14.59	24.98	62.95	100

L'inhibition continue de s'accroître après 6 heures de contact cellulaire pour atteindre un nombre de cellules pathogènes inhibées supérieur à 1.55 log UFC/ml avec un pic enregistré avec la souche BLR (soit 1.92 log UFC/ml) (Fig. 12). A ce moment de la coculture, presque 25% des cellules pathogènes sont inhibées pendant que la croissance de celle du témoin (*S. aureus* en absence de souches bifides) progresse de 2.22 log UFC/ml.

Après 12 heures de contact, l'inhibition est importante car elle dépasse largement la moitié du taux initial de cellules *Staphylococcus aureus* 49444 mises à proximité des cellules bifides (Fig. 13), avec des pertes enregistrées de l'ordre de 4.66, 4.79, 4.48 et 4.85 log UFC/ml, respectivement, pour Bbv1, Bbv2, BLE et BLR.

L'inhibition totale a été enregistrée après 24 heures de contact entre le germe pathogène et la souche bifide dans un rapport cellulaire égal à 2 (Fig. 14). La même cinétique d'inhibition a été observée pour les 4 différentes souches de bifidobactéries.

La vitesse globale d'inhibition de *S. aureus* par les différentes souches bifides calculée dans un intervalle de 22h de contact cellulaire (entre $t_1 = 2h$ et $t_2 = 24h$) est respectivement de 4.44, 4.43, 4.40 et 4.41h⁻¹ pour Bbv1, Bbv2, BLE et BLR. Le nombre de cellules de la culture témoin de *S. aureus* atteint 9.82 log UFC/ml après 24h.

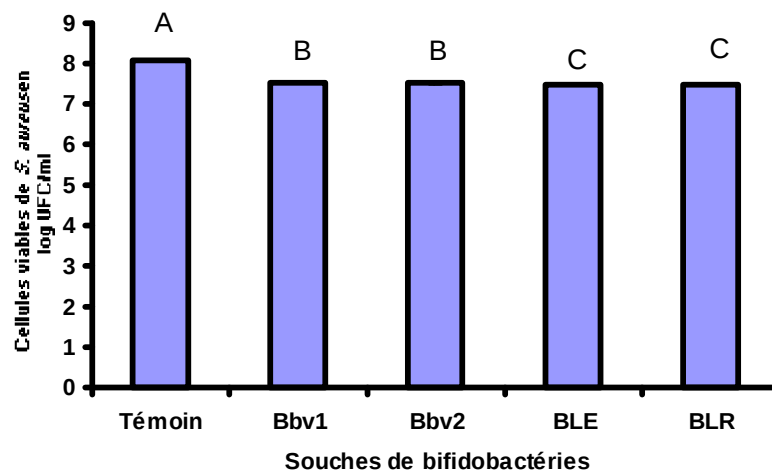


Figure 10 : Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 2h de coculture à 37°C avec un rapport cellulaire bifidobactéries /*S. aureus* de 2/1.
Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de souches bifides.

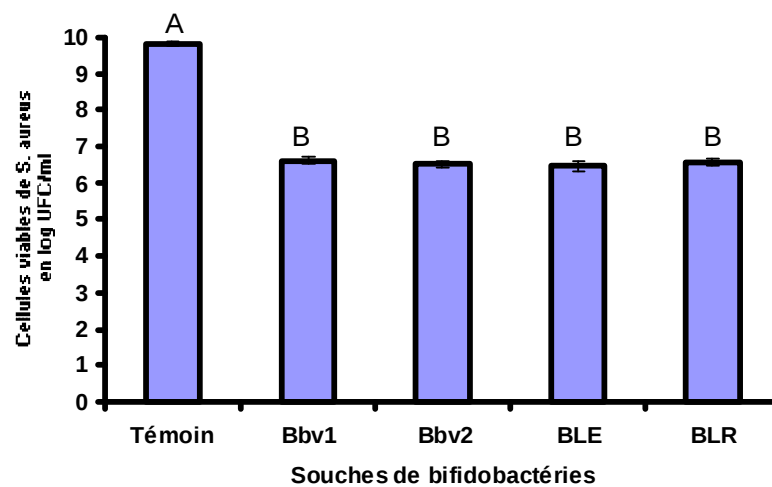


Figure 11 : Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 4h de coculture à 37°C dans un rapport cellulaire bifidobactéries / *S. aureus* de 2/1.
Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de souches bifides.
A, B, C : indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

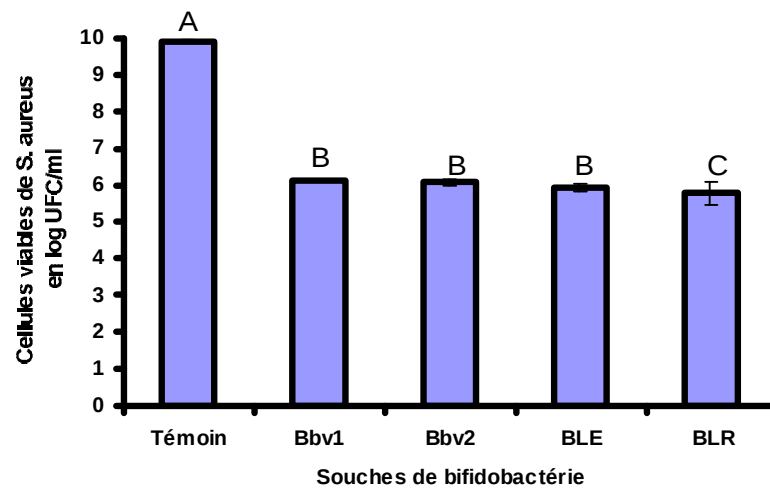


Figure 12: Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 6h de coculture à 37°C avec un rapport cellulaire bifidobactéries/*S. aureus* de 2/1.

Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de souches bifides.

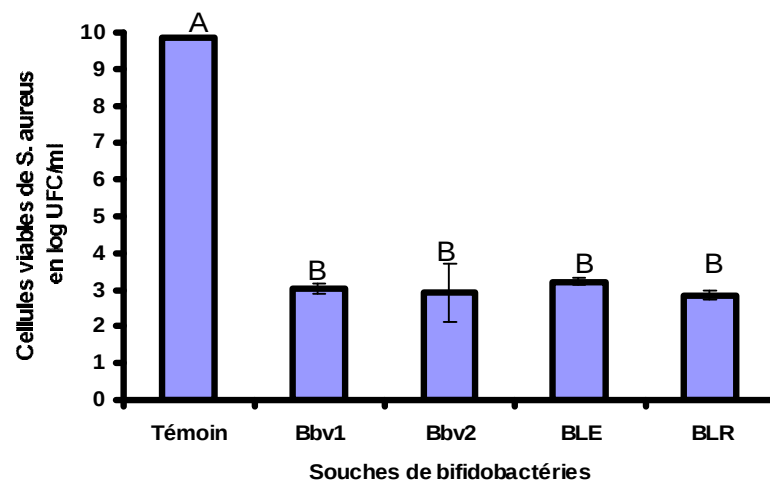


Figure 13: Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 12h de coculture à 37°C avec un rapport cellulaire bifidobactéries/*S. aureus* de 2/1.

Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de souches bifides.

A, B, C : indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Liévin et al., (2000) qui avaient enregistré un taux de 2.9 log UFC/ml après une heure et plus de 5.4 log UFC/ml après trois heures de coculture de *S. aureus* avec deux souches de bifidobactérie (CA1 et F9).

Dans une autre étude menée par Laukova et al., (1999), l'effet inhibiteur de l'entérocline CCM4231 sur *S. aureus* SA1 dans du lait écrémé, a été explorée. Ils avaient constaté qu'une culture de 4 heures de *S. aureus* SA1 suivie par un traitement par l'entérocline CCM4231 se traduisaient par un taux d'inhibition supérieur à 5 log UFC/ml par rapport au témoin (sans l'entérocline CCM4231) qui, par contre, enregistre une croissance pour dépasser 10 log UFC/ml.

Par ailleurs, le traitement par l'entérocline au moment de l'ensemencement provoque une inhibition totale après une heure de coculture. Ceci met en relief l'importance de la vitesse de production des substances inhibitrices dans la survenue de l'inhibition vis-à-vis des souches pathogènes.

V.1.3. Relation entre viabilité de *S. aureus* et durée de sa coculture avec les souches de bifidobactéries à 37°C.

La cinétique d'inhibition des cellules de *S. aureus* par les différentes souches de bifidobactéries est illustrée par la Fig. 15. La vitesse d'inhibition de *S. aureus* devrait, en principe, être liée, d'une part à celle de la production de substances antagonistes (protéiques et non protéiques) par les souches probiotiques, et d'autre part, à la résistance du germe pathogène vis-à-vis de ces substances.

Dans la présente expérimentation, cette vitesse d'inhibition varie en fonction de l'intervalle de temps de coculture des germes antagonistes considérés. Par exemple, la souche bifide Bbv1 inhibe *S. aureus* à des vitesses respectives de 1.14, 5.82, 3.12, 6.72 et 3.29 h⁻¹ pendant les périodes respectives 0 - 2h, 2 - 4h, 4 - 6h, 6 - 12h et 12 - 24h.

Des vitesses d'inhibition différentes selon la durée et le moment du contact cellulaire entre les 2 types de germes sont également observées (Tableau 20).

Nos résultats vont dans le même sens que ceux rapportés par Voravuthikunchai et al. (2006) qui avaient mis en évidence l'activité antagoniste de *Lactobacillus reuteri* L22 contre *S. aureus* dont l'inhibition, plus accentuée après la 18^{ème} heure de coculture, fut totale après 24h de contact.

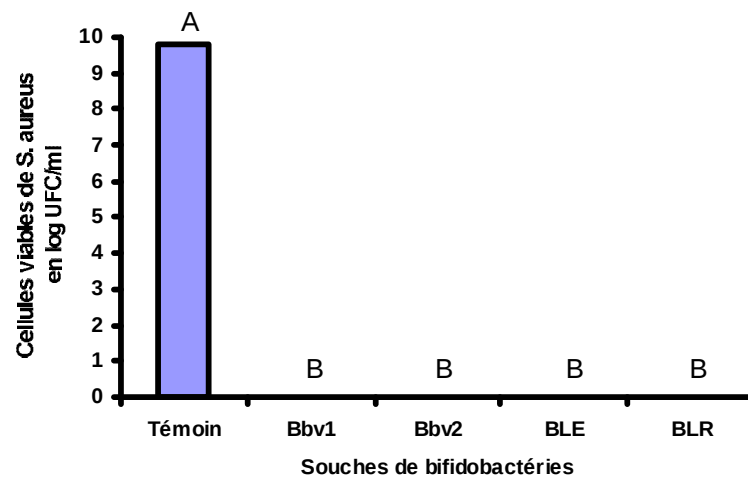


Figure 14: Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 24h de coculture à 37°C avec un rapport cellulaire bifidobactéries / *S. aureus* de 2/1.
Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de souches bifides.
A, B : indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

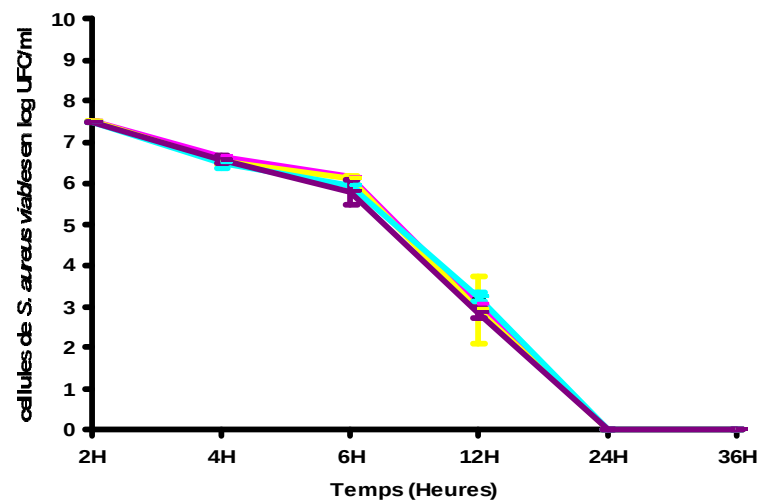


Figure 15: Cinétique d'inhibition des cellules de *S. aureus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries durant 36h de coculture .

- Bbv1 : - Cinétique d'inhibition de *S. aureus* en coculture avec la souche bifide Bbv1
- Bbv2 : - Cinétique d'inhibition de *S. aureus* en coculture avec la souche bifide Bbv2.
- BLE : - Cinétique d'inhibition de *S. aureus* en coculture avec la souche bifide BLE.
- BLR : - Cinétique d'inhibition de *S. aureus* en coculture avec la souche bifide BLR.

Tableau 20: Vitesse d'inhibition (=VI) de la viabilité de *Staphylococcus aureus* 49444 en coculture avec les différentes souches de bifidobactéries à 37°C. (VI est exprimée en % cellules inhibées/h).

Intervalle de coculture	Vitesse d'inhibition de <i>S. aureus</i> (h ⁻¹)			
	Bbv1	Bbv2	BLE	BLR
0-2h	1.14	1.26	1.51	1.44
2h-4h	5.82	6.27	6.43	5.85
4h-6h	3.12	2.92	3.60	5.19
6h-12h	6.72	6.00	5.84	6.32
12h-24h	3.29	3.15	3.48	3.08

V.1.4. Cinétique d'inhibition de la viabilité de *S. aureus* cultivé à 37°C en présence des surnageants concentrés de cultures des différentes souches de bifidobactéries.

L'action inhibitrice des surnageants de culture des différentes souches de bifidobactéries sur la viabilité de *S. aureus* 49444 s'est avérée plus forte et plus rapide que celle observée lors de la coculture de ces deux types de bactéries.

En effet, dès les deux premières heures de contact à 37°C avec les surnageants bifides, la viabilité de *S. aureus* diminue de 0.43 à 0.53 log UFC/ml selon la souche probiotique considérée. Pendant ce temps, la culture témoin de *S. aureus* (en absence de surnageants bifides) affiche une augmentation du nombre de cellules équivalente à 0.62 log UFC/ml (Fig. 16). La cinétique de cette inhibition de *S. aureus* par les surnageants de cultures bifides indique une augmentation nette et régulière du nombre de cellules inhibées (Tableau 21).

Après 4h de culture en présence des surnageants, le nombre de cellules pathogènes diminue, respectivement, de 1.34, 1.38, 1.55 et 1.49 log UFC/ml avec les souches Bbv1, Bbv2, BLE et BLR. En parallèle, le témoin (culture de *S. aureus* en absence de surnageants bifides) enregistre un gain de croissance de 2.07 log UFC/ml (Fig. 17).

Au bout de 6 heures de contact à 37°C entre surnageants concentrés de souches bifides et *S. aureus* 49444, trois groupes statistiques ($P < 0.05$) apparaissent (Fig. 18).

Un premier, représenté par le témoin et qui montre une augmentation sensible de

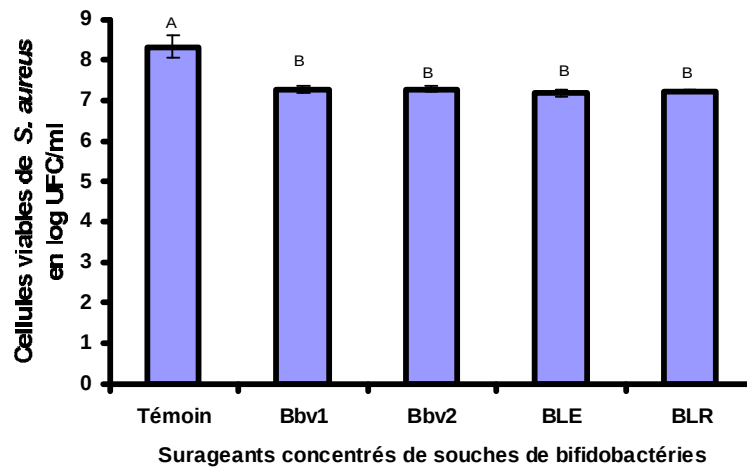


Figure 16: Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 2h de contact à la température de 37 °C.
Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

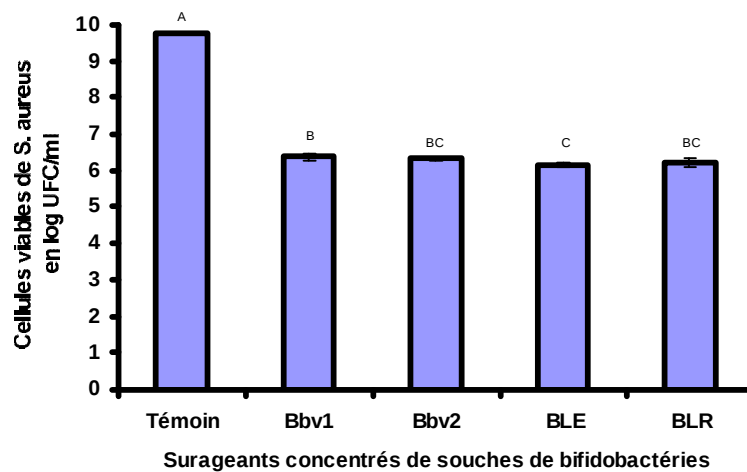


Figure 17: Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 4h de contact à la température de 37 °C.
Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.
A, B, C: indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

la croissance du pathogène cultivé seul, un deuxième groupe qui englobe les souches de *B. breve* (Bbv1 et Bbv2) ayant induit respectivement 2.08 et 2.18 log UFC/ml de perte de biomasse du pathogène et le troisième groupe des souches *B. longum* enregistrant la perte la plus élevée de la viabilité de *S. aureus* (2.46 et 2.5 log UFC/ml de cellules perdues avec BLE et BLR, respectivement).

Tableau 21 : Cinétique d'inhibition de la viabilité de *S. aureus* (exprimée en % de cellules inhibées) cultivé à 37°C en présence des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries.

Souches bifides	Temps de contact des surnageants bifides avec le pathogène				
	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h
Bbv1	5.64	17.38	27.09	80.08	100
Bbv2	5.62	17.99	28.26	80.62	100
BLE	6.94	20.08	31.96	100	100
BLR	6.44	19.33	33.33	100	100

Plusieurs auteurs ont attribué l'effet inhibiteur des bifidobactéries à la production d'acides lactique et acétique (Noriega et al., 2003 ; Makras & De Vust, 2006) ; par contre, d'autres auteurs préconisent la présence d'autres substances antagonistes qui interviennent dans l'inhibition des pathogènes (Lievin et al., 2000 ; Servin, 2004), même si Yildirim (1998) n'as pas trouvé d'effet de la production de la bactériocine « bifidocine b » produite par *B. bifidum* sur *S. aureus* ATCC 25923.

Si plus de 80% des cellules de *S. aureus* sont inhibées à 37°C par les surnageants de *B. breve* (Bbv1 et Bbv2) à la 12^{ème} heure de culture ; pas moins de 100% le sont avec les souches *B. longum* (BLE et BLR) qui s'avèrent très efficaces (Fig. 19).

Jusqu'à cette 12^{ème} heure de culture de *S. aureus* en présence des surnageants bifides, la cinétique d'inhibition de ce germe pathogène diffère de celle observée dans le cas de sa coculture avec les différentes souches de bifidobactéries (contact cellulaire).

Ceci est d'autant plus vrai lorsqu'on constate que la vitesse d'inhibition de *S. aureus* pendant les périodes 0-2h, 2-4h, 4-6h et 6-12h a été respectivement de 2.87, 5.87, 4.85, 8.83 h⁻¹ pour Bbv1 ; de 2.81, 6.18, 5.13 et 8.72 h⁻¹ pour Bbv2 ; de 3.47, 6.57, 5.94 et 11.34 pour BLE ; et de 3.22, 6.44, 7.00 et 11.27 h⁻¹ pour BLR.

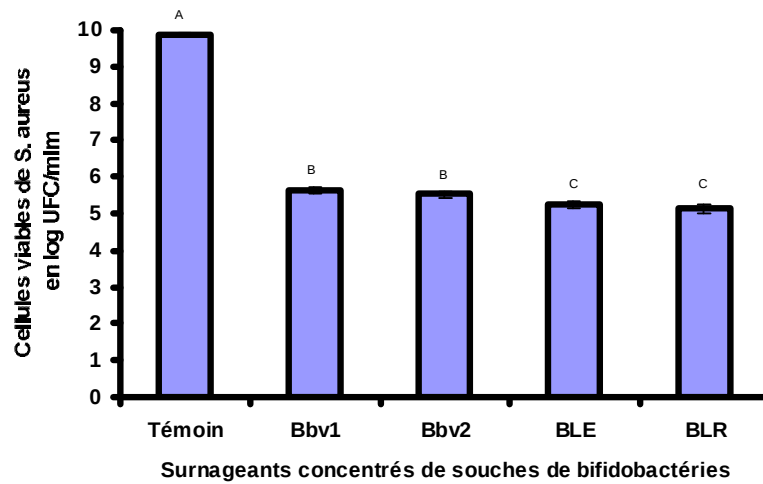


Fig. 18: Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 6h de contact à la température de 37 °C.
Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

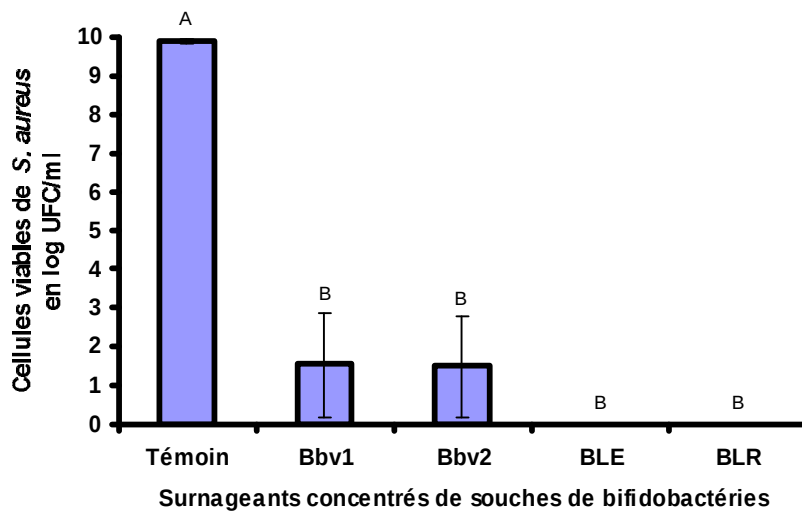


Fig. 19: Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 12h de contact à la température de 37 °C.
Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

A, B, C : indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

C'est au bout de 24h de culture de *S. aureus* en présence des surnageants des souches bifides Bbv1 et Bbv2 que l'inhibition du pathogène fut totale (Fig. 20).

La vitesse d'inhibition de *S. aureus* par les surnageants des souches bifides Bbv1 et Bbv2 pendant cette période 12h-24 h a été respectivement de 1.66 et 1.61 h⁻¹ (Tableau 22).

Tableau 22: Vitesse d'inhibition (VI) de la viabilité de *Staphylococcus aureus* 49444 soumis à l'antagonisme des surnageants concentrés de différentes souches de bifidobactéries à 37°C.
(VI est exprimée en % de cellules inhibées /h).

Intervalle de contact avec les surnageants	Vitesse d'inhibition de <i>S. aureus</i> (h ⁻¹)			
	Bbv1	Bbv2	BLE	BLR
0-2h	2.87	2.81	3.47	3.22
2h-4h	5.87	6.18	6.57	6.44
4h-6h	4.85	5.13	5.94	7.00
6h-12h	8.83	8.72	11.34	11.27
12h-24h	1.66	1.61	-	-

V.1.5. Relation entre viabilité de *S. aureus* et durée de son contact avec les surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 37°C.

Comparé à l'effet inhibiteur exercé par les cellules de bifidobactéries sur la viabilité de *S. aureus*, à 37°C leurs surnageants concentrés exercent un effet plus important qui se traduit, après 12h de contact, par une inhibition totale du germe pathogène par BLE et BLR et 80% par Bbv1 et Bbv2 qui finissent par annuler sa viabilité au point 24h.

La sensibilité de *S. aureus* à 37°C aux surnageants concentrés des souches bifides BLE et BLR apparaît plus forte dès les 2 premières heures de contact. La figure 21 montre que l'inhibition passe par deux phases importantes, avant et après 6 heures dont le taux d'inhibition s'accroît après 6 heures de contact. L'inhibition maximale est acquise entre la 6^{ème} et la 12^{ème} h de contact.

Gibson et Wang (1994) rapportent que l'activité antagoniste de plusieurs espèces

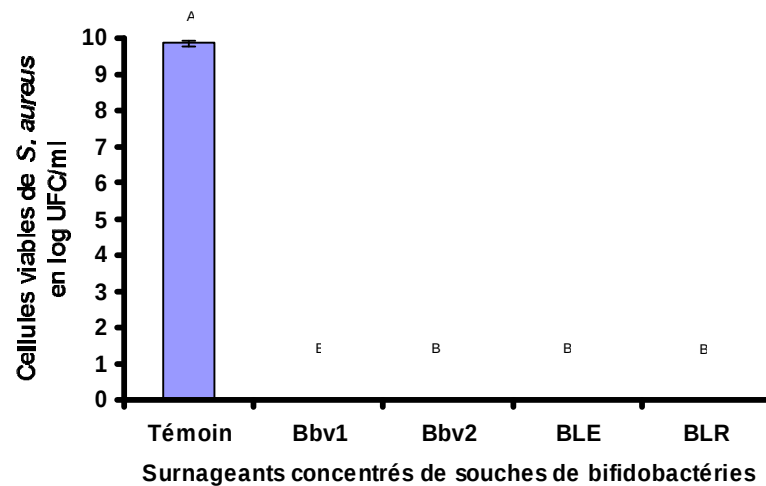


Figure 20 : Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 24 h de contact à la température de 37 °C.

Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

A, B: indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

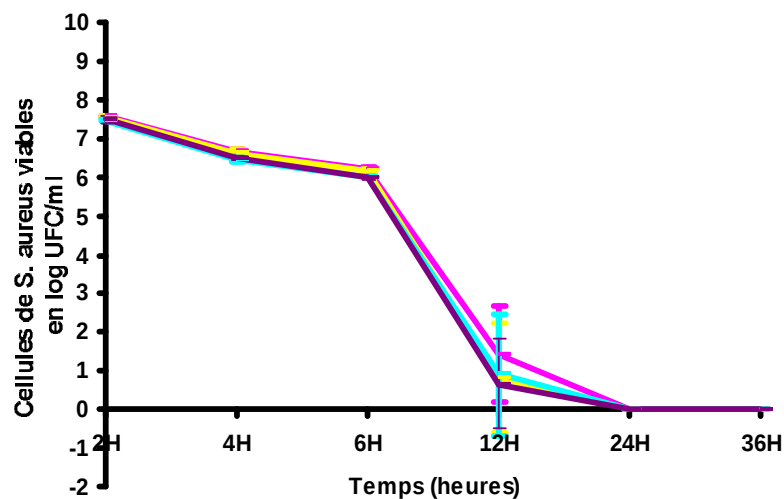


Figure 21 : Cinétique d'inhibition des cellules de *S. aureus* (log UFC/ ml) soumises à antagonisme des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries durant 36h de contact à 37°C.

- Bbv1 : - Cinétique d'inhibition de *S. aureus* par le surnageant concentré de la souche bifide Bbv1.
- Bbv2 : - Cinétique d'inhibition de *S. aureus* par le surnageant concentré de la souche bifide Bbv2.
- BLE : - Cinétique d'inhibition de *S. aureus* par le surnageant concentré de la souche bifide BLE.
- BLR : - Cinétique d'inhibition de *S. aureus* par le surnageant concentré de la souche bifide BLR.

de bifidobactéries (principalement *B. infantis* et *B. longum*) envers les pathogènes à Gram positive et Gram négative est liée plutôt à la production d'acides qu'aux autres substances antimicrobiennes.

La diminution rapide du pH à des valeurs inférieures à 5.3 laisserait penser à un important effet inhibiteur des acides sur *Staphylococcus aureus* si le produit est fermenté à une température supérieure à 18°C (Lucke, 2000).

Par contre, Gagnon et al. (2004) ont montré que l'addition du tampon bicarbonate à du MRS gélosé abritant des bifidobactéries provoquait la diminution de l'effet inhibiteur de ces germes vis-à-vis d'autres bactéries pathogènes, mais sans l'annuler complètement.

Ces auteurs avaient conclu que la production d'acides organiques n'était pas le seul facteur impliqué dans l'expression de l'activité antagoniste des bifidobactéries.

V.1.6. Cinétique d'inhibition de la viabilité de *S. aureus* cultivé à 6°C en présence des surnageants concentrés de différentes souches de bifidobactéries.

La cinétique d'inhibition de la viabilité de *S. aureus* 49444 mis en culture à 6°C en présence des surnageants concentrés de souches bifides a été suivie pendant 48h (Tableau 23).

L'action inhibitrice des surnageants de bifidobactéries vis-à-vis de *S. aureus* est plus faible à 6°C qu'à 37°C.

En effet, à 37°C, cette action inhibitrice des surnageants était de plus de 2.4 fois supérieure à celle enregistrée à 6°C après 12h de contact avec le germe pathogène. Cet effet température est plus perceptible pendant les 2 premières heures de culture (Tableau 24).

Il semblerait que l'action inhibitrice des surnageants au cours des 2 premières heures de culture de *S. aureus* avait du mal à s'exprimer à 6°C étant donné les faibles taux d'inhibition enregistrés pour les 4 souches antagonistes (Bbv1, Bbv2, BLE et BLR) (Fig. 22). Cette inhibition ne dépassait pas 0.15 log UFC/ml.

Cette latence dans l'expression de l'antagonisme des surnageants bifides est quelque peu atténuée après 4h de contact avec les cellules pathogènes dont 0.96 log UFC/ml n'ont pas survécu (Fig. 23).

Tableau 23: Cinétique d'inhibition de la **viabilité** de *S. aureus* (exprimé en % de cellules inhibées) cultivée en présence des **surageants concentrés** des différentes souches de bifidobactéries à **6°C**.

Différentes souches bifides	Temps de contact des surageants bifides avec les cellules de <i>S. aureus</i>						
	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h
Bbv1	1.42	11.14	19.39	29.81	50.93	62.32	63.09
Bbv2	1.55	10.77	20.07	28.54	48.95	61.25	62.96
BLE	1.49	12.49	21.87	34.94	50.73	61.28	61.85
BLR	2.01	11.75	23.69	41.30	53.24	63.87	62.15

Tableau 24: Rapports entre pourcentages d'inhibition à **37°C** et à **6°C** de la **viabilité** de *S. aureus* cultivé en présence de surageants concentrés de bifidobactéries.

Souches bifides	Temps de culture de <i>S. aureus</i> en présence des surageants				
	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h
Bbv1	3.97	1.56	2.02	2.68	1.96
Bbv2	3.40	1.67	1.36	2.82	2.04
BLE	4.65	1.60	1.46	2.86	1.97
BLR	3.20	1.64	1.40	2.42	1.87

Cette levée de latence est palpable lorsque l'on constate, par exemple, que dans le cas de la souche BLE, l'inhibition exercée par son surageant à 37°C représente 4.65 fois celle à 6°C au point 2h et seulement 1.60 fois au point 4h (Tableau 24).

Les taux d'inhibition de la viabilité de *S. aureus* 49444 obtenus après 6h de contact avec les surageants bifides à 6°C sont comparables à ceux enregistrés à 37°C mais après 4h de contact seulement (Fig. 24). La même remarque peut être formulée après la 12^{ème} heure de culture (Fig. 25). Cette latence se propage, telle une onde, tout au cours de la culture de *S. aureus* en présence des surageants bifides.

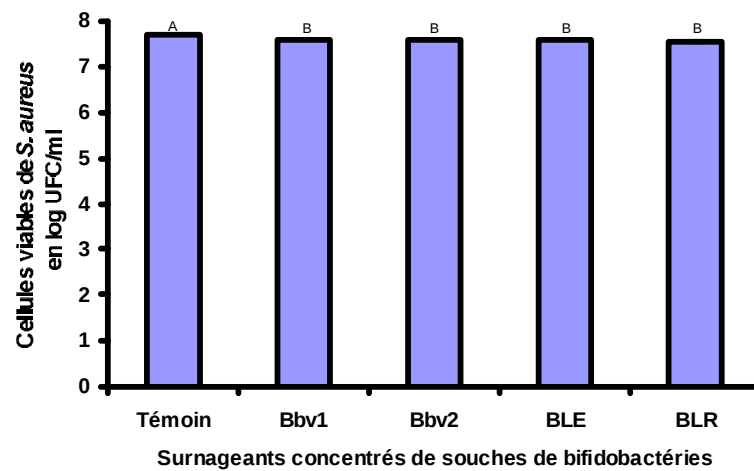


Figure 22: Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 2h de contact à la température de 6 °C.
Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

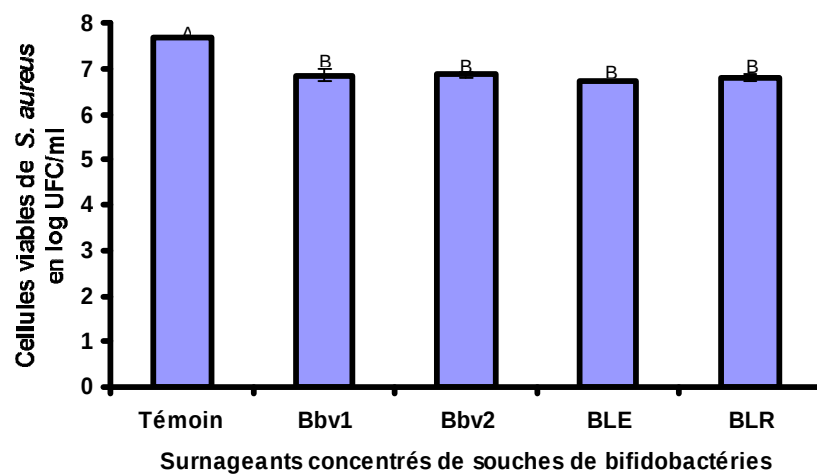


Figure 23: Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 4h de contact à la température de 6 °C.
Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.
A, B: indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

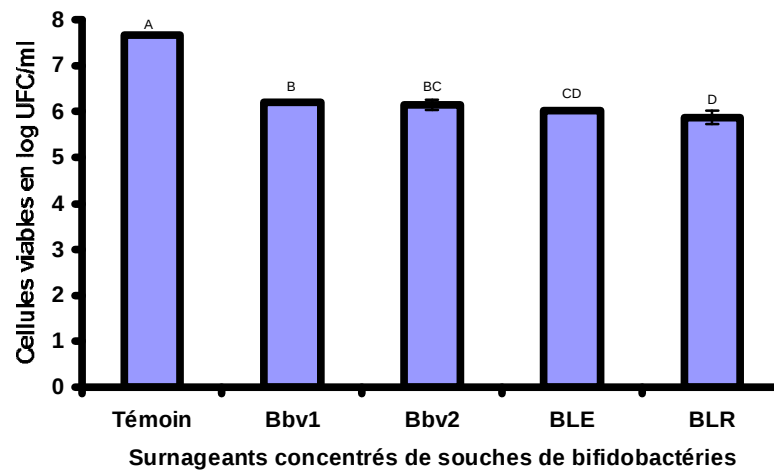


Fig. 24: Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 6h de contact à la température de 6°C.
Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de surnageants concentrés cultures bifides.

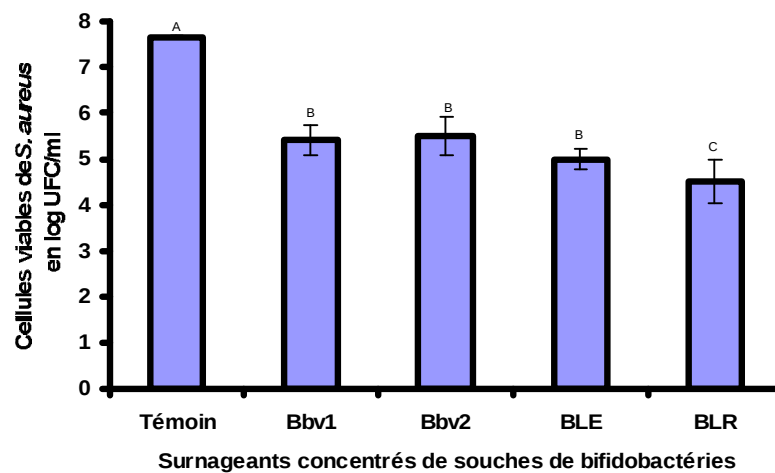


Fig. 25: Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 12h de contact à la température de 6°C.
Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

A, B, C, D : indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0,05$) homogènes

Les 100% d'inhibition de la viabilité de *S. aureus* observés avec toutes les souches bifides à 37°C après 24h de culture ne sont pas atteints à 6°C où ces taux oscillent autour de 50% (Fig. 26).

L'action inhibitrice des surnageants bifides à 6°C atteint son maximum après 36h de culture (Fig. 27) où la perte en cellules pathogènes a été, respectivement, de 4.80, 4.72, 4.76 et 4.80 log UFC/ml pour Bbv1, Bbv2, BLE et BLR.

L'extension du temps de contact des surnageants bifides avec *S. aureus* à 48h ne modifie pas les taux d'inhibition observés à 36h.

Dans une étude similaire, Millette et al. (2007) ont mis en évidence l'activité inhibitrice d'une bactériocine, la nisine, vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 29213 à la température de 4°C et avaient enregistré un taux d'inhibition de 50% après 7 jours de contact (soit une perte en cellules pathogènes de 2 log UFC/cm² de surface de steak de bœuf). Ces auteurs n'avaient pas pu observer une inhibition totale de ce germe à 4°C.

A la lumière de telles observations, il semblerait que la survie de *S. aureus* à basse température sur des milieux qui lui sont favorables constitue un problème pour la conservation et la chaîne de distribution des produits alimentaires vulnérables.

Le calcul des vitesses d'inhibition de *S. aureus* par les surnageants de bifidobactéries met également en relief cette latence d'action antagoniste provoquée par la basse température (6°C) et spécialement au cours des deux premières heures de contact où cette vitesse est inférieure ou égale à 1 h⁻¹, cette action inhibitrice s'accélère quelque peu entre la 2^{ème} et la 4^{ème} heure de contact pour s'atténuer considérablement après la 6^{ème} heure (Tableau 25).

Tableau 25 : Vitesse d'inhibition (VI) de la viabilité de *Staphylococcus aureus* 49444 soumis à l'antagonisme des surnageants concentrés de différentes souches de bifidobactéries à 6°C (VI est exprimé en % cellules inhibées/h).

Intervalles de coculture	Vitesse d'inhibition de <i>S. aureus</i> (h ⁻¹)			
	Bbv1	Bbv2	BLE	BLR
0h-2h	0.71	0.77	0.74	1
2h-4h	4.86	4.61	5.5	4.87
4h-6h	1.12	4.65	4.69	5.97
6h-12h	2.73	1.41	2.17	1.46
12h-24h	1.76	1.7	1.31	0.99
24h-36h	0.95	1.02	0.92	0.82
36h-48H	0.06	0.14	0.05	0.02

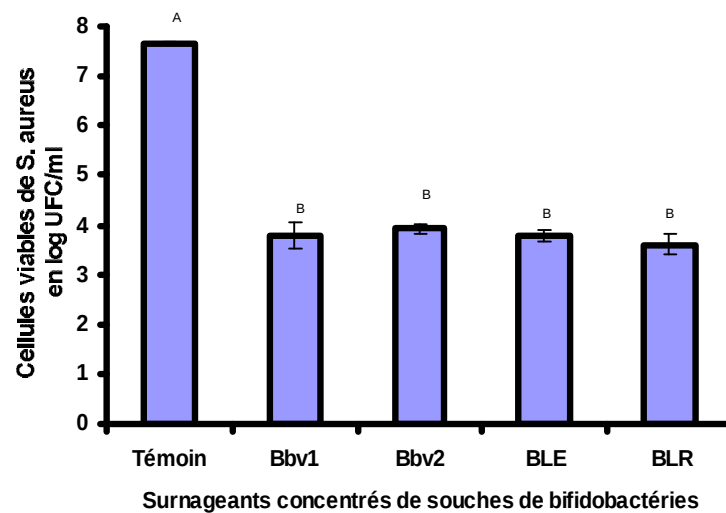


Figure 26 : Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 24h de contact à la température de 6 °C.

Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence surnageants concentrés de cultures bifides.

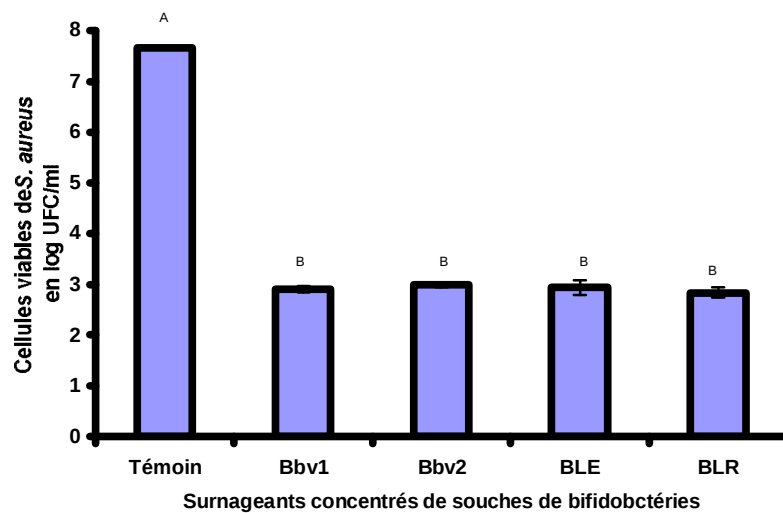


Figure 27 : Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 36h de contact à la température de 6 °C.

Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de surnageants concentrés cultures bifides.

A, B: indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

V.1.7. Relation entre viabilité de *S. aureus* et durée de son contact avec les surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 6°C.

Si à 37°C, les surnageants concentrés des cultures de bifidobactéries inhibaient totalement les cellules de *S. aureus* au bout de 24h de contact, il n'en est pas de même lorsque ce contact est réalisé à la température de 6°C. En effet, à basse température les surnageants bifides sont moins actifs étant donné qu'après 36h ou 48h de contact, le nombre de cellules pathogènes inhibées ne change pas (Fig. 28).

Par ailleurs, l'allure générale de cette action inhibitrice des surnageants à 6°C est différente de celle observée à 37°C où il y avait une diminution quasi exponentielle de la viabilité de *S. aureus* entre la 6^{ème} et la 12^{ème} heure de son contact avec les surnageants (Fig. 29).

Ainsi, il semblerait que l'antagonisme des surnageants concentrés de souches de bifidobactéries à 6°C est indépendant de la durée de contact avec *S. aureus* au-delà de 36h. Il aurait été intéressant de chercher à savoir si une culture de 24h de *S. aureus* en présence de surnageants bifides conduite à 6°C est transférée à 37°C pour y être poursuivie pendant 24 autres heures supplémentaires. Cette simple manipulation nous aurait permis de dire si la perte ou plutôt la diminution du pouvoir inhibiteur des surnageants bifides observée à 6°C pouvait être restituée à 37°C.

Dans un même sens, Garcia et al., (2003) ont constaté, en étudiant l'effet inhibiteur de l'enterocine EJ97 envers *Bacillus coagulans* CET12, que la température joue un rôle sur l'effet de cette bactériocine sur le pathogène car ils ont enregistré une inhibition totale après 4 heures avec la concentration de 3µg/ml de culture à la température de 37 et 15°C alors qu'à la température de 4°C, l'inhibition ne dépassait pas 35% même avec une concentration de l'entérocin EJ97 de 8µg/ml de culture.

V.1.8. Viabilité globale de *S. aureus* soumise à l'action des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries par la technique de l'Agar spot (Fleming et al., 1975).

Les surnageants concentrés de souches bifides exercent un effet inhibiteur vis-à-vis de *S. aureus* 49444 à 37°C qui se concrétise après 24 heures de contact sur le milieu solide par des halos clairs dont le diamètre est de 13.33 ± 2.08 , 13.33 ± 0.58 , 13 ± 1 et

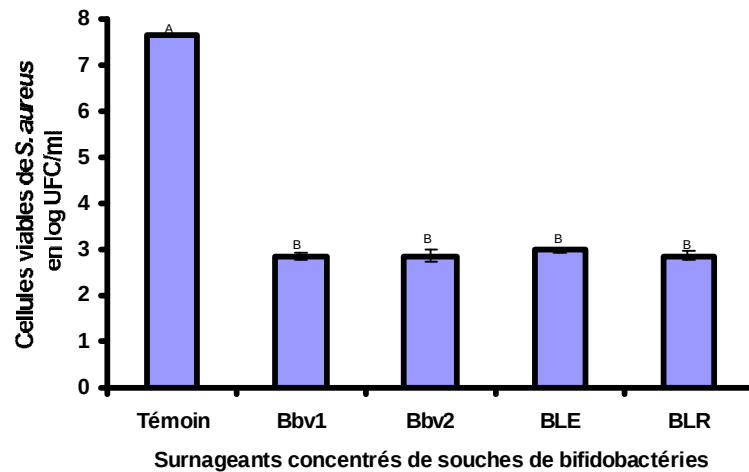


Figure 28: Viabilité des cellules de *S. aureus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 48h de contact à la température de 6 °C.

Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

A, B : indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

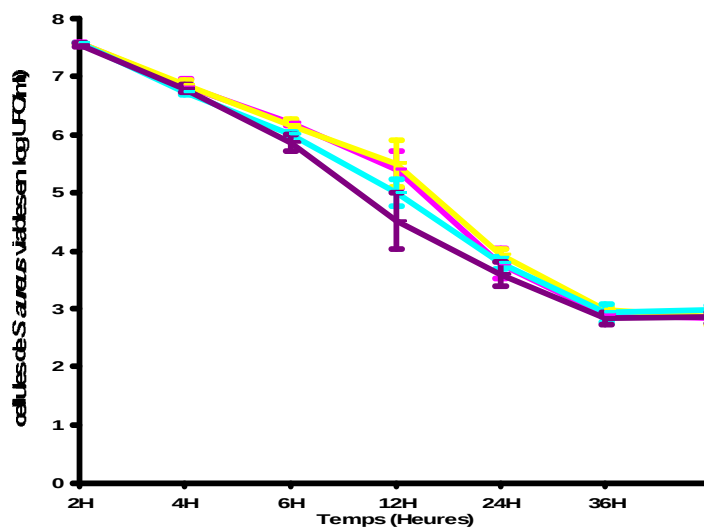


Figure 29: Cinétique d'inhibition des cellules de *S. aureus* (log UFC/ml) soumises à antagonisme des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries durant 36h d contact.

- Bbv1 : - Cinétique d'inhibition de *S. aureus* par le surnageant concentré de la souche bifide Bbv1.
- Bbv2 : - Cinétique d'inhibition de *S. aureus* par le surnageant concentré de la souche bifide Bbv2.
- BLE : - Cinétique d'inhibition de *S. aureus* par le surnageant concentré de la souche bifide BLE.
- BLR : - Cinétique d'inhibition de *S. aureus* par le surnageant concentré de la souche bifide BLR.

14.67 $\pm$ 2.08 mm respectivement pour Bbv1, Bbv2, BLE et BLR et qui appartiennent au même groupe statistique ($P < 0.05$) (Fig. 30).

Le témoin qui met en contact du MRSc avec la souche pathogène montre un effet inhibiteur de l'ordre de 3.33 ± 0.58 mm. Ce résultat nous révèle la sélectivité du milieu MRSc. Ainsi, l'action inhibitrice des surnageants concentrés des cultures des différentes souches de bifidobactéries se trouve encore une fois confirmée par la technique de l'agar spot.

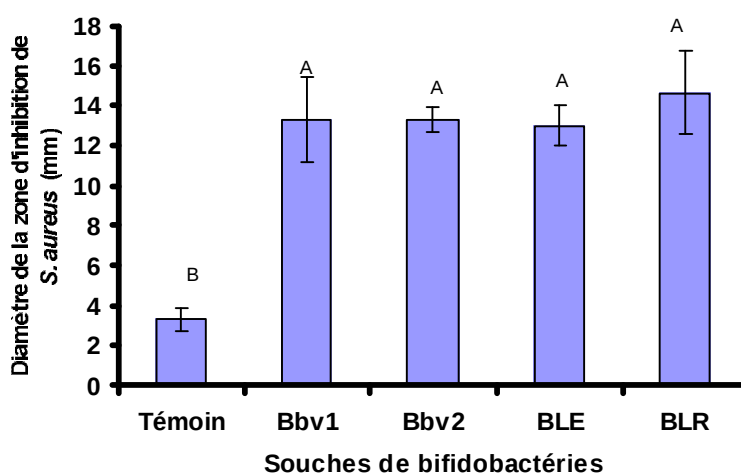


Figure 30: Diamètres des zones d'inhibition de *S. aureus* 49444 (en mm) confronté pendant 24h à 37°C aux surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries.

Témoin : - Culture pure de *S. aureus* en absence de surnageants concentrés cultures bifides.

A, B: Indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

V.2. Antagonisme des bifidobactéries vis-à-vis de *B. cereus* ATCC 9884.

V.2.1. Etendue des zones d'inhibition de *B. cereus* cocultivé 24h à 37°C avec les différentes souches de bifidobactéries selon la technique de Fleming et al. (1975).

L'étendue des zones d'inhibition de *B. cereus* ATCC 9884 confronté aux différentes souches de bifidobactéries pendant 24h de coculture sur milieu solide à 37°C est illustrée par la Fig. 31. Cette inhibition se manifeste par l'apparition d'halos clairs (Fig. 32) de diamètre variable de 7 à 9.33 mm selon la souche bifide considérée et ne constitue qu'un seul groupe statistique où il n'y a pas de différences significatives ($P < 0.05$) entre les souches.

Dans une expérience analogue, Topisirovic et al. (2006) avaient montré l'inhibition sur milieu solide de *B. cereus* ATCC 11778 par des bactéries lactiques. Le diamètre des zones d'inhibition que ces auteurs avaient mesuré variait de 4 à 8 mm.

Ainsi, les souches de bifidobactéries étudiées dans ce protocole recèlent un réel potentiel antagoniste vis-à-vis de *B. cereus*, et que l'on va explorer de plus près dans ce qui suit.

V.2.2. Cinétique d'inhibition de *B. cereus* ATCC 9884 en coculture à 37°C avec les souches de bifidobactéries.

L'inhibition de *B. cereus* ATCC 9884 en coculture sur milieu BHI (milieu cœur cerveau) à 37°C avec les différentes souches de bifidobactérie a été suivie jusqu'à ce qu'elle soit totale (c'est-à-dire jusqu'à l'obtention de 100% d'inhibition) dans le cas de toutes les souches antagonistes.

L'action inhibitrice des bifidobactéries a été quantifiée dès les 2 premières heures de coculture de *B. cereus* dont la perte en cellules enregistrée pendant ce temps là varie de 0.13 (antagonisme de Bbv1) à 0.24 log UFC/ml (antagonisme de BLE) en formant un seul groupe statistique ($P < 0.05$) différent du témoin (absence de souches bifides) (Fig. 33).

Après 4h de coculture, *B. cereus* accuse plus de pertes en cellules viables avec toutes les souches de bifidobactéries testées (Fig. 34). Une différence statistique ($P < 0.05$) dans l'ampleur de l'effet antagoniste apparaît entre les souches *B. longum* et *B. breve* qui provoquent des pertes respectives équivalentes à 1.25 et 1 log UFC/ml de cellules pathogènes viables.

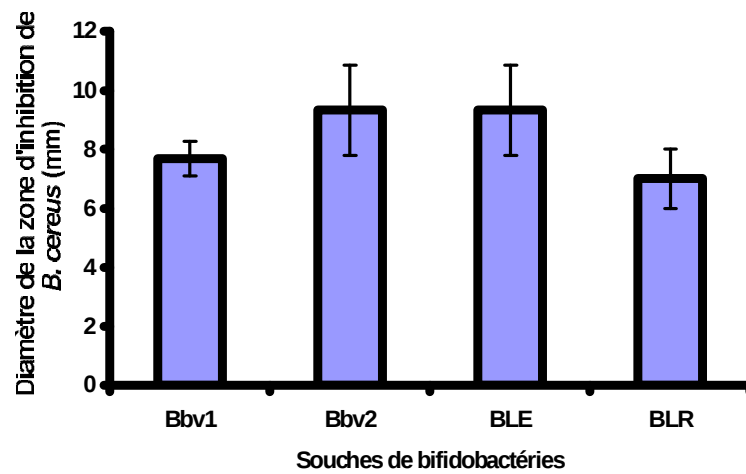


Figure 31: Diamètres des zones d'inhibition de *B. cereus* (en mm) confronté aux différentes souches de bifidobactéries après 24h de coculture sur milieu solide à 37°C (technique de Fleming et al., 1975).



Figure 32: Zones d'inhibition (halots clairs) de *B. cereus* confronté aux différentes souches de bifidobactéries après 24h de coculture sur milieu solide à 37°C (technique de Fleming et al., 1975).

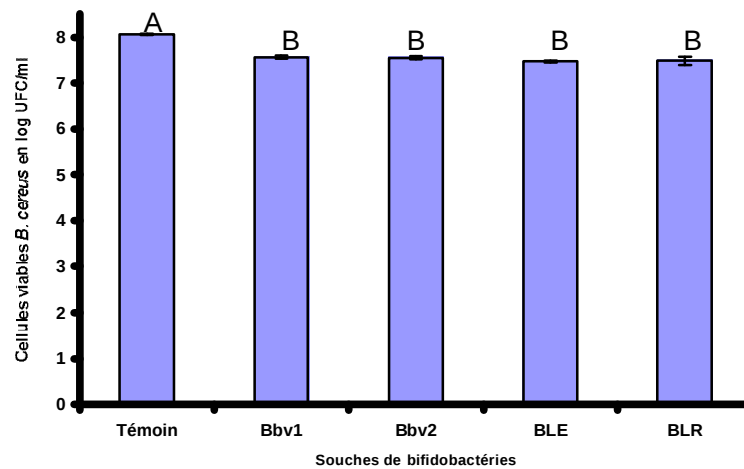


Figure 33: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 2h de coculture à 37°C dans un rapport cellulaire de bifidobactéries / *B. cereus* de 2 / 1.
Témoin : - Culture de *B. cereus* en absence de souches bifides.

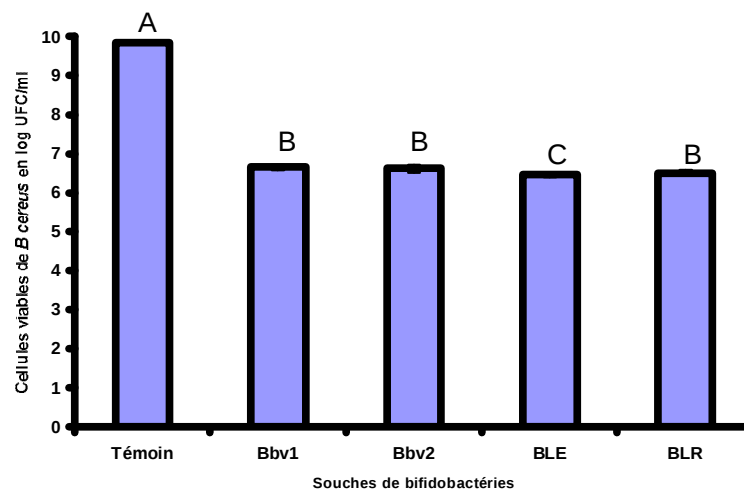


Figure 34: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 4h de coculture à 37°C dans un rapport cellulaire de bifidobactéries / *B. cereus* de 2 / 1.
Témoin : - Culture de *B. cereus* en absence de souches bifides.

A, B, C: indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0,05$) homogènes

Lorsque le temps de coculture entre souches pathogènes et souches antagonistes atteint 6h, ces pertes atteignent respectivement 1.7 et 1.5 log UFC/ml avec les souches *B. longum* et *B. breve* (Fig. 35).

La différence dans les taux d'inhibition de *B. cereus* par les différentes souches de bifidobactéries est plus marquée dans l'intervalle de coculture 2h – 4h que dans 4h – 6h (Tableau 26).

Tableau 26 : Cinétique d'inhibition de la viabilité de *B. cereus* ATCC 9884 (exprimé en % cellules inhibées) **cocultivé à 37°C** avec les différentes souches de bifidobactéries.

Différentes souches bifides	Temps de coculture avec <i>B. cereus</i>				
	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h
Bbv1	1.70	13.55	19.58	81.37	100
Bbv2	1.85	13.93	19.96	89.27	100
BLE	3.09	16.22	22.09	88.31	100
BLR	2.76	15.49	22.54	91.33	100

En effet, il a été constaté que le facteur de multiplication du taux d'inhibition de *B. cereus* obtenu avec les souches Bbv1, Bbv2, BLE et BLR était respectivement de 7.97, 7.52, 5.24 et 5.61 dans le premier intervalle de coculture des deux germes (2h – 4h), alors qu'il était seulement de 1.44, 1.49, 1.36, et 1.49 dans le deuxième intervalle de coculture (4h -6h).

La prolongation du temps de coculture des deux germes permet aux bifidobactéries d'inhiber la viabilité de plus de 80% des cellules de *B. cereus* dont le nombre viable enregistré n'était que de 1.43 ± 1.25 , 0.82 ± 1.43 , 0.90 ± 1.55 et 0.66 ± 1.15 logUFC/ml respectivement avec les souches bifides Bbv1, Bbv2, BLE et BLR (Fig. 36).

Les taux d'inhibition observés après 4h de coculture ont été multipliés, 2 h après, par des facteurs de 4.15, 4.47, 3.99 et 4.05 respectivement avec les souches Bbv1, Bbv2, BLE et BLR.

La poursuite de cette coculture jusqu'à 24h permet l'inhibition totale de la viabilité des cellules de *B. cereus* par les souches bifides antagonistes (Fig. 37).

Selon les taux d'inhibition de la viabilité de *B. cereus* par les différentes souches de bifidobactéries enregistrés aux différents intervalles de coculture de ces germes, il

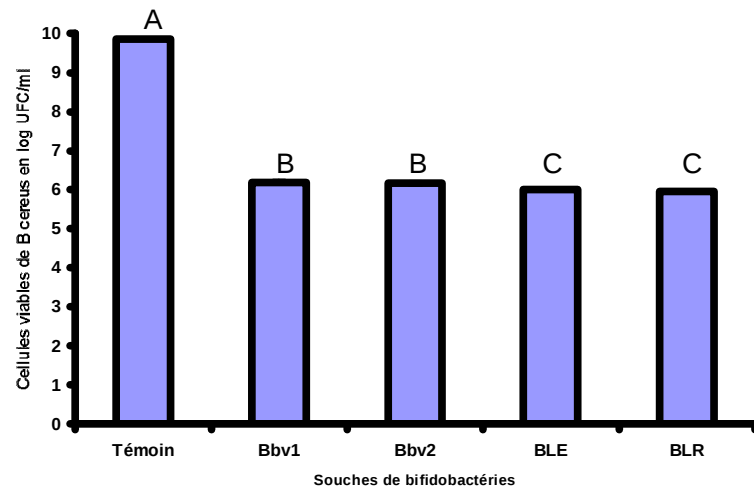


Figure 35: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 6h de coculture à 37°C dans un rapport cellulaire de bifidobactéries / *B. cereus* de 2/1.
Témoin : - Culture de *B. cereus* en absence de souches bifides.

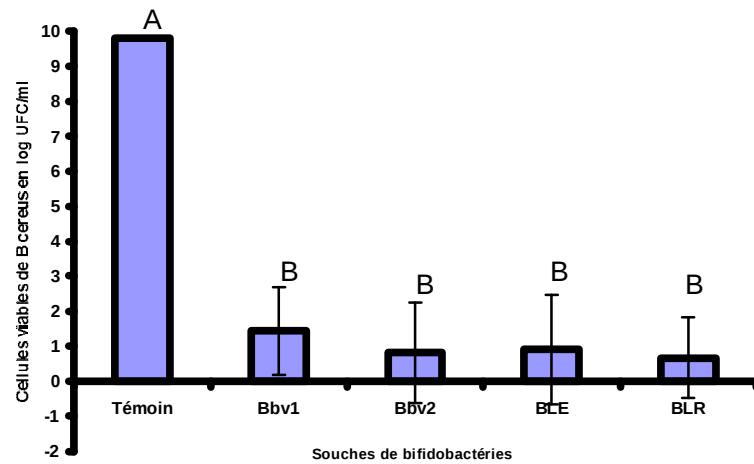


Figure 36: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 12h de coculture à 37°C dans un rapport cellulaire de bifidobactéries / *B. cereus* de 2/1.
Témoin : - Culture de *B. cereus* en absence de souches bifides.

A, B, C : indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

semblerait que la bactérie pathogène est très sensible à l'antagonisme bifide et particulièrement entre la deuxième et la quatrième heure de confrontation.

Dans une étude d'antagonisme similaire, [Noriega et al. \(2003\)](#) avaient constaté un comportement différent de *B. cereus* (souche isolée à partir de lait pasteurisé) lors de sa coculture à 37°C avec *Bifidobacterium infantis* ATCC 15702. En effet, cette souche pathogène *B. cereus* affichait une croissance pendant les 12 premières heures de coculture avec *B. infantis* et un déclin sans inhibition totale même après 35 jours de conservation du contact cellulaire entre les deux germes.

V.2.3. Relation entre viabilité de *B. cereus* ATCC 9884 et durée de coculture avec les différentes souches de bifidobactéries à 37°C.

L'évolution de l'inhibition de *B. cereus* ATCC 9884 par les différentes souches de bifidobactéries à 37°C est illustrée par le [Fig. 38](#).

La cinétique d'inhibition de cette bactérie pathogène est caractérisée par deux étapes importantes quant à la vitesse avec laquelle les souches bifides la neutralisent.

Il s'agit des étapes 2h - 4h et 6h - 12h aux cours desquelles, la vitesse d'inhibition de *B. cereus* atteint respectivement 5.92 et 10.29 h⁻¹ (Bbv1) 6.04 et 11.55 h⁻¹ (Bbv2), 6.56 et 11.03 h⁻¹ (BLE) et enfin 6.36 et 11.46 h⁻¹ (BLR) ([Tableau 27](#)).

Tableau 27: Vitesse d'inhibition (VI) de la viabilité de *Bacillus cereus* ATCC 9884 en coculture à 37°C avec les différentes souches de bifidobactéries (VI est exprimée en % cellules inhibées/h)

Intervalle de coculture	Vitesse d'inhibition (h ⁻¹)			
	Bbv1	Bbv2	BLE	BLR
0 – 2h	0.85	0.92	1.54	1.38
2h – 4h	5.92	6.04	6.56	6.36
4h – 6h	3.01	3.01	2.93	3.52
6h – 12h	10.29	11.55	11.03	11.46
12 – 24h	1.55	0.97	0.97	0.72

Dans un autre type d'expérience, [Rossland et al. \(2005\)](#) avaient différencié des souches de bactéries lactiques en fonction de l'action antagoniste qu'elles pouvaient exercer sur *B. cereus* NVH45 : celles provoquant une inhibition totale et celles à inhibition partielle.

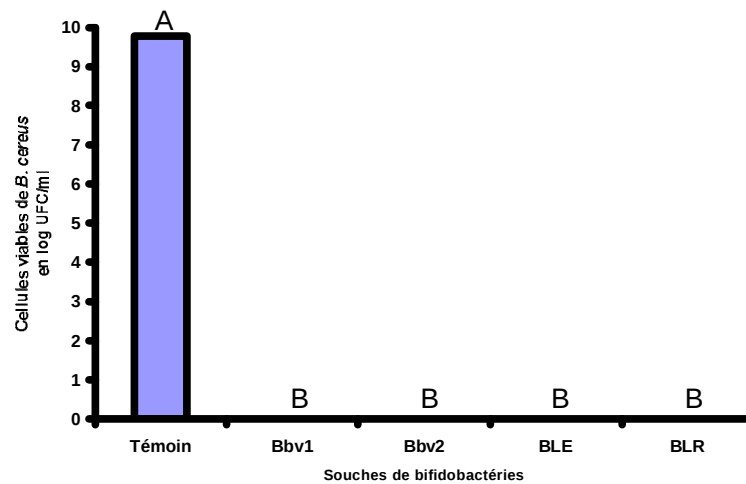


Figure 37 : Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC /ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries pendant 24h de coculture à 37°C dans un rapport cellulaire de bifidobactéries / *B. cereus* de 2/1.
Témoin : - Culture de *B. cereus* en absence de souches bifides.
A, B : indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0,05$) homogènes

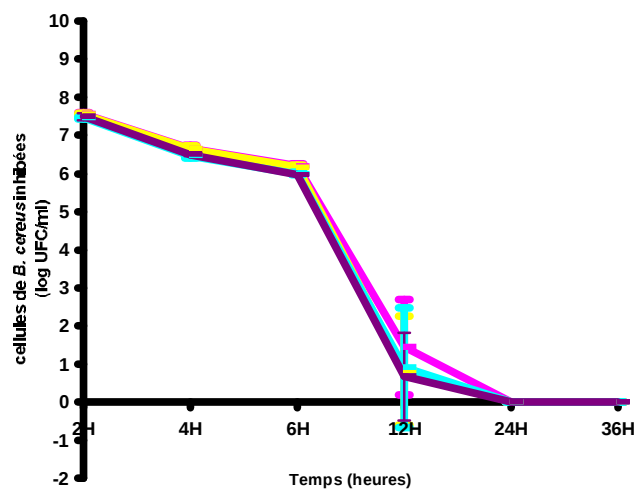


Figure 38 : Cinétique d'inhibition des cellules de *B. cereus* (log UFC /ml) soumises à l'antagonisme des différentes souches de bifidobactéries durant 36 h de coculture à 37°C.
 — Bbv1 : - Cinétique d'inhibition de *B. cereus* par la souche bifide Bbv1.
 — Bbv2 : - Cinétique d'inhibition de *B. cereus* par la souche bifide Bbv2.
 — BLE : - Cinétique d'inhibition de *B. cereus* par la souche bifide BLE.
 — BLR : - Cinétique d'inhibition de *B. cereus* par la souche bifide BLR.

Ces auteurs interprètent leurs observations sur la base de la différence des souches lactiques dans leur capacité de synthèse d'acides organiques tout au début de leur contact avec le germe pathogène. Les souches à inhibition partielle avaient un faible pouvoir de synthèse d'acides, permettant ainsi à *B. cereus* de développer une résistance (sporulation) vis-à-vis de cet antagonisme.

Deux années plus tôt, ces mêmes auteurs (Rossland et al., 2003) avaient également rapporté l'inhibition totale de plusieurs souches de *B. cereus* (NVH38, NVH45, NVH68 et NVH74) confrontées pendant 48h à l'antagonisme de *Lactobacillus casei* 2756.

V.2.4. Cinétique d'inhibition de la viabilité de *B. cereus* ATCC 9884 cultivé à 37°C en présence des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries.

A 37°C, la cinétique d'inhibition de la viabilité de *B. cereus* ATCC 9884 par les surnageants concentrés des différentes cultures bifides est plus rapide que celle enregistrée en coculture puisque l'inhibition totale a été atteinte au bout de 12h de contact seulement.

Les surnageants concentrés des souches bifides manifestent leur propriétés antagonistes dès les 2 premières heures de contact avec le pathogène (Fig. 39) où le taux maximal d'inhibition (8.25%) a été enregistré avec *B. longum* (BLE). Pendant cette période, les pertes en cellules de *B. cereus* varient de 0.56 (Bbv2) à 0.63 log UFC/ml (BLE).

Les taux d'inhibition de *B. cereus* enregistrés au bout de 4h de contact avec les surnageants représentent respectivement 2.74, 2.99, 2.95 et 3.05 fois ceux mesurés après 2h de contact avec les surnageants de Bbv1, Bbv2, BLE et BLR (Tableau 28).

Après 4h de contact avec les surnageants concentrés, les pertes de cellules de *B. cereus* dépassent respectivement 1.54 et 1.84 log UFC/ml pour les souches *B. breve* (Bbv1 et Bbv2) et *B. longum* (BLE et BLR) (Fig. 40).

Jusqu'à la 6^{ème} heure de contact avec les surnageants, *B. cereus* demeure toujours plus sensible aux souches *B. longum* (BLE et BLR) qu'à celles *B. breve* (Fig. 41).

Les taux d'inhibition de *B. cereus* enregistrés au point 4h se trouvent, au point 6h, multipliés par des facteurs respectifs de 1.45, 1.53, 1.57 et 1.82 pour Bbv1, Bbv2, BLE et BLR. L'ordre de grandeur de ces valeurs est proche de celui observé à l'issue des cocultures du pathogène avec les souches bifides pendant ce même intervalle 4h – 6h.

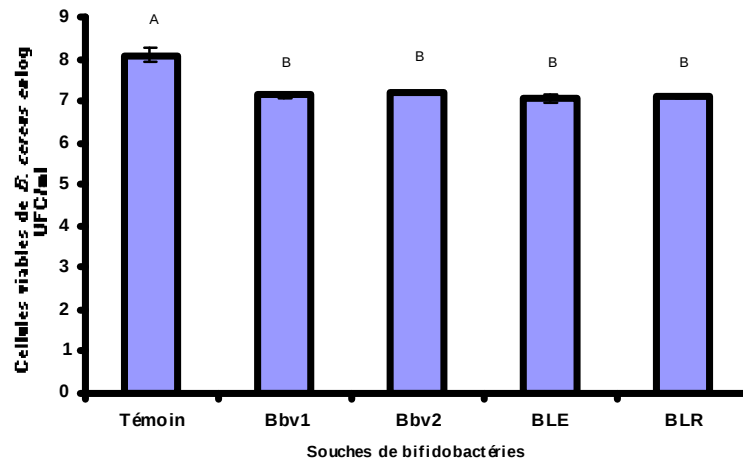


Figure 39: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC /ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 2h de contact à la température de 37 °C.
Témoin : - Culture pure de *B. cereus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

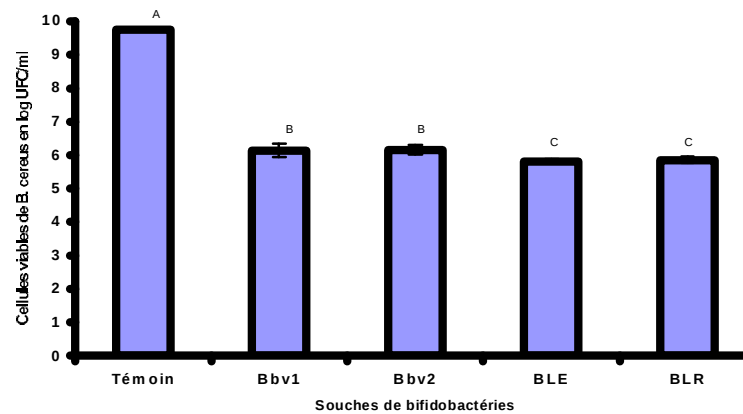


Figure 40: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC /ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 4h de contact à la température de 37 °C.
Témoin : - Culture pure de *B. cereus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

A, B, C : indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

Tableau 28 : Cinétique d'inhibition de la viabilité de *B. cereus* ATCC 9884 (exprimé en % de cellules inhibées) soumis à l'antagonisme des **surageants concentrés** des différentes souches de bifidobactéries à 37°C.

Différentes souches bifides	Temps de contact des surageants bifides avec les cellules de <i>B. cereus</i> .			
	2 h	4 h	6 h	12 h
Bbv1	7.40	20.29	29.46	100
Bbv2	6.68	20.00	30.71	100
BLE	8.25	24.41	38.41	100
BLR	7.83	23.90	43.72	100

Au-delà de 6h et peut être avant 12h, car nous n'avons pas fait de mesure au point 8h et 10h, on ne dénombre plus de cellules pathogènes viables car l'inhibition par les surageants bifides est totale au point 12h (Fig. 42). L'inhibition observée après 12h de contact représente respectivement 3.39, 3.25, 2.26 et 2.28 fois celle enregistrée au point 6h pour les souches Bbv1, Bbv2, BLE et BLR.

V.2.5. Relation entre viabilité de *B. cereus* ATCC 9884 et durée de son contact avec les surageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 37°C.

La cinétique d'inhibition de *B. cereus* ATCC 9884 par les surageants concentrés de cultures bifides est totalement différente de celle générée par la confrontation des cellules entre elles (coculture).

En effet, nous avons vu que dans le cas des cocultures, il y avait une certaine latence pendant les deux premières heures où les taux d'inhibition variaient de 1.70 à 3.09% ; alors qu'avec les surageants ils fluctuaient entre 6.68 et 8.25% pendant cette même période. Ces observations mettent en relief la plus grande efficacité des surageants concentrés par rapport aux cellules elles mêmes dans l'antagonisme vis-à-vis de *B. cereus*.

Le temps utile pour une inhibition totale est également plus court avec les surageants. L'allure de la courbe d'inhibition de *B. cereus* par les surageants bifides est indiquée à la Fig. 43.

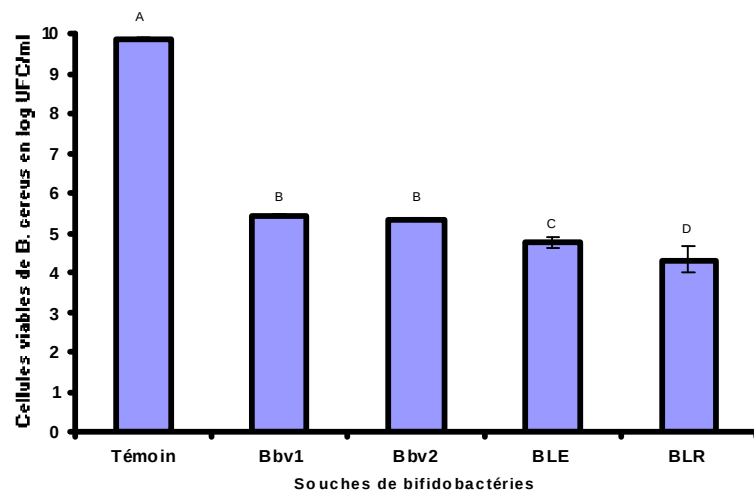


Figure 41: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 6h de contact à la température de 37 °C.
Témoin : - Culture pure de *B. cereus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

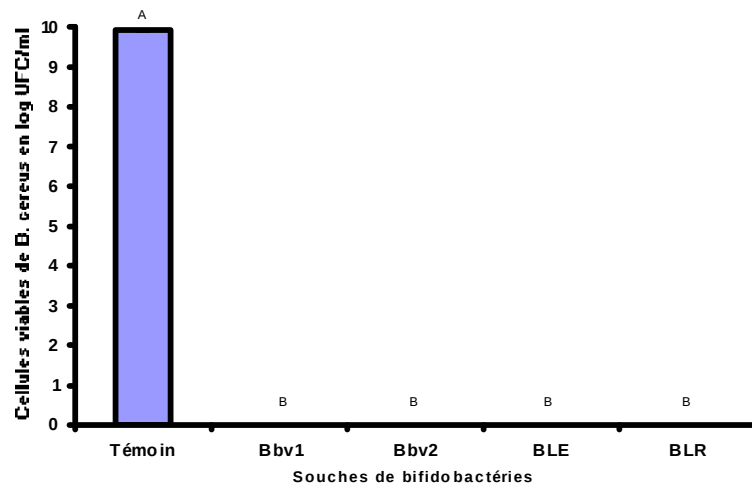


Figure 42: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 12h de contact à la température de 37°C.
Témoin : - Culture pure de *B. cereus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

A, B, C, D : indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

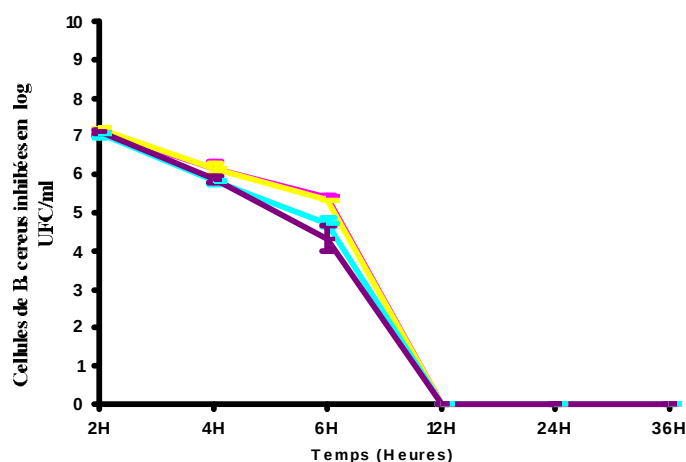


Figure 43: Cinétique d'inhibition des cellules de *B. cereus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés de différentes souches de bifidobactéries durant 36 heures de contact à 37°C.

- Bbv1 : - Cinétique d'inhibition de *B. cereus* par le surnageant concentrés de la souche Bbv1.
- Bbv2 : - Cinétique d'inhibition de *B. cereus* par le surnageant concentrés de la souche Bbv2.
- BLE : - Cinétique d'inhibition de *B. cereus* par le surnageant concentrés de la souche BLE.
- BLR : - Cinétique d'inhibition de *B. cereus* par le surnageant concentrés de la souche BLR.

Les vitesses d'inhibition de *B. cereus* ATCC 9884 par les surnageants concentrés bifides à 37°C ont été maximales pendant les intervalles de contact 6h -12h ([Tableau 29](#)) comme cela avait été observé avec les cocultures des deux germes.

Tableau 29 : Vitesse d'inhibition (VI) de la viabilité de *Bacillus cereus* ATCC 9884 soumis à l'antagonisme des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 37°C (VI est exprimée en % cellules inhibées / h).

Intervalle de contact avec les surnageants bifides	VI de <i>B. cereus</i> par les surnageants bifides à 37°C (h ⁻¹)			
	Bbv1	Bbv2	BLE	BLR
0 – 2h	3.70	3.34	4.12	3.91
2h – 4h	6.44	6.66	8.08	8.03
4h – 6h	4.58	5.35	7.00	9.91
6h – 12h	11.75	11.54	10.26	9.38

Nous remarquons que ces vitesses sont plus fortes que celles des cocultures et spécialement au début du contact des surnageants bifides ou des cellules bifides avec le microorganisme pathogène.

Dans d'autres expériences utilisant des substances antagonistes plus ou moins purifiées comme les bactériocines, [Abriouel et al. \(2002\)](#) obtiennent une inhibition totale de *B. cereus* CECT131 après 4h d'incubation en présence de la bactériocine AS48 employée à une dose de 10 µg/ml alors qu'une autre souche de *B. cereus* (LWL1) n'est totalement inhibée qu'après 24h d'exposition.

En augmentant la concentration de la bactériocine AS48 à 30 µg/ml, [Grande et al. \(2006\)](#) constatent une inhibition totale de *B. cereus* LWL1 après 6h d'exposition seulement. Ceci laisserait penser à une relation dose-effet des bactériocines sur la viabilité de *B. cereus*.

Par contre [Yildirim \(1998\)](#) n'as pas enregistré d'inhibition totale de *B. cereus* par la bifidocine b lorsque ce germe était cultivé entre 22 et 25°C. Cette différence peut être due à la différence de substrat utilisé comme milieu de contact.

Dans une autre étude, [Makras et De Vuyst \(2006\)](#) trouvent que l'effet inhibiteur de surnageant de *B. longum* CA1 peut être reproduit avec un échantillon contenant la même dose d'acide lactique et acétique combinés.

V.2.6. Cinétique d'inhibition de la viabilité de *B. cereus* ATCC 9884 cultivé à 6°C en présence des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries.

A basse température (6°C), l'action inhibitrice des surnageants concentrés bifides vis-à-vis de *B. cereus* est considérablement ralentie par rapport à ce qui a été observé à 37°C. Cette action s'étale dans le temps et n'aboutit pas à une inhibition totale du pathogène même après 48h de contact ([Tableau 30](#)).

Ainsi, au cours des deux premières heures de coculture de *B. cereus* en présence des surnageants concentrés des souches bifides à la température de 6°C, les taux d'inhibition enregistrés sont faibles et représentent 4 à 5.5 fois moins ceux observés à la température 37°C ([Fig. 44](#)). Ils correspondent à des pertes de cellules viables de *B. cereus* qui ne dépassent pas 0.13 log UFC/ml. Il semblerait donc, que la basse température ne favoriserait pas l'action des substances antagonistes contenues dans les surnageants bifides.

Tableau 30 : Cinétique d'inhibition de la viabilité de *B. cereus* ATCC 9884 (exprimée en % cellules inhibées) soumis à l'antagonisme des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 6°C.

Différentes souches bifides	Temps de contact du surnageant bifide avec les cellules de <i>B. cereus</i>						
	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h
Bbv1	1.33	12.61	25.47	34.49	42.17	51.34	55.95
Bbv2	1.54	12.94	23.78	34.58	42.62	50.49	53.88
BLE	1.55	13.97	26.48	35.29	44.53	52.59	56.22
BLR	1.71	16.07	31.12	36.69	43.96	53.63	59.15

Cet effet négatif de la basse température s'atténue quelque peu après 4h de contact des surnageants bifides avec *B. cereus* (Fig. 45) dont les pertes en cellules viables varient de 0.97 à 1.06 log/ml selon la souche bifide considérée.

Les taux d'inhibition mesurés au point 4h à 37°C ne représentent que 1.60, 1.54, 1.74 et 1.48 fois ceux enregistrés au même point mais à 6°C pour les souches Bbv1, Bbv2, BLE et BLR, respectivement.

Les pertes en cellules *B. cereus* viables au bout de 6h de contact avec les surnageants à 6°C sont respectivement de 1.96, 1.83, 2.04 et 2.40 log UFC/ml avec les souches bifides Bbv1, Bbv2, BLE et BLR (Fig. 46). L'action inhibitrice de BLR est statistiquement différente ($P < 0.05$) de celle des autres souches bifides.

L'écart entre les actions antagonistes des surnageants bifides sur *B. cereus* à 37°C et à 6°C et 4h de contact est comparable et reste modéré.

Les niveaux d'inhibition de *B. cereus* par les surnageants bifides après 12h de contact à 6°C sont, pour certaines souches comme BLE et BLR par exemple, inférieurs à ceux observés après seulement 6h à 37°C.

En effet, après 12H de contact, les pertes en cellules viables de *B. cereus* demeurent inférieures à 2.80 log UFC/ml (Fig. 47). Les taux d'inhibition à 37°C représentent plus de 2.7 fois ceux à 6°C après 12h de contact.

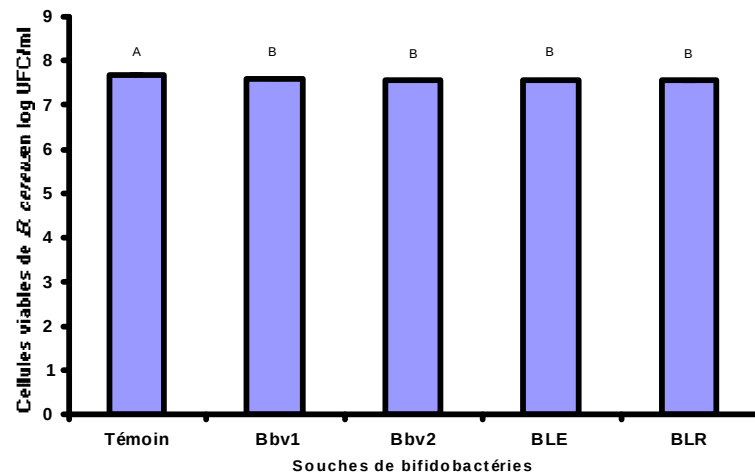


Figure 44: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 2h de contact à la température de 6 °C.
Témoin : - Culture pure de *B. cereus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

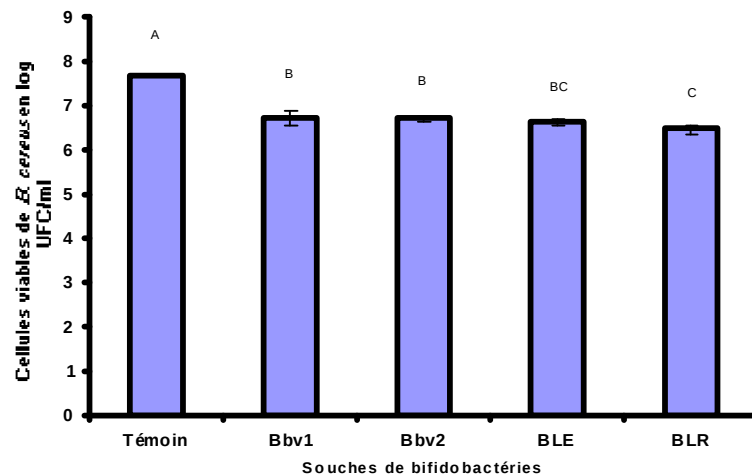


Figure 45: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 4h de contact à la température de 6 °C.
Témoin : - Culture pure de *B. cereus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

A, B, C: indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

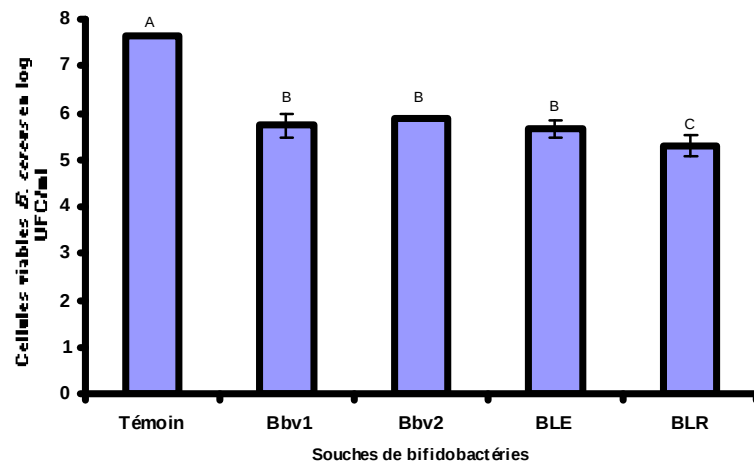


Figure 46: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 6h de contact à la température de 6 °C.
Témoin : - Culture pure de *B. cereus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

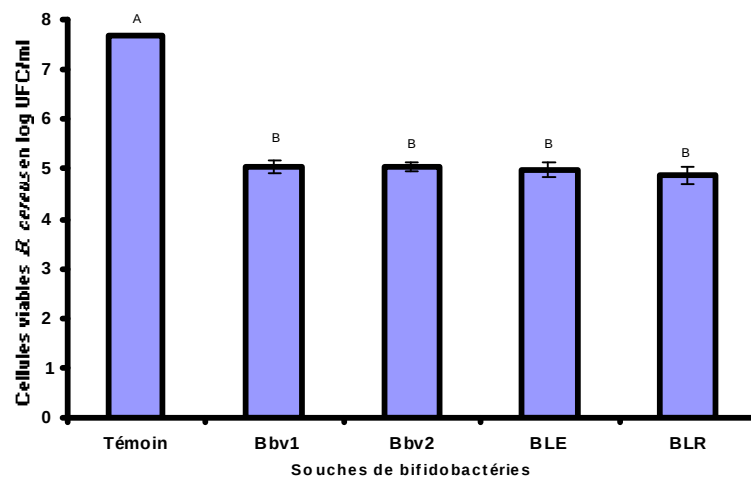


Figure 47: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 12h de contact à la température de 6°C.
Témoin : - Culture pure de *B. cereus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.
A, B C : indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0,05$) homogènes

La poursuite du contact des surnageants bifides avec les cellules du pathogène à 24h à la température de 6°C fait apparaître des différences significatives ($P < 0.05$) dans l'action antagoniste des différentes souches de bifidobactéries. Les pertes en cellules *B. cereus* viables s'élèvent respectivement à 3.25, 3.28, 3.43, et 3.38 log UFC/ml pour les souches Bbv1, Bbv2, BLE et BLR (Fig. 48). Les taux d'inhibition fluctuent entre 42 et 45% selon la souche antagoniste.

On assiste encore à une augmentation sensible du taux d'inhibition de la viabilité de *B. cereus* lorsqu'il est maintenu en contact avec les souches de bifidobactéries jusqu'à 36h à 6°C (Fig. 49).

En effet, les taux d'inhibition de *B. cereus* enregistrés après 24h de contact avec les surnageants concentrés augmentent respectivement de 21.74, 18.46, 18.10 et 22% au point 36h avec les souches Bbv1, Bbv2, BLE et BLR.

Il n'y a pas de changements notables dans l'action inhibitrice des surnageants bifides à 6°C lorsque le contact est prolongé à 48h (Fig. 50). L'augmentation la plus importante du taux d'inhibition de *B. cereus* à 6°C entre les points 36h et 48h a été de 10.6% dans le cas de la souche bifide BLR.

V.2.7. Relation entre viabilité de *B. cereus* ATCC 9884 et durée de son contact avec les surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 6°C.

La cinétique d'inhibition de la viabilité de *B. cereus* ATCC 9884 par les surnageants concentrés de cultures de bifidobactéries à basse température (6°C) suivie pendant 48h est représentée par la Fig. 51.

A première vue, le nombre de cellules *B. cereus* viables diminue selon une faible pente et il n'y a pas d'effet brusque ou exponentiel dans cette chute. Il semblerait que *B. cereus* résiste mieux à l'action antagoniste des surnageants à basse température.

Selon certains auteurs (Abriouel et al., 2002) *B. cereus* s'adapterait aux températures basses en modifiant sa composition en acides gras.

Par ailleurs, Grande et al. (2006) avaient enregistré une croissance de *B. cereus* à température basse même lorsqu'il était traité par l'entérocline AS-48. Dans une autre expérience, Yildirim (1998) n'avait pas pu obtenir une inhibition totale de *B. cereus* cultivé sur de la viande de poulet et traité par de la bifidocine b ; et ceci même après 28 jours à une température variable de 5 à 8°C.

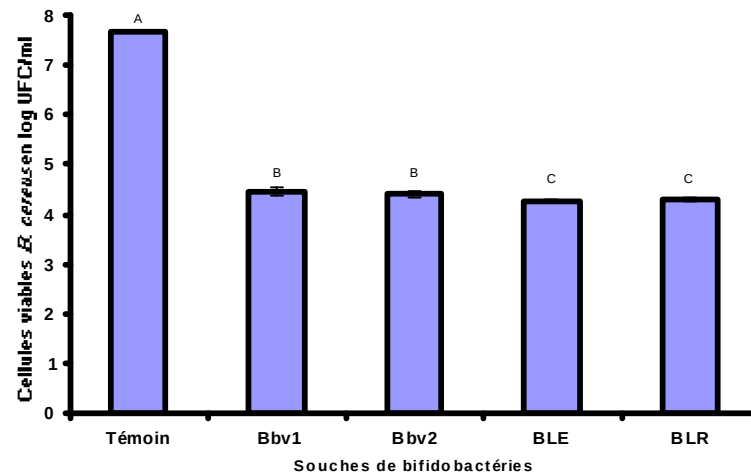


Figure 48: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 24h de contact à la température de 6 °C.
Témoin : - Culture pure de *B. cereus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

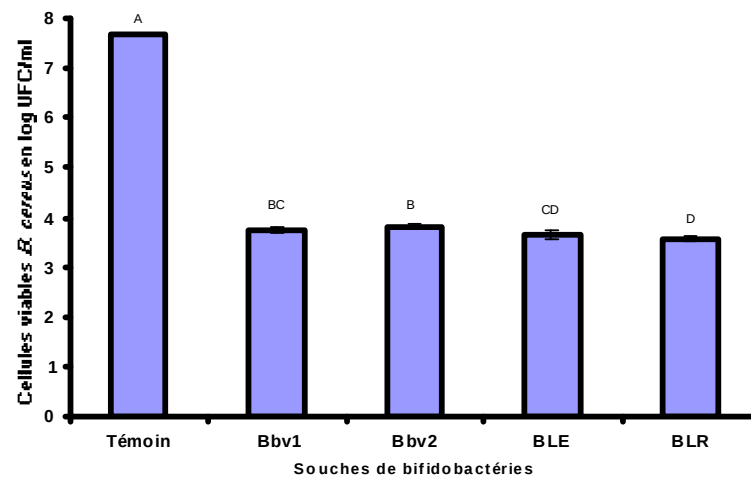


Figure 49: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 36h de contact à la température de 6°C.
Témoin : - Culture pure de *B. cereus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

A, B, C, D : indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

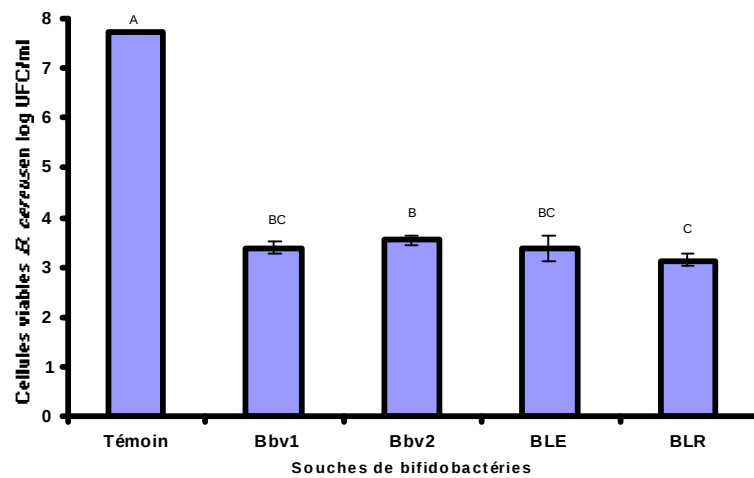


Figure 50: Viabilité des cellules de *B. cereus* (log UFC / ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés des souches de bifidobactéries pendant 48h de contact à la température de 6 °C.
Témoin : - Culture pure de *B. cereus* en absence de surnageants concentrés de cultures bifides.

A, B, C: indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

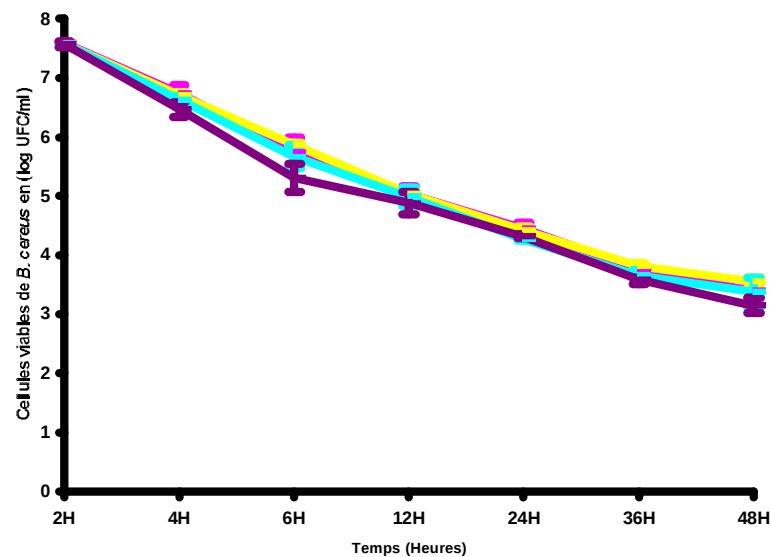


Figure 51: Cinétique d'inhibition des cellules de *B. cereus* (log UFC/ml) soumises à l'antagonisme des surnageants concentrés de différentes souches de bifidobactéries durant 36 heures de contact à 6°C.

- Bbv1 : - Cinétique d'inhibition de *B. cereus* par le surnageant concentrés de la souche Bbv1.
- Bbv2 : - Cinétique d'inhibition de *B. cereus* par le surnageant concentrés de la souche Bbv2.
- BLE : - Cinétique d'inhibition de *B. cereus* par le surnageant concentrés de la souche BLE.
- BLR : - Cinétique d'inhibition de *B. cereus* par le surnageant concentrés de la souche BLR.

Donc, à priori, la prolongation du temps de contact de *B. cereus* avec les surnageants bifides au-delà des 48h testées dans cette expérience ne nous donne pas la certitude d'obtenir ou de se rapprocher du niveau d'inhibition totale de cette bactérie pathogène.

Les vitesses d'inhibition de *B. cereus* par les surnageants bifides observées à 6°C sont en général bien inférieures à celles enregistrées à 37°C exceptées celles des intervalles 2h – 4h et 4 – 6h (Tableau 31).

Tableau 31 : Vitesse d'inhibition (VI) de la viabilité de *Bacillus cereus* ATCC 9884 soumis à l'antagonisme des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries à 6°C. (VI exprimée en % cellules inhibées/h)

Intervalle de contact avec les surnageants bifides	VI (h ⁻¹) de <i>B. cereus</i> par les surnageants bifides à 6°C			
	Bbv1	Bbv2	BLE	BLR
0 – 2h	0.66	0.77	0.77	0.85
2 – 4h	5.64	5.70	6.21	7.18
4 – 6h	6.43	5.42	6.25	7.52
6 – 12h	1.50	1.80	1.46	0.92
12 – 24h	0.64	0.67	0.77	0.60
24 – 36h	0.76	0.65	0.67	0.80
36 – 48h	0.38	0.28	0.30	0.46

Ces vitesses d'inhibition de *B. cereus* à 6°C pour les surnageants bifides deviennent très faibles à la 12^{ème} heures de contact et minimales à la 48^{ème} heures.

Trois interprétations de ces observations pourraient être possibles :

- soit que la basse température constitue un facteur de développement d'une forme de résistance de *B. cereus* à l'antagonisme.
- Soit que les métabolites antagonistes contenus dans les surnageants des bifidobactéries sont partiellement inactivés par les basses températures.
- Soit qu'il s'agit de la combinaison de ces deux premiers cas de figures.

V.2.8. Viabilité globale de *B. cereus* ATCC 9884 soumis à l'action des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries par la technique de l'agar spot (Fleming et al., 1975)

Les diamètres des zones d'inhibition de *B. cereus* ATCC 9884 (en mm) soumis à l'action des surnageants concentrés des différentes souches de bifidobactéries sont représentés à la Fig. 52.

Le milieu MRS exerce un effet inhibiteur sur *B. cereus* (diamètre = 3mm environ).

C'est le surnageant de la souche bifide BLR (*B. longum*) qui manifeste le maximum d'activité antagoniste envers *B. cereus* (diamètre de la zone d'inhibition voisin de 16 mm).

L'inhibition due aux surnageants et révélée par la technique de l'agar spot est beaucoup plus forte que celle obtenue par confrontation cellulaire entre souches bifides et cellules pathogènes par la technique de Fleming et al. (1975).

Ce résultat constitue un argument supplémentaire en faveur de la plus grande efficacité des surnageants bifides concentrés dans l'antagonisme envers *B. cereus* ATCC 9884.

V.3. Effet des solvants organiques sur l'activité inhibitrice des surnageants concentrés de cultures de bifidobactéries vis-à-vis de *S. aureus* et *B. cereus*.

Le traitement des surnageants bifides concentrés par divers solvants organiques (formaldéhyde, chloroforme, acétone, hexane, iso-butanol, méthanol et diethyl-ether) n'a pas affecté leurs propriétés antagonistes vis à vis de *S. aureus* 49444 (Fig. 53 et 54) et de *B. cereus* ATCC 9884 (Fig. 55 et 56).

Etant donné que les principaux métabolites bactériens présents dans les surnageants des souches de bifidobactéries et responsables de l'antagonisme microbien observé sont probablement représentés par les acides organiques (acétique et lactique) et les substances protéiques (bactériocine-like), les solvants organiques testés ne dénaturent pas ces protéines qui conservent leurs propriétés inhibitrices de germes pathogènes.

Il y a très peu d'études qui ont traité l'effet des solvants organiques sur l'activité antagoniste des surnageants de cultures probiotiques exceptée celle réalisée par Yildirim et Johnson (1998).

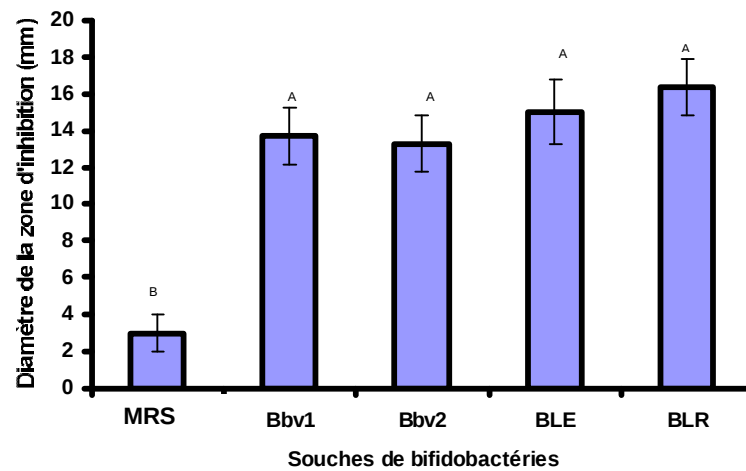


Fig. 52: Diamètre des zones d'inhibition de *B. cereus* (en mm) obtenus par la technique de l'Agar spot (Fleming et al., 1975) en testant l'effet inhibiteur du MRS comme témoin et des surnageants concentrés des cultures des souches de bifidobactéries à 37°C.

A, B : indiquent les groupes de moyennes statistiquement ($P < 0.05$) homogènes

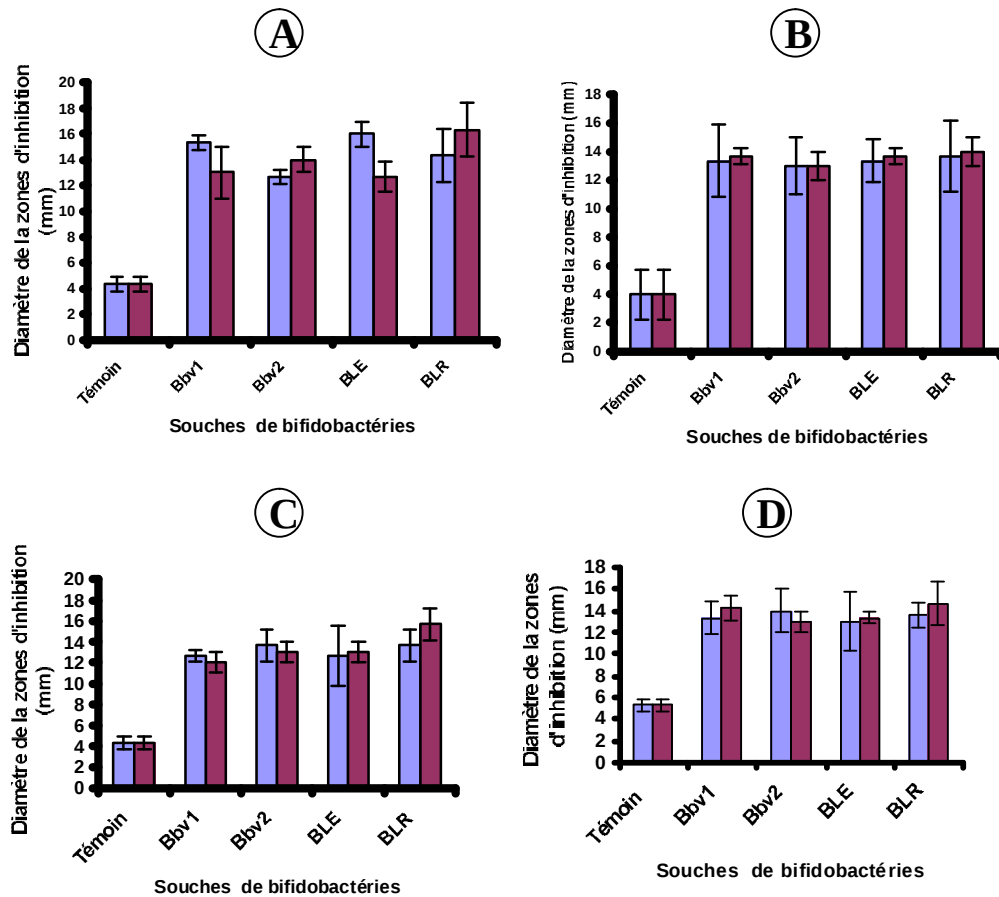


Fig. 53: Diamètres des zones d'inhibition de *S. aureus* (en mm) obtenus par la technique de l'Agar spot (méthode de Fleming et al., 1975) en testant l'effet inhibiteur du MRS comme témoin et des surnageants des cultures des souches de bifidobactéries traités ou non traités par le formaldéhyde (A), le chloroforme (B), l'acétone (C) et l'hexane (D) à 37°C.

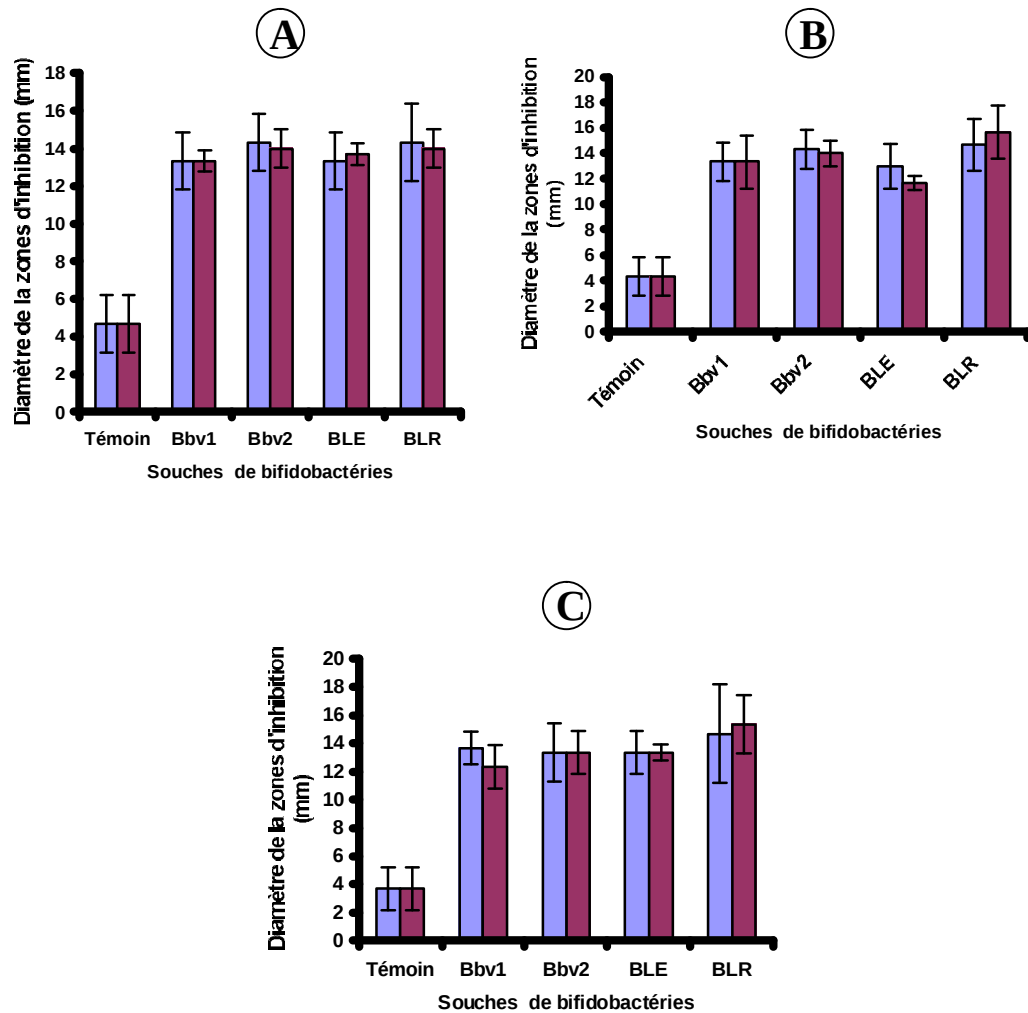


Fig. 54: Diamètres des zones d'inhibition de *S. aureus* (en mm) obtenus par la technique de l'Agar spot (méthode de Fleming et al., 1975) en testant l'effet inhibiteur du MRS comme témoin et des surnageants des cultures des souches de bifidobactéries traités et non traités par l'isobutanol (A) méthanol, (B) diéthyl éther (C) à 37°C.

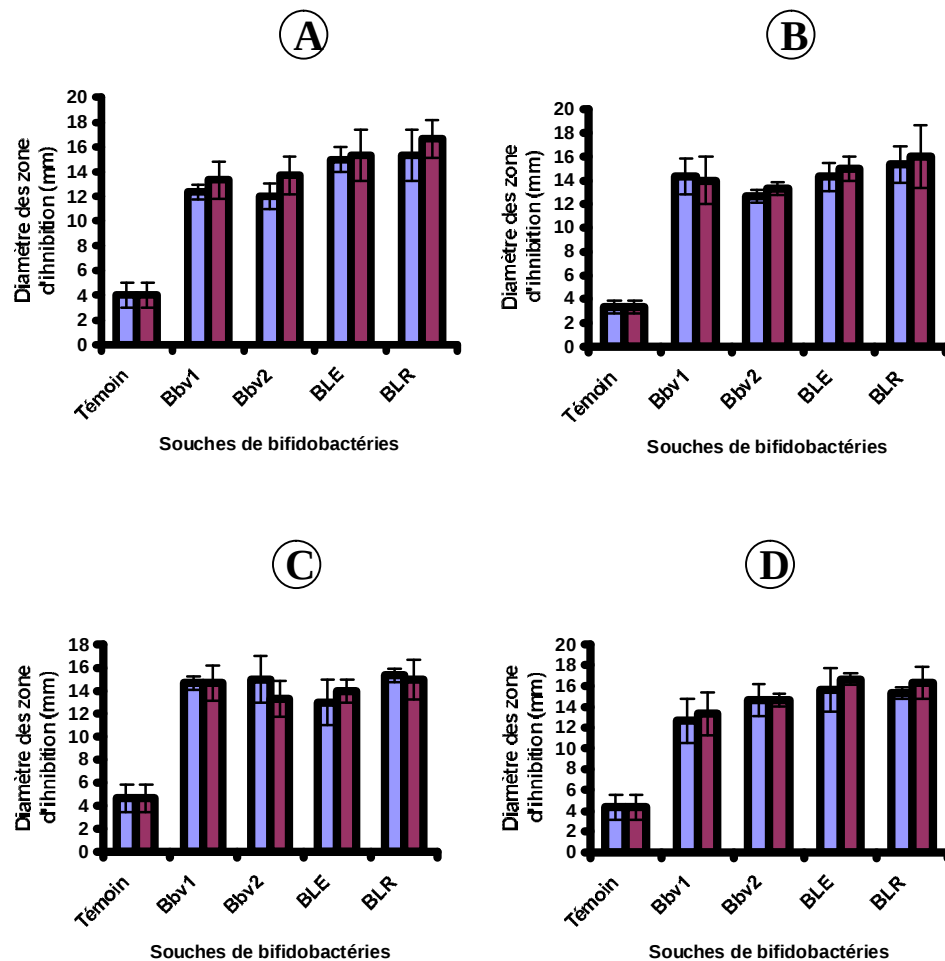


Fig. 55: Diamètres des zones d'inhibition de *B. cereus* (en mm) obtenus par la technique de l'Agar spot (méthode de Fleming et al., 1975) en testant l'effet inhibiteur du MRS comme témoin et des surnageants des cultures des souches de bifidobactéries traités ou non traités par le formaldéhyde (A), le chloroforme (B), l'acétone (C) et l'hexane (D) à 37°C.

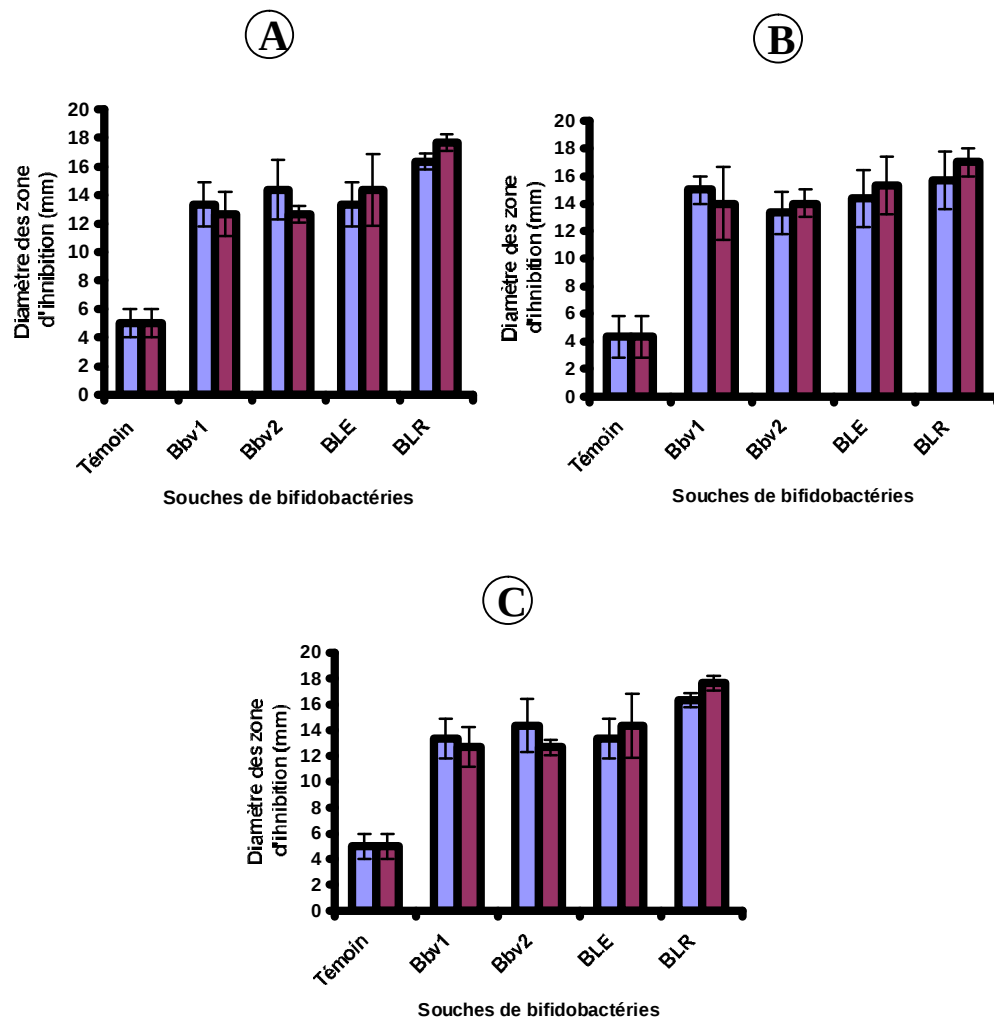


Fig. 56: Diamètre des zones d'inhibition de *B. cereus* (en mm) obtenus par la technique de l'Agar spot (méthode de Fleming et al., 1975) en testant l'effet inhibiteur du MRS comme témoin et des surnageants des cultures des souches de bifidobactéries traités et non traités par l'isobutanol (A) méthanol, (B) diéthyl éther (C) à 37°C.

Ces auteurs avaient testé une série de solvants organiques (formaldéhyde à 10% : v/v, hexane à 25% : v/v, 2-propanol 10% : v/v, isobutanol à 25% : v/v, méthanol à 25% : v/v, éther d'éthyle à 25% : v/v, acétone à 10% : v/v, chloroforme à 10% : v/v, alcool éthylique 25% : v/v) sur l'activité antimicrobienne d'une bactériocine (bifidocine B) isolée à partir de culture de *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. Leurs résultats ont indiqué qu'il n'y avait aucune modification des propriétés anti-microbiennes de cette molécule.

VI.4. Activité de synthèse d'acides organiques.

Les acides lactique et acétique sont très impliqués dans le phénomène d'antagonisme bactérien. Leur mise en évidence et leur quantification dans les surnageants de cultures des différentes souches de bifidobactéries ayant montré le maximum d'inhibition de *S. aureus* 49444 et/ou de *B. cereus* ATCC 9884 constituerait un argument supplémentaire en faveur de l'existence d'un réel potentiel antagoniste chez ces souches bifides.

Les chromatogrammes HPLC obtenus sont indiqués à la [Fig. 57](#).

Au [tableau 32](#), nous avons reporté les différents temps de rétention et les résultats de dosage des acides lactique et acétique.

L'acide acétique a un temps de rétention dans le système chromatographique utilisé légèrement supérieur à celui affiché par l'acide lactique qui sort le premier de la colonne.

Théoriquement, sur le plan stoechiométrique, la voie bifid-shunt utilisée par les bifidobactéries pour métaboliser le substrat permet la synthèse des acides acétique et lactique dans un rapport molaire égal à 1.5.

Nos résultats montrent que les souches de bifidobactéries étudiées synthétisent plus d'acide acétique que d'acide lactique et ceci dans un rapport molaire qui varie de 1.74 à 1.99 ([Tableau 32](#)).

Il semblerait que le degré d'inhibition de germes pathogènes par les acides organiques ne dépend pas seulement de leur quantités mais aussi de la forme L ou D ou DL sur laquelle ils sont synthétisés ainsi que de l'état (dissocié ou non) dans lequel il pourraient se trouver ([Midolo et al., 1995](#)).

Parmi les souches de bifidobactéries étudiées dans cette expérience, ce sont les *B. longum* (BLE et BLR) qui synthétisent le plus d'acides organiques : respectivement 53 et 49 mM de mélange d'acides acétique et lactique. Ce sont également ces souches qui ont exhibées le plus d'antagonisme vis-à-vis de *S. aureus* et *B. cereus*.

Tableau 32 : Les temps de rétention et les concentrations d'acide lactique et acétique synthétisés par des différentes souches de bifidobactéries et obtenus par HPLC.

Souches	Acide lactique		Acide acétique		Rapport molaire acide acétique / acide lactique
	Temps de rétention (min)	La concentration (mM)	Temps de rétention (min)	La concentration (mM)	
Bbv1	9.879	13.7	10.561	27.2	1.99
Bbv2	9.952	12.9	10.654	24.8	1.92
BLE	9.963	19.2	10.648	33.8	1.76
BLR	9.969	18.0	10.640	31.3	1.74

En étudiant le pouvoir de croissance et d'acidification du milieu lait par deux espèces commerciales de *Bifidobacterium bifidum* spp, [Ustunol et Gandhi \(2001\)](#) avaient trouvé que les acides acétique et lactique étaient synthétisés par cette souche dans des proportions stochiométriques très variables (Rapport acétate / lactate qui varie de 1.9 à 6.9) selon la souche et le substrat additionné.

Dans une expérience analogue, [Chick et al. \(2001\)](#) avaient rapporté des rapports acétate/lactate variable de 1.08 à 3.45 pour la même espèce *B. bifidum*.

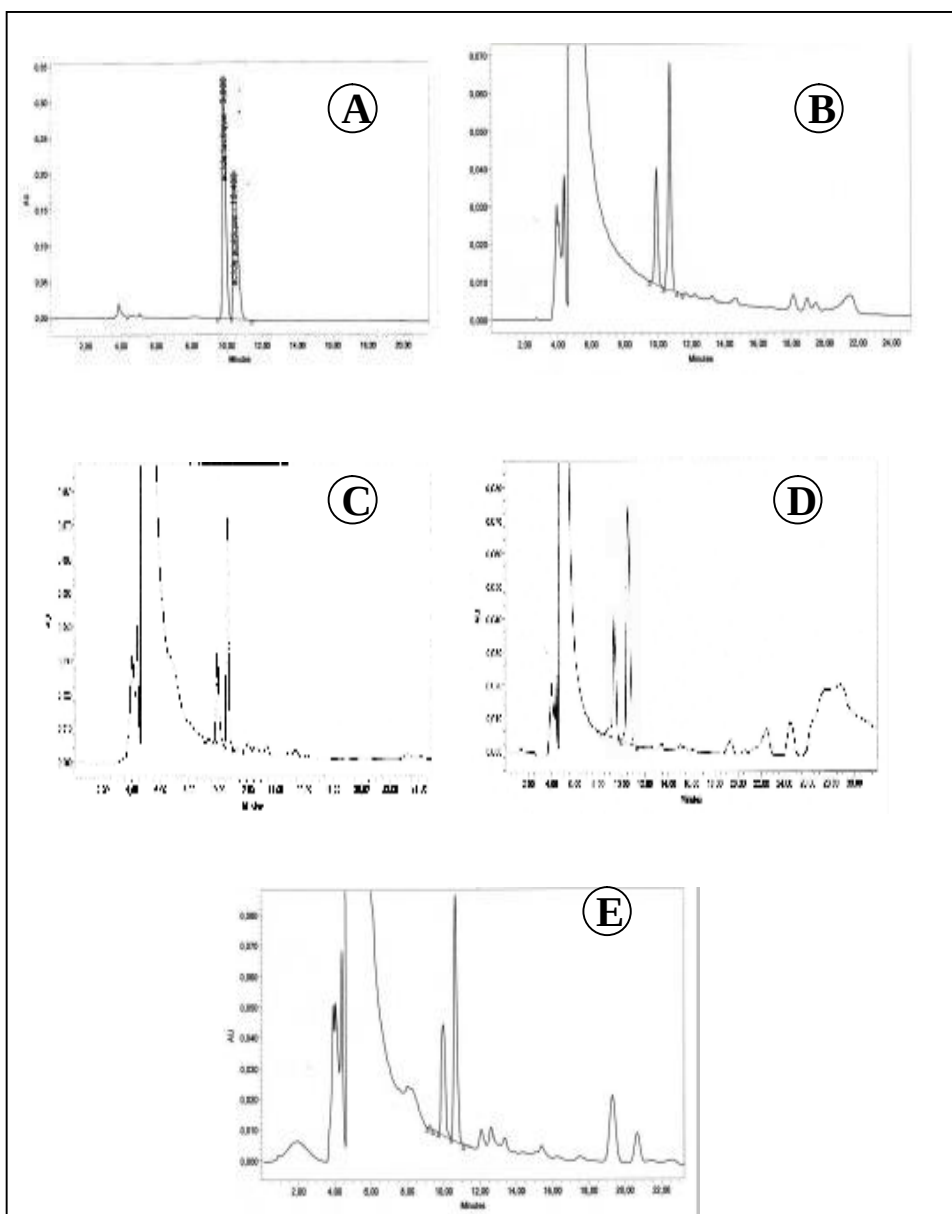


Fig. 57: Chromatogramme d'HPLC des acides organiques à une longueur d'onde optimisée à 220 nm d'une injection de 20 μ l d'une solution étalon d'acide acétique (0.1 M/l) et lactique (0,1 M/l) (A), d'un échantillon préparé par addition de 100 μ l d' HNO_3 15.8N et 14.9 ml d' H_2SO_4 9. 10^{-3} N à 1.5 ml de surnageants non concentrés d'une culture de 48h de la souche bifide **Bbv1** (B), **Bbv2** (C), **BLE** (D) ou **BLR** (E) sur colonne C18 parcourue par une phase mobile contenant H_2SO_4 0.01N filtré à 0.22 μ m et utilisée à la pression de 0.6ml/min.

Conclusion

Conclusion

La présente étude a permis la mise en évidence in Vitro de l'activité antagoniste de quatre souches de bifidobactéries, dont trois proviennent de la collection de notre laboratoire, vis-à-vis de deux souches pathogènes : *Staphylococcus aureus* 49444 et *Bacillus cereus* ATCC 9884.

L'action inhibitrice des souches de bifidobactéries à 37°C s'est nettement manifestée par le développement d'halos clairs de plus de 8 mm de diamètre autour des germes pathogènes mis pendant 24h en coculture avec les cellules bifides, et de plus de 14 mm de diamètre lorsque c'était les surnageants concentrés issus de cultures bifides qui étaient mis en contact avec *S. aureus* et *B. cereus*.

La cinétique d'inhibition des deux germes pathogènes par les différentes souches de bifidobactéries à 37°C diffère selon qu'ils sont confrontés aux cellules probiotiques bifides elles mêmes, ou plutôt aux surnageants de leurs cultures. En effet, les surnageants concentrés des cultures bifides se sont révélés plus efficaces et plus rapides dans cette action antagoniste contre *S. aureus* et *B. cereus*.

En ce qui concerne l'inhibition de *S. aureus* à 37°C par les cellules bifides elles mêmes (cas des cocultures), il y a une certaine latence de 2h avant que le nombre de cellules inhibées soit multiplié par un facteur de 5 à 6 à la 4^{ème} heure de confrontation. Ce germe est, en moyenne, inhibé à 60% à la 12^{ème} heure et à 100% à la 24^{ème} heure de coculture par toutes les souches bifides.

La vitesse globale d'inhibition de *S. aureus* en coculture à 37°C avec les différentes souches bifides calculée dans un intervalle de 22h (entre $t_1 = 2h$ et $t_2 = 24h$) est respectivement de 4.44, 4.43, 4.40 et 4.41 h⁻¹ pour Bbv1, Bbv2, BLE et BLR. Cependant, cette vitesse d'inhibition est variable selon la durée et le moment du contact cellulaire entre les deux types de germes.

Le pouvoir inhibiteur des surnageants concentrés de cultures de bifidobactéries sur *S. aureus* à 37°C se fait fortement sentir sans latence puisque plus de 5% des cellules pathogènes sont tuées dans les deux premières heures de contact et plus de 80% (pour *B. breve* : Bbv1 et Bbv2) et de 100% (pour *B. longum* : BLE et BLR) après la 12^{ème} heure.

A basse température, le pouvoir inhibiteur des surnageants concentrés des cultures bifides sur *S. aureus* est fortement réduit et étalé dans le temps puisque 48h de contact ne permettent que 60% d'inhibition en moyenne seulement.

La vitesse d'inhibition de *S. aureus* par les surnageants bifides met également en relief cette latence d'action à 6°C.

La confrontation cellulaire de *B. cereus* ATCC 9884 et des différentes souches de bifidobactéries montre qu'il existe un important antagonisme bifide qui se manifeste par des halos clairs de diamètre variable de 7 à 9.33 mm. La coculture à 37°C de ces deux germes protagonistes montre qu'après 12 h seulement de cohabitation, on a plus de 80% des cellules de *B. cereus* qui sont inhibées. Après 24h de coculture, il ne reste aucune cellule pathogène vivante.

Toujours à 37°C, les surnageants concentrés issus des cultures de bifidobactéries exercent plus d'effet et de façon plus rapide sur la viabilité de *B. cereus* qui s'annule après 12h de contact seulement. Ce sont les souches bifides BLE et BLR qui sont les plus efficaces dans cette action antagoniste.

Ainsi, la cinétique d'inhibition de *B. cereus* par les surnageants de cultures bifides à 37°C est totalement différente de celle générée par la confrontation des cellules entre elles étant donné qu'elle n'affiche pas de latence d'action aussi importante.

Par ailleurs, la vitesse d'inhibition de *B. cereus* à 37°C par les surnageants concentrés est plus élevée que celle enregistrée avec les cocultures et particulièrement au début de l'incubation.

Cette action antagoniste des surnageants bifides vis-à-vis de *B. cereus* à 37°C est fortement perturbée lorsque la température d'incubation est ramenée à 6°C. En effet, on assiste à un ralentissement considérable de cette action antagoniste qui s'étale dans le temps à tel point que même après 48h de contact, on n'atteint pas les 60% d'inhibition des cellules pathogènes.

Il semblerait que *B. cereus* résiste mieux à l'action antagoniste des surnageants à basse température, probablement en adaptant sa composition en acides gras.

Les solvants organiques tels que le formaldéhyde, le chloroforme, l'acétone, l'hexane, l'isobutanol, le méthanol et le diéthyléther n'ont aucun effet sur le pouvoir antagoniste des surnageants concentrés de cultures de bifidobactéries vis-à-vis des deux germes pathogènes testés. Ceci laisse penser que ces solvants ne dénaturent pas les substances protéiques à activité antagoniste (i.e. bactériocine-like).

Les dosages des acides organiques par HPLC a révélé que les souches bifides synthétisent plus d'acide acétique que d'acide lactique et ceci dans un rapport molaire variable de 1.74 à 1.99 ; alors que sur le plan théorique ce rapport est de 1.5 selon la voie métabolique (le bifid-shunt) empruntée par les bifidobactéries.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abee, T. (1995): Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**: 1 – 10.
- Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A., & Maqueda, M. (1998): Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4623–4626.
- Abriouel, H., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (2002): Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1473–1477.
- Adams, M. R. Et Marteau, P. (1995): On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int. Food Microbiol.* **27**: 263-264.
- Alander, M., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T. et Von Wright, A., (1997): Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies, *Lett. Appl. Microbiol.* **24**: 361– 364.
- Alouf, J.E. (2001): Pore-forming bacterial protein toxins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **257**: 1–14.
- Altemeier, W. A., Hummel, R. P., Hill, E. O. (1963): Staphylococcal enterocolitis following antibiotic therapy. *Ann. Surg.* **157**: 847–58.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I., (2005a): 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 compounds. *Food Control.* **17**(6): 454-461.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I., (2005b): Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 2—Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. *Food control.* **17**(6): 462-468.
- Anand, S. K., Srinivasan, R. A. & Rao, L. K. (1984): Antimicrobial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*-I. *Cul. Dairy Prod. J.* **11**: 6-7.
- Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A. & Valdivia, E. (2005): Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Sci.* **71**: 549–556.
- Andersson, M.A., Mikkola, R., Helin, J., Andersson, M.C., Salkinoja-Salonen, M., (1998): A novel sensitive bioassay for the detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1338–1342.
- Asano, S. I., Nukumizu, Y., Bando, H., Iizuka, T. & Yamamoto T., (1997): Cloning of Novel Enterotoxin Genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Clin. Microbiol.* **63**(3): 1054–1057.
- Audet, P., Paquin, C. & Lacroix, C. (1988): Immobilized growing lactic acid bacteria with κ -carrageenan-locust bean gum gel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**:11-18.
- Aumaitre, H., Lecaillon, E., Ollivier, S. & Bouchaud, O. (2004) : Diarrhées bactériennes. *EMC-Chirurgie.* **1**: 437–454.
- Avonts, L., Van Uytven, E. & De Vuyst, L. (2004): Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *Int. Dairy J.* **14** : 947–955

- Baba T. & Schneewind O. (1998): Instruments of microbial warfare: bacteriocin synthesis, toxicity and immunity. *Trends In Microbiol.* **6** (2): 66-71
- Bacquero, F. E. & Moreno, F. (1984): The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**: 117- 124.
- Bartlett, J. G. (2002): Antibiotic-associated diarrhea. *N. Eng. J. Med.* **346**: 334–339.
- Baynes, R. E. & Hodgson, E. (2004): Absorption and Distribution of Toxicants. In A textbook of modern toxicology. Third edition. Edited by Ernest Hodgson: A John Wiley & sons, inc., publication. 557 pages. pp: 77-148.
- Bean, N. H., Goulding, J. S., Lao, C., & Angulo, F. J. (1996): Surveillance for foodborne-disease outbreaks – United States, 1988–1992. *Morbidity and Mortality Weekly Report (SS-5)*. **45**: 1–66.
- Beecher, D. J., & Wong, A. C. L. (1997): Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interaction and model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *J. Biol. Chem.* **272**: 233–239.
- Beerens, H., Hass Brac De La Perriere, B., Gavini, F., (2000): Evaluation of the hygienic quality of raw milk based on the presence of bifidobacteria: the cow as a source of faecal contamination. *Int. J. Food Microbiol.* **54**: 163–169.
- Bello, F.D., Walter, J., Hertel, C. & Hammes, W.P. (2001): *In vitro* study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from Lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**: 232– 237.
- Berche, P. (2002) : Bactériologie générale. Faculté de médecine NECKER, enfants malades. P.C.E.M.2. 89 pages.
- Bernet, M. F., Brassart, D. & Neeser, J. R. (1994): *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell-attachment and cell-invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* **35**:483–9.
- Besnier, M. O., Bourlioux, P., Fourniat, J., Ducluzeau, R. & Aumaitre, A., (1983): Influence de l'ingestion de yogurt sur l'activité lactasique intestinale chez des souris axéniques ou holoxéniques. *Ann. Microbiol.* **134**: 219-230.
- Beviellacqua, L., Ovidi, M., Di Mattia, E., Trovatielli, L. D., & Canganella, F. (2003): Screening of *Bifidobacterium* strains isolated from human faeces for antagonistic activities against potentially bacterial pathogens. *Microbiol. Res.* **158**: 179-85.
- Bhugaloo, P., Dousset, X., Metivier, A., Sorokine, O., Anglade, P., Boyaval, P. & Marion, D. (1996): Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4410–4416.
- Bhunja, A., Johnson, M. C. & Ray, B. (1988): Purification, characterisation and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* **65**: 261-268.
- Biavati, B., Soni, T., Mattarelli, P. & Trovaletti, L. D. (1992): Survival of bifidobactérie from human habitat in acidified milk. *Microbiologica.* **15**(2): 197-200.
- Bielecka, M., Biedrzyck, E., Sloragiewicz, Z. & Smieszek M. (1998): Interaction of *Bifidobacterium* and *Salmonella* during associated growth. *Int. J. Food. Microbiol.* **45**: 151-155.
- Blanchette, L., Roy, D. Bélanger, G., et Gauthier, F. S. (1996): Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobactena. *J. Dairy Sci.* **79**: 8-15.
- Bogovic-Matijasic, B. & Rogelj, I. (1998): Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221–production studies in MRS–media at different pH–values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Process Biochem.* **33**: 345–52.

- Bogovic-Matijasic, B., & Rogelj, I. (2000):** *Lactobacillus* K7—A new candidate for a probiotic strain. *Food Technol. Biotechnol.* **38**: 113–119.
- Bolduc, M. P., Raymond, Y., Fustier, P., Champagne, C. P. & Vuilleumard J. C. (2006):** Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk. *Int. Dairy J.* **16**: 1038–1048.
- Bouhnik, Y. (1993):** Survie et effets chez l'homme des bactéries ingérées dans les laits fermentés. *Le Lait.*: **73**: 241-247.
- Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F. & Braesco, V. (2003):** The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine". *Am. J. Clin. Nutr.* **78**: 675-683.
- Bourgeois, C. & Larpent, J. P. (1996):** Les bactéries lactiques in Microbiologie alimentaire, Tome 2 Aliments fermentés et fermentations alimentaires, 2^e édition. *Lavoisier édition*. 523 pages. pp 1–33.
- Bovee–Oudenhoven I., Termont D. & Dekker R. (1996):** Calcium in milk and fermentation by yogurt bacteria increases the resistance of rats to *Salmonella* infection. *Gut.* **38**: 59-65.
- Brown, A. C. & Valiere, A. (2004):** Probiotics and medical nutrition therapy. *Nutr. Clin. Care.* **7**: 56–58.
- Bryan, F. L. (1988):** Risk associated with vehicles of foodborne pathogens and toxins. *J. Food Protec.* **51**: 498–508.
- Buchman, G. W., Banerjee, S. & Hanson. J. N. (1988):** Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* **263**: 16260-16266.
- Chaalet, A. (2005) :** Antagonisme de quelques souches de bifidobactéries vis-à-vis de *S. paratyphi* A et *E. coli* entéropathogène. Mémoire de magister de l'université de Mostaganem. 164 pages.
- Champagne, C. P., Lacroix, C. & Sodini-Gallot, I. (1994):** Immobilized cell technology for the dairy industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* **14**:109-134.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (2000):** Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt-tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolates. *J. Food Prot.* **63(10)**: 1369–1376.
- Chick, G. Alnot, J.-Y. & Silbermann-Hoffman O. (2001):** benign solitary tumors of the peripheral nerves. *J. Bone Joint. Surg. Br. Proceedings.* **84-B**: 28 - 29.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Fernandez, M. F. & Hernandez, P. E. (1998):** Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and food borne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* **15**: 289–298.
- Cocconier, M. H., Lievin, V., Hemery, E. & Servin A. L. (1998):** Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl. and Environ. Microbiol.* **64(11)**: 4573-4580.
- Coffey, A., Ryan, M., Ross, R. P., Hill, C., Arendt, E., & Schwarz, G. (1998):** Use of a broad-host-range bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* transconjugant as an alternative starter for salami manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* **43**: 231-235.
- Collado, M.C., Gonzalez, A., Gonzalez, R., Hernandez, M., Ferrus, M.A., Sanz, Y., (2005):** Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrobial Agents.* **25**: 385–391.
- Collado, M. C. & Sanz, Y. (2006):** Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human feces based on their acid-adaptation ability. *J. Microbiological Methods.* **66**: 560–563.

- Collins, J. K., Thornton, G. Et Sullivan, G. O. (1998): Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.* **8**: 487-490.
- Collins, J. K. Et Gibson, G. R. (1999): Probiotic, prebiotic and symbiotics : Approches for modulating the microbiol ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 1052S-1057S.
- Collins, J. K., Dunne, C., Murphy, L., Morrissey, D., O'mahony, L., O'sullivan, E., Fitzgerald, G., Kiely, B., O'sullivan, G., Daly, C., Marteau, P., & Shanahan, F. (2002): A randomized controlled trial of a probiotic *Lactobacillus* strain in healthy adults: assessment of its delivery, transit and influence on microbial flora and enteric immunity. *Microbial. Ecol. Health Dis.* **14**: 81-89.
- Conway P.L., Gorbach S.L., Goldin B.R., (1987): Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* **70**: 1-12.
- Cope, W. G., Leidy, R. B. & Hodgson, E. (2004): Classes of Toxicants: Use Classes. In A textbook of modern toxicology. Third edition. Edited by Ernest Hodgson: A John Wiley & Sons, Inc., publication. 557 pages. pp: 40-74.
- Cribier, B., Piemont, Y. & Grosshans, E. (1984): Staphylococcal scalded skin syndrome in adults. *J. Am. Acad. Dermatol.* **30**. 319-324.
- Crociani, F., Biavati, B., Alessandrini, A., Chiarini, C. et Scardovi, V. (1996): *Bifidobacterium inopatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 564-571.
- Curk, M. C., Bringel, F. and Hubert, J. C. (1994): Characterization of lactobacilli by Southern-type hybridization with a *Lactobacillus plantarum* pyrDFE probe. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**: 588- 592.
- Daeschel, C. F. & Klaenhammer, T. R. (1985): Association of 13.6- megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1538-1541.
- Daeschel, M. A. (1989): Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* **43**: 164- 166.
- Dambekodi P.C., Gilliland S.E., (1998): Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.* **81**: 1818-1824.
- Damm M, Quante G, Jurk T, (2004): Nasal colonization with *Staphylococcus aureus* is not associated with the severity of symptoms or the extent of the disease in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* **131**: 200–206.
- Dave, R. I., Shah, N. P. (1997): Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Int. Dairy J.* **7**: 31-41.
- Davidson, G.P. Butler, R.N. (2000): Probiotics in gastrointestinal disorders. *Curr. Opin. Pediatr.* **12**: 477–481.
- De Kwaadsteniet, M. Todorov, S.D. Knoetze, H. & Dicks, L.M.T. (2005): Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **105**: 433– 444.
- De Man, J. C., Rogosa, M. & Sharpe, M. E. (1960): A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130-135.
- De Martinis, E.C.P. & Freitas F.Z. (2003): Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. *Food Control.* **14**: 197–200.
- De Villiers V., (1995): The effect of lactose maldigestion on the stools of young Tswana children. *J. Trop. Pediatr.* **41**: 54-56.
- De Vuyst, L. & Vandamme, E. J. (1994): Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. Bacteriocins Lactic acid bacteria ed. De Vuyst, L. and E. J. Vandamme. London : Blackie Academic & Professional. pp : 91-128.

- De Vuyst, L., Avonts, L., & Makras, L. (2004):** Probiotics, prebiotics and gut health. In C. Remacle, & B. Reusens (Eds.), Functional foods, ageing and degenerative disease (1st ed) (pp. 416–482). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.
- De Vuyst, P. Dumortier, P. Swaen, G. M. Pairon, J. C. & Brochard. P. (1996):** Respiratory health effects of man-made vitreous (mineral) fibres. *Eur. Respir. J.* **8**: 2149 - 2173.
- 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.
- Delcenserie V., Bechoux N., China B., Daube G., & Gavini F. (2005):** A PCR method for detection of bifidobacteria in raw milk and raw milk cheese : comparison with culture-based methods. *J. Microbiol. Methods.* **61**: 55-67.
- Delcenserie, V., Gavini, F., Beerens, H., Tresse, O., Franssen, C. & Daube, G. (2007):** Description of a new species, *Bifidobacterium crudilactis* sp. nov., isolated from raw milk and raw milk cheeses. *Sys. Appl. Microbiol.* Article in press.
- Delmee, M. (2003):** Microbiologie alimentaire. Université Catholique de Louvain Faculté de Médecine. 176 pages.
- Delves-Broughton, J. (1990):** Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* **44**: 100-117.
- Desjardins, M.-L., Roy, D. & Goulet, J. (1990):** Growth of bifidobacteria and their enzyme profile. *J. Dairy Sci.* **73**:299-307.
- Dicks, L. M. T., Dellaglio, F. & Collins, M. D. (1995):** Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 395– 397.
- Donkor, O.N. Henriksson, A. Vasiljevic, T. and Shah N.P. (2006):** Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *Int. Dairy J.* **16**: 1181–1189.
- Donnet-Hughes, A., Rochat, F., Serrant, P., Aeschlimann, J. M., & Schiffrin, E. J. (1999):** Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J. Dairy Sci.* **82**: 863-869.
- Drouault, S. & Corthier, G. (2001) :** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet. Res.* **32**: 101–117.
- Dubey, U. K. & Mistry, V. V. (1996):** Growth Characteristics of Bifidobacteria in Infant Formulas. *J. Dairy Sci.* **79**:1146-1155.
- Duffes, F., Corre, C., Leroi, F., Dousset, X., & Boyaval, P. (2000):** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *J. Food Prot.* **62**(12): 1394–1403.
- Dykes, G. A., (1995):** Bacteriocins: ecological and evolutionary significance. *Tree.* **10** (5): 186-189.
- Ehling-Schulz, M., Fricker M. & Scherer S. (2004):** *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol. Nutr. Food Res.* **48**: 479 – 487.
- Eijsink, V. G., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B. & Nes, I. F. (1998):** Comparative studies of Class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3275–3281.
- Eklund, T. (1984):** The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *Int. J. Food Microbiol.* **1**: 179–185.
- Elliott, S. N., Buret, A., Mcknight, W., Miller, M. J. Et Wallace, J. L. (1998):** Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats. *Am. J. Physiol.* **275**: G425–G432.

- Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Assobhei, O., Hasselmann, C., (1998): Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *J. Appl. Bacteriol.* **85**: 521– 526.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., & Ishizaki, A., (2000): Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 85–106.
- Eraso, A. J., & Ines, A. (2004): Bacteriocin of *Enterococcus* from lactoserum able to cause oxidative stress in *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **314**: 897–901.
- Erickson, K. L. & Hubbard, N. E. (2000): Probiotic immunomodulation in health and disease. *J. Nutr.* **130**(2): S403–S409.
- Erkkila, S., & Petaja, E. (2000): Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Sci.* **55**: 297–300.
- Euzéby, J. P. Hoyles, L. Kämpfer, P. Oren, A. Saddler, G. S. Trüper, H. G. and Tindall B. J. (2005): List of Changes in Taxonomic Opinion: making use of the new lists. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1429 - 1430.
- Faith, U. J., Skvinky, R.E., Gilson, L, Mahanty, H. K., Koiter, R. (1992): The secretion of the colicin V, pp. 331-348. Dans: James, R., Lazdunski, C.? Pattus. F. (eds), *Bacteriocins, microcins. and lantibiotics*. Spnnger-Verlag, New York.
- Farber, J. M. (1991): Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology—a review. *J. Food Prot.* **54**: 58–70.
- Felley, C, Michetti, P. (2003): Probiotics and *Helicobacter pylori*. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **17**: 785–91.
- Finlay, W.J., Logan, N.A., Sutherland, A.D., (2000): *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Let. Appl. Microbiol.* **31**: 385– 389.
- Fleming, H. P., Etchells, J. L. & Costilow, R. N. (1975): Microbial Inhibition by an Isolate of *Pediococcus* from Cucumber Brines. *Appl. Microbiol.* **30**(6): 1040-1042.
- Floret, D. (2001): Aspects cliniques des syndromes toxiques streptococcique et staphylococcique. *Archives de Pédiatrie.* **4**(8): 762–768.
- Folli, C., Ramazzina, I., Arcidiaco, P., Stoppini, M., Berni, R., (2003): Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. *FEMS Microbiol. Let.* **221**: 143-149.
- Fooks, L.J., Fuller, R. & Gibson, G.R. (1999): Prebiotics, probiotics and human gut. *Microbiol. Int. Dairy J.* **9**: 53-61.
- Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2002): In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.* **39**: 67–75.
- Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2003): Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. *Anaerobe.* **9**: 231–242.
- Fredericq, P. (1948): Actions antibiotiques réciproques chez les *Enterobacteriaceae*. *Rev. Belge Pathol. Med. Exp.* **19** (4): 1-10.
- Fredericq, P. (1957): Colicins. *Ann. Rev. Microbiol.* **11**: 7-22.
- Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-378.
- Fuller R & Gibson G. R., (1997): Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand. J.Gastroenterol.* **32. Suppl.** **222**: 28-31.
- Fueyo, J. M., Mendoza, M. C., Alvarez, M. A. & Martin M. C. (2005): Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. *FEMS Microbiol. Let.* **243**: 447–454.

- Gagnon, M., Kheadr, E. E., Le Blay, G., & Fliss, I. (2004): In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *Int. J. Food Microbiol.* **92**: 69-78.
- Galvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (1989): Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against Gram-positive and Gram-negative bacteria and other organisms. *Res. Microbiol.* **140**: 57-68.
- Galvez, A., Valdivia, E., Abriouel, H., Camafeita, E., M!Endez, E., Martinez-Bueno, M., Maqueda, M., (1998): Isolation and characterization of enterocin EJ 97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ 97. *Arch. Microbiol.* **171**: 59-65.
- Garcia, M.T., Ben Omar, N., Lucas, R. Perez-Pulido, R. Castro, A. Grande, M.J. Martinez-Canamero, M. Galvez A. (2003): Antimicrobial activity of enterocin EJ97 on *Bacillus coagulans* CECT 12. *Food Microbiol.* **20** : 533-536.
- Garrrity, G. M., Johnsson, K. L., Bell. J. & Searles, D. B. (2002): Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Second edition.
- Garneau, S., Martin, N. I., & Vederas, J. C. (2002): Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie.* **84**: 577-592.
- Garro, M. S., De Valdez, G. F. & De Giori, G. S. (2004): Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. *Food Microbiol.* **21**: 511-518.
- Gavini, F., Pourcher, A. M., Bahaka, D., Freney, J., Romond, C. & Izar, D., (1990): Classification, identification, aspect critique. *Med. Mal. Infect.* **20**:53-62.
- Gavini, F., Pourcher, A. M., Neut, C., Monget, D., Romond, C., Oger, C., Izard, D., (1991): Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origins. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 548-557.
- Gavini, F. & Beerens, H., (1999): Origin and identification of bifidobacteria strains isolated from meat and meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **46**: 81- 85.
- Gibson, G.R. & Wang, X. (1994): Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 412-420.
- Gilbert, R. J. (1979): *Bacillus cereus* gastroenteritis, p. 495. In H. Reimann and F. L. Bryan (ed.), Food-borne infections and intoxications, 2nd ed. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- Gill, H. S. & Rutherford, K. J. (2001): Viability and dose-response studies on the effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* in mice. *Br. J. Nutr.* **86**: 285-289.
- Gilliland, S.E., (1990): Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 175-188.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Helwig, U., Venturi, A., Lammers, K. M., Brigidi, P., Vitali, B., Poggioli, G., Miglioli, M., & Campieri, M. (2003): Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterol.* **124**: 1202-1209.
- Gionchetti, P., Amadini, C., Rizzello, F., Venturi, A. & Campieri, M., (2002): Review article: treatment of mild to moderate ulcerative colitis and pouchitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16** (4): 13- 19.
- Goldin, B. R., Swenson, L., Dwyer, J., Sexton, M., Gorbach, S. L., (1980): Effects of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. *J. Natl. Cancer Inst.* **64**: 255- 261.
- Gonzalez, S., Albarracin, G. & Locosio, P. M. (1990): Prevention of infantile diarrhoea by fermented milk. *Microbial. Aliment. Nutr.* **8** : 349-54.

- Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., & Gill, H. S. (2001): *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* **67**: 207–216.
- Gorbach, S. L. (2002): Probiotics in the third millennium. *Dig. Liver Dis.* **34** (2): S2-S7.
- Graham, D. C. & McKay, L. L. (1985): Plasmid DNA in strains of *Pediococcus cereviceae* and *Pediococcus pentosaceus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 532-534.
- Grande, M. J. Lucas, R. Abriouel, H. Valdivia, E. Omar, N. B. Maqueda, M. Martinez-Bueno, M. Martinez-Canamero, M. Galvez, A. (2006): Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* **106** : 185 – 194.
- Granum, P.E., Brynestad, S. & Kramer, J.M. (1993): Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int. J. Food Microbiol.* **17**: 269–279.
- Granum, P. E., & Lund. T. (1997): *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**: 223–228.
- Gratia, A. (1925) : Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **93**: 1040-1041.
- Gravet, A., Rondeau, M., Harf-Monteil, C., Grunenberger, F., Monteil, H., & Scheftel, J. M. (1999): Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LukE-LukD. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 4012–9.
- Green, D.H., Wakeley, P.R., Page, A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Ricca, E., Cutting, S.M., (1999): Characterization of two *Bacillus* Probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4288–4291.
- Groboillot, A., Boadi, D. K., Poncelet, D. & Neufeld, R. J. (1994): Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* **14**:75-107.
- Guarner, F., & Malagelada, J. R. (2003): Gut flora in health and disease. *Lancet.* **361**: 512–519.
- Guilliams T. G., (1999): Healthy microbial organisms. *J. Appl. Bacteriol.* **2**: 1-7.
- Guiraud, J. P. (1998) : Microbiologie alimentaire. Dunod. 654 pages.
- Haggbloom, M.M., Apetroaie, C., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., (2002): Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2479–2483.
- Hamilton-Miller, J. M. T. (2003): The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int J Antimicrob Agents.* **22**: 360-366.
- Hara E., Yazawa K., Nakamura, H. & Tamura Z. (1978): Interaction between *Bifidobacterium bifidum* N4 and *Escherichia coli* K-12 in their mixed cultures. *J. Nutr. Sci.Vitaminol.* **24**(6): 569-79.
- Hechard, Y., Jayat, C., Letellier, F., Julien, R., Cenatiempo, Y. & Ratinaud, M.H. (1992): On-line visualization of the competitive behavior of antagonistic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3784–3786.
- Hechard, Y. & Sahl, H. (2002): Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie.* **84**: 545–557.
- Hekmat S. & McMahon D. J. (1992): Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in Ice Cream for Use as a Probiotic Food. *J. Dairy Sci.* **75**: 1415 - 1422.
- Heenan, C. N., Adams, M. C., Hosken, R. W. & Fleet, G. H. (2004): Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *Lebensm.-Wiss. U.-technol.* **37**: 461-466.

- Hills, B.P., Manning, C.E., Ridge, Y.P., Brocklehurst, T.F., (1997): Water availability and the survival of *Salmonella typhimurium* in porous systems. *Int. J. Food Microbiol.* **36**: 187–198.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., & Schillinger, U. (2001): Taxonomy and important features of microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 365S - 373S.
- Hoover, D. G. & Steenson (1993): bacteriocin of lactic acid bacteria. Academic Press, New York, NY.
- Howell, T.H. Fiorellini, J.P. Blackburn, P. Projan, S.J. De La Harpe, J. Williams, R.C. (1993): The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. *J. Clin. Periodontol.* **20**: 335–339.
- Hoyles, L., Inganas, E., Falsen, E., Drancourt, M., Weiss, N., McCartney, A. L. & Collins M. D. (2002): *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human Sources. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **52**: 995–999.
- Huang, C. & Huang, C. J. (1997): Production of yoghurt by Bifidobacteria- (m) flavor components of yoghurt. *J. Taiwan Lives. Res.* **30**:135-141.
- Huet, F., Lachambre, E., Beck, L., Van Egroo L.-D. & Sznajder, M. (2006) : Évaluation d'une préparation pour nourrissons à teneur réduite en protéines et enrichie en probiotiques, en relais de l'allaitement maternel. *Archives de pédiatrie.* **13(10)**: 1309-1315.
- Hugas, M. (1998): Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation of Meat and Meat Products. *Meat Sci.* **49(1)**: S139-S150.
- Hugues, D. B. & Hoover, D. G. (1991): Bifidobacteria: Their potential for use in American dairy products. *Food Technol.* **67** : 74-83.
- Huis In't Veld, J. H. J., Havenaar, R. Et Marteau, P. (1994): Establishing a scientific basis for probiotic R&D. *Trends in Biotechnol.* **12(1)**: 6-8.
- Hurst, A. & Paterson. G. M. (1971): Observations on the conversion of an inactive precursor protein to the antibiotic nisin. *Can. J. Microbiol.* **17**: 1379- 1383.
- Ibrahim, S., & Bezkorovainy, A. (1993): Inhibition of *Escherichia coli* by bifidobacteria. *J. Food Protec.* **56**: 713–715.
- Imhof, R., Glattli, H., & Bosset, J. O. (1995): Volatile organic compounds produced by thermophilic and mesophilic single strain dairy starter cultures. *Lebensrn.-Wiss. Technol.* **28**: 78-86.
- Isolauri, E. Arvola, T. Sutas, Y. Moilanen, E. Salimen, S. (2000): Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin. Exp. Allergy* **30**: 1605–1610.
- Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpaa, P., Arvilommi, H., & Salminen, S. (2001): Probiotics effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* **73(2)**:S444–50.
- Iwana, H., Masuda, H., Fujisawa, T., Suzuki, H. & Mitsuoka, T. (1993): Isolation and identification of Bifidobacterium spp. In commercial yoghurt sold in Europe. *Int. Dairy J.* **12**: 39–45.
- Jaaskelainen, E.L., Haggblom, M. M., Andersson, M. A. & Salkinoja-Salonen, M.S. (2004): Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food. *Int. J. Food Microbiol.* **96**: 75– 83.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. & Ray, B. (1995): Bacteriocins of Gram positive bacteria. *FEMS Microbiological.* **59**: 171-200.
- Jain, P. K. McNaught, C. E. Anderson, A. D.G. MacFie, J. Mitchell C. J. (2004): Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. *Clin. Nutr.* **23** : 467–475.

- Jaquette, C. B. & Beuchat, L. R. (1998):** Combined effects of pH, nisin, and temperature in growth and survival of psychrotrophic *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.* **61**: 563–570.
- Jamuna, M., Babusha, S.T. & Jeevaratnam K. (2005):** Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocins from *Lactobacillus* isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems. *Food Microbiol.* **22**: 449–454.
- Janer, C., Pelaez, C. & Requena, T. (2004):** Caseinomacropeptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. *Food chemistry.* **86**: 263–267.
- Jeandel, C., Laurain, M. C. & Decottignies F. (1996):** Diarrhées infectieuses du sujet âgé. *Rev. Prat.* **46**: 184–188.
- Jennifer Cleveland A, Thomas J. Montville A, Ingolf F. Nes B, Michael L. Chikindas (2001):** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71** : 1–20
- Jydegaard, A., Gravesen, A. & Knochel, S., (2000):** Growth conditionrelated response of *Listeria monocytogenes* 412 to bacteriocin inactivation. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**: 68– 72.
- Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S., & Arvilommi, H. (1992):** Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr. Res.* **32** : 141-144.
- Kalambaheti, T., Cooper, G. N., & Jackson, G. D. F. (1994):** Role of bile in non-specific defence mechanisms of the gut. *Gut.* **35**: 1047– 1052.
- Kaltenbach, G., Gravet, A., Heitz, D., Noblet-Dick, M., Prevost, G. & Monteil, H. (2003):** Comparaison des caractéristiques des diarrhées postantibiotiques à *Clostridium difficile* et à *Staphylococcus aureus*. *Presse Med.* **24(1)** : 129s-135s.
- Kaltenbach, G. & Heitz, D. (2004):** Diarrhées associées aux antibiotiques chez le sujet âgé. *La revue de médecine interne.* **25**: 46–53
- Kim, H. S. (1988):** Characterization of lactobacilli and bifidobacteria as applied to dietary adjuncts. *Cult. Dairy Prod. J.* **23**:6-9.
- Kim, W. S., Hall, R. J. & Dunn, N. W. (1997):** The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **50**: 429–33.
- Klaenhammer, T. R. (1988):** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**: 337-349.
- Klaenhammer, T. R. (1993):** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological.* **12**: 39-44.
- Klaenhammer, T.R., Kullen, M.J., (1999):** Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **50**: 45– 57.
- Kneifel, W., Jaros, D., & Erhard, F. (1993):** Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt-related products fermented with commercially available starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **18**: 179- 189.
- Kodama, T., Santo, T., Yokoyama, T., Takesue, Y., Hiyama, E. & Imamura, Y. (1997):** Postoperative enteritis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Surg Today.* **27**: 816–25.
- Koponen, O., Takala, T. M., Kilpelainen, N. & Saris. P. E. (1998):** Dual function of NisI, an immunity protein lipoprotein at the membrane surface and a factor stimulating nisin activity in the soluble form. Third International Workshop on Lantibiotics. *Blaubeuren.* pp: 29-32.
- Kullen, M. J ., Amann, M. A., O'shaughnessy, M. J., O'sullivan, D. J., Busta, F. F. Et Brady, L. J. (1997):** Differentiation of ingested and endogenous bifidobacteria by DNA fingerprinting demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. *J. Nutr.* **127**: 89-94.

- Ladhani, S. & Evans, R.W. (1998): Staphylococcal scalded skin syndrome. *Arch. Dis. Child.* **78**: 85-88.
- Ladhani, S. (2003): Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **39**: 181-189.
- Lash, B. W., Mysliwiec, T. H. & Gourama H. (2005): Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiol.* **22**: 199–204.
- Lasagno, M. Beoleto, V. Sesma, F. Raya, R. Font, D. Eraso, A.J. (2002): Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment. *New Microbiol.* **25**: 37–44.
- Laukova, A. Czikkova, S. Dobransky, T. & Burdova, O. (1999): Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM4231 in milk products. *Food Microbiol.* **16**: 93-99.
- Le Leu, R. K., Brown, I. L., Hu, Y., Bird, A. R., Jackson, M., Esterman, A. & Young, G. P., (2005): A Symbiotic combination of resistant starch and *Bifidobacterium lactis* facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. *J. Nutr.* **135**: 996 - 1001.
- Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003): *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Gen. Mol. Res.* **2**: 63–76.
- Lee, Y. K. & Salminen, S. (1995): The coming of age of probiotics. *Trends in Food Sci. Technol.* **6**: 241 -245.
- Lerebours, E., Ndam, N. C., Lavoine, A., Hellot, M. F., Antoine, J. M. & Colin, R., (1989): Yogurt and fermented-then-pasteurized milk: effect of shortterm and long-term ingestion on lactose absorption and mucosal lactase activity in lactase-deficient subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **49**: 823-827.
- Leverrier, P., Fremont, Y., Rouault, A., Boyaval, P. & Jan. G. (2005): *In vitro* tolerance to digestive stresses of propionibacteria: influence of food matrices. *Food Microbiol.* **22**: 11–18
- Liévin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J.R. & Servin A. (2000): Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* .**47**: 646–652.
- Linaje, R., Coloma, M. D., Perez-Martinez, G., & Zuniga, M. (2004): Characterization of faecal *Enterococci* from rabbits for the selection of probiotic strains. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 761-771.
- Lindgren, S. W., & Dobrogosz, W. J. (1990): Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 149-164.
- Lindwall, S., Fonden, R., (1984): Passage and survival of *L. acidophilus* in the human gastrointestinal tract. *Annu. Bull. Int. Dairy Fed.* **21**: 179 - 182.
- Lo, P. R., Yu, R. C., Chou, C. C. & Huang, E. C. (2004): Determinations of the antimutagenic activities of several probiotic bifidobacteria under acidic and bile conditions against benzo[a]pyrene by a modified Ames test. *Int. J. Food Microbiol.* **93**: 249– 257.
- Lourens-Hattingh, A., & Viljeon, C. B. (2001): Yoghurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.* **11**: 1–17.
- Lücke, F. K. (2000): Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science.* **56**: 105-115.
- Macfarlane, S. & Macfarlane G. T. (2003): Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings Nutr. Society.* **62**: 67-72.
- Mackay, V. C., Arendse, G. & Hastings J. W. (1997): Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.* **34**: 1-16.

- Mackie, R. I., Sghir, A. & Gaskins, H. R. (1999): Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 1035S-1045S.
- Madsen K, Cornish A, Soper P, Mckaigney C, Jijon H, & Yachimec C, (2001): Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterol.* **121**: 580– 591.
- Mainville, I. Arcand, Y. & Farnworth, E.R. (2005): A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **99**: 287– 296.
- Makras, L. & De Vuyst L. (2006): The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *Int. Dairy J.* **16**: 1049–1057.
- Margolles, A., Clara G. and Reyes-Gavilán D. (2003): Purification and Functional Characterization of a Novel α -L-Arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667. *Appl. Envir. Microbiol.* **69**: 5096 - 5103.
- Marteau, P., Flourie, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J. F. & Rambaud, J. C., (1990): Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Br. J. Nutr.* **64**: 71-79.
- Marteau, P. Pochart, P., Bouhnik, Y., Zidi, S., Goderel, L., Rambaud, J. C. (1992): Survie, dans l'intestin grêle de *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium* sp, ingérés dans un lait fermenté. *Gastroentérologie Clinique et Biologique.* **16**: 25-28.
- Marteau, P., Pochart, P., Bouhnik, Y. And Rambaud, J.C. (1993): Fate and effects of some transiting microorganisms in the human gastrointestinal tract. *World Rev. Nutr. Diet.* **74** : 1-21.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., & Huis Int Veld, J. H. J. (1997): Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of stomach and small intestine: validation and the effect of bile. *J. Dairy Sci.* **80**: 1031–1037.
- Marteau P., & Rambaud J.C., (1998): Probiotiques en gastroentérologie: bases rationnelles, effets démontrés et perspectives. *Hepato-Gastroenterology.* **4** : 267-273.
- Marteau, P., & Shanahan, F. (2003): Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **17**: 725-740.
- Martinez, R. C. R. & De Martinis E. C. P. (2005): Antilisterial activity of a crude preparation of *Lactobacillus sakei* 1 bacteriocin and its lack of influence on *Listeria monocytogenes* haemolytic activity. *Food Control.* **16**: 429–433.
- Masco, L., Huys, G., De Brandt, E., Temmerman, R., Swings, J., (2005): Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **102**: 221–230.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H. & Metaxopoulos, J. (2003): Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2°C. *Food Microbiol.* **20**: 259–265.
- Mathot, A. G., Beliard, E. & Thuault, D. (1996): Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques in Microbiologie alimentaire, Tome 2 Aliments fermentés et fermentations alimentaires, 2^e édition. Lavoisier édition. 523 pages. pp 432 – 453.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., & Oyaizu, H. (1998): Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA targated specie's -and group-specific primers. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**: 113-121.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M. & Oyaizu, H. (1999): Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA –

- gene- targeted species specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4506 – 4512.
- Matto, J., Alakomi H. L., Vaari A., Virkajarvi, I. & Saarela, M., (2006):** Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *Int. Dairy J.* **16**: 1029–1037
- Mcauliffe, O., ROSS, R. P. & HILL, C. (2001):** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 285-308.
- Meile, L., Ludwig, W., Rueger, U., Gut, C., Kaufmann, P., Dasen, G., Wenger, S., & Teuber, M. (1997):** *Bifidobacterium lactis* Sp. Nov., A Moderately Oxygen Tolerant Species isolated from fermented milk. *System. Appl. Microbiol.* **20**: 57-64.
- Midolo, M. L., Lambert, J. R., Hull, R., Luo, F. & Grayson, M. L. (1995):** In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **79** (4): 475-479.
- Millette, M., Le Tien, C., Smoragiewicz, W. & Lacroix, M. (2007):** Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modiWed alginate Wlms and beads. *Food Control* **18**: 878–884.
- Mimura, T., Rizzello, F., Helwig, U., Poggioli, G., Schreiber, S., Talbot, I. C., Nicholls, R. J., Gionchetti, P., Campieri, M., & Kamm, M. A. (2004):** Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut.* **53**: 108-114.
- Misra, A.K., Kuila, R.K., (1992):** Use of *Bifidobacterium bifidum* in the manufacture of bifidus milk and its antibacterial activity. *Lait.* **72**: 213–220.
- Modler, H. W., Mckellar, R C., & Yaguchi, M. (1990):** Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Canad. Inst. Food. Sci. Technol. J.* **23**: 29-41.
- Molkhou, P., (2004) :** Atopie maternelle et sensibilisation précoce. Rôle du lait maternel. *J. pédiatrie et de puériculture.* **17** : 267–272.
- Moll, G., Ubbink-Kok, T., Hauge, H. H., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F. & Konings, W. N. (1996):** Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two-component bacteriocin. *J. Bacteriol.* **178**: 600– 605.
- Murti, F. W., Roger, S., Bouillanne, C., Landon, M., & Desnazeaud, M. (1992):** Croissance de *Bifidobacterium* sp CNRZ 1494 dans l'extrait de soja et le lait de vache. Effets sur des composés aromatiques. *Sci. Aliments.* **12**: 429-439.
- Muthukumarasamy, P. & Holley, R. A. (2007):** Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* **24**: 82–88
- Nagengast, F. M., Hectors, M. P. C., Buys, W. A. M., & Van Tongeren, J. H. M. (1988):** Inhibition of secondary bile acid formation in large intestine by lactulose in healthy subjects of two different age group. *Eur. J. Clin. Inves.* **12**: 1851-1861.
- Nebra, Y., Bonjoch, X., Blanch, A., (2003):** Use of *Bifidobacterium dentium* as an indicator of the origin of fecal water pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2651–2656.
- Noh, D. O. & Gilliland, S.E. (1995):** Influence of bile on β -galactosidase activity of component species of yogurt starter cultures. *J. Dairy Sci.* **77**: 3532-3537.
- Noriega, L., Gueimonde, M., Alonso, L. & De Los Reyes-Gavilan C. G. (2003):** Inhibition of *Bacillus cereus* growth in carbonated fermented bifidus milk. *Food Microbiol.* **20**: 519–526.
- Noriega, L., Cuevas, I., Margolles, A., & De Los Reyes-Gavilan C. G. (2006):** Deconjugation and bile salts hydrolase activity by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile. *Int. Dairy J.* **16**: 850–855

- Noterman, S., Dufrenne, J. And Land, B. M., (1990): Botulism risk of refrigerated processed foods of extended durability. *J. Food Prot.* **53**: 195-224.
- Oakey, H.J., Harty, D.W .S. & Knox, K.W. (1995): Enzyme production by lactobacilli and the potential link with infective endocarditis. *J. Appl. Bacteriol.* **78**(2): 142-148.
- Oeding, P. & Austarheim, K. (1954): The occurrence of staphylococci in the intestinal content after treatment with antibiotics. *Acta Pathol Microbiol Scand.* **35**: 473–83.
- Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Takahashi, M., Watanuki, M., Tanaka, R., Tanaka, T., Hamabata, T., Yamasaki, S. & Takeda, Y. (2001): Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing bacteria can be apply against Shiga toxin-producing bacteria, including *Escherichia coli* 0157:H7 infection in infant rabbits. *Infect Immun.* **69**: 1101–1108.
- Ongawa, T. (2002): Staphylococcal α -toxin synergistically enhances inflammation caused by bacterial components. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **33**: 15-21.
- O'Riordan, J. L And Fitzgerald, F. (1998): Antisense inhibition of vitamin D receptor expression induces apoptosis in monoblastoid U937 cells. *J. Immunol.* **156**: 4391-4395.
- O'sullivan, D. J. & Kullen, M. J. (1998): Tracking of probiotic Bifidobacteria in the intestine. *Int. Dairy J.* **8**: 513-525.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Gronlvd, M. M., Isolauri, E. Et Salminen, S. J. (1999): Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *Int. Dairy J.* **9**: 623-630.
- Ouwehand, A. C., Tuomola, E. M., Tolkko, S., & Salminen, S. (2001): Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *Int. J. Food Microbiol.* **64**: 119-126.
- Ouwehand A. C., Salminen S., Isolauri E. (2002): Probiotics: an overview of beneficial effects. *Int. J. Food Microbiol.* **82**:279–289.
- Paidhungat, M., Ragkousi, K. & Setlow, P. (2001): Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca^{2+} -dipicolinate. *J. Bacteriol.* **183**: 4886-4893.
- Palumbo, S.A., (1987): Can refrigeration keep our foods of extended durability. *J. Food Prot.* **53**: 1020-1024
- Papagianni, M. (2003): Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Advances.* **21**: 465–499.
- Park, Y. S., Lee, J. Y., Kim, Y. S., & Shin, D. H. (2002): Isolation and characterization of lactic acid bacteria from feces of newborn baby and from dongchimi. *J. Agr. Food Chem.* **50**: 2531–2536.
- Patel, J. R., Dave, R. I., Sannabhadti, S. S., & Dave, J. M. (1991): Use of bifidobacteria in fermented dairy products. *Indian Daj.man.* **43** : 181 - 185.
- Paubert-Braquet, M., Gan, X.H., Gaudichon, C., Hedef, N., Serikoff, A., Bouley, C., Bonavida, B., Braquet, P., (1995): Enhancement of host resistance against *Salmonella Typhimurium* in mice fed a diet supplemented with yogurt or milks fermented with various *Lactobacillus casei* strains. *Int. J. Immunol.* **11** : 153– 161.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G. & Villani F. (2004): Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Sci.* **67**: 309–317
- Piemont, Y. (1997): Les toxines des synergo-hyménotropes staphylocoques. *Méd Mal Infect.* **27**: 135-142.

- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., & Gopal, P. K. (1998): Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.* **8**: 993–1002.
- Pryde, S. E., Duncan, S. H., Hold, G. L., Stewart, C. S. & Flint, H. J. (2002): The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol. Let.* **217**: 133-139.
- Rafter, J. (2003): Probiotics and colon cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **17**: 849–859.
- Ralph, W.J., Tagg, J.R. & Ray, B., (1995): Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: 249–252.
- Rammelsberg, M. & Radler, F., (1990): Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 177–184.
- Rao A. V. (2002) : Prébiotiques et probiotiques: Nouvelles théories en matière de nutrition et de santé. *Documentation.* **19 (2)**: 1-4.
- Rasic, J. L. J. & Kurmann, J. A. (1983): Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography. Birkhauser Verlag ed. Basel, Boston, Stuttgart.
- Redman, N. E. (2000): Food safety. A Reference Book. 317 pages.
- Reid, G., Mcgroarty, J. A., Angotti, R. Et Cook, R. L. (1988): Lactobacillus inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Can. J. Microbiol.* **34(3)**: 344-351.
- Riazi, A. & Gacemi, B. (2006) : Survie *in vitro* de souches de bifidobactéries à l'hostilité digestive (acidité et sécrétions biliaire) et pouvoir d'assimilation du cholestérol. Actes du 14^{ème} colloque du club des bactéries lactiques Paris 17, 18 et 19 mai 2006.
- Richard, J. (1996): Utilisation de bactériocines pour la production d'aliments plus sûrs: mythe ou réalité ? *Lait.* **76**: 179-189
- Rochat, F. (2004): Effets biologiques des modificateurs de la flore intestinale. *Arch. Pediatr.* **11**: 576–7.
- Romond, M. B. & Romond, C. (1989): Les effets du *Bifidobacterium* dans les diarrhées : Approche des mécanismes d'action. In « Les laits fermentés ». *Actualités de la recherche.* **1**: 215-222.
- Rosenfeldt V., Benfeldt E., Valerius N. H., Paerregaard A., & Michaelsen K. F. (2004): Effects of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestine permeability in children with atopic dermatitis. *J. Pediatr.* **145**: 612–616.
- Rosslund, E., Andersen Borge, G. I., Langsrud, T. & Sbrhaug, T., (2003): Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* **89**: 205–212.
- Rosslund, E., Langsrud, T., Granum, P. E. & Sorhaug, T. (2005): Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* **98**: 193–200.
- Roy, D., Mainville, I., & Mondou, F. (1997): Bifidobacteria and their role in yoghurt-related products. Proceedings of the Symposium on Probiotics in man and animal. *Microecol. and Therapy*, **11**: 167-180.
- Ryan, M.P., W.J. Meaney, R.P. Ross, & Hill. C. (1998): Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2287-2290.
- Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J & Mattila -Sandholm T. (2000): Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *J. Bacteriol.* **84**: 197-215.

- Saavedra, J. M., Abi-Hanna, A., Moore, N. (2004): Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**: 261–267.
- Sahi, T. (1994): Hypolactasia and lactase persistence. *Scand. J. Gastroenterol.* **29**: 1-6.
- Salminen, S., Isolauri, E., & Salminen, E. (1996): Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **70**: 347–358.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M. & Rowland, I. (1998): Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* **80**(1): S147-S171.
- Saloff-Coste, C. J. (1997): Bifidobactéries. Danone World Newsletter. Danone. Le Plessis-Robinson. France. 16.
- Sanders, M. E. (2000): Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nutr.* **130**: 384S-390S.
- Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., (2002): Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *Int. J. Food Microbiol.* **72**: 125– 136.
- Scardovi, V., (1986): Genus *Bifidobacterium*, ORLA JENSEN 1924, 472 IN: Bergey's Manual of systematic bacteriology, IX Ed WILLIAMS et WIPKINS. BALTIMORE.
- Schnell, N., Entian, K. D., Schneider, U., Gotz, F., Zahner, H., Kellner, R. & Jung, G. (1988): Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature.* **33**: 276-278.
- Schiffrin, E.J., Brassard, D., Servin, A.L., Rochat, F., & Donnet-Hughes, A., (1995): Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criterion for strain selection. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**: 515S–520S.
- Schillinger, U. & Holzapfel, W. H. (1996): Guidelines for manuscripts on bacteriocins of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **33**: III-V.
- Schobitz, R., Suazo, V., Costa, M. & Ciampi, L. (2003): Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **84**: 237– 244.
- Sekine, K., Toida, T., Saito, M., Kuboyama, M., Kawashima, T. & Hashimoto, Y. (1985): A new morphologically characterized cell wall preparation from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. *Cancer Res.* **45**: 1300– 1307.
- Servin, A. L. & Coconnier, M. (2003): Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Prac. Res. Clin. Gastroenterol.* **17**(5): 741– 754.
- Servin, A. L. (2004): Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol.* **28**: 405–440.
- Sgouras D, Maragkoudakis P, Petraki K, (2004): In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 518–26.
- Shah, N.P., Lankaputhra, W.E.V., Britz, M. & Kyle, W.S.A. (1995): Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *Int. Dairy J.* **5**: 515–521.
- Shah N. P. (2000): Symposium: probiotic bacteria probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* **83**: 894–907.

- Sheu, B. S., Wu, J. J., Lo, C. Y., Wu, H. W., Chen, J. H. & Lin, Y. S. (2002): Impact of supplement with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. **16**: 1669–1675.
- Shibolet, O., Karmeli, F., Eliakim, R., Swennen, E., Brigidi, P., Gionchetti, P., Campieri, M., Morgenstern, S. & Rachmilewitz, D. (2002): Variable response to probiotics in two models of experimental colitis in rats. *Inflamm. Bowel Dis*. **8**: 399–406.
- Shu Q & Gill H. (2001): A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HNO19) reduces the severity of *Escherichia coli* 015: H17 infection in mice. *Med. Microbiol. Immunol*. **189**: 147-152.
- Silbernagl S, & Despopoulos A. (1992) : Atlas de poche de physiologie. 2^{ème} édition. 366p.
- Simpson P., Ross R., Fitzgerald G. & Stanton C. (2004): *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. Nov., isolated from a porcine caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **54**: 401-406.
- Slotwiner-Nie, P. K. & Brandt L. J. (2001): Infectious diarrhea in the elderly. *Gastroenterol. Clin. North. Am*. **30**: 625–635.
- Spanhaak, S., Havenaar, R., & Schaafsma, G. (1998): The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur. J. Clin. Nutr*. **52**: 899-907.
- Stanton, R. C. Nিকেleit, V. & Mark, E. J. (1998): Case 11-1996— A 69-year-old man with progressive renal failure and the abrupt onset of dyspnea. *N. Engl. J. Med.*, **334**: 973 - 979.
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S. & Coppola, R. (2005): Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS Microbiol. Let*. **244**: 129–137.
- Tagg, J.R., Da Jani, A.S. & Wannamaker, L. W. (1976): Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev*. **40**: 722-756.
- Takagi A., Matsuzaki T., Sato M., Nomoto K., Morotomi M., & Yokokura T. (2001): Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by a probiotic microorganism. *Carcinogenesis*. **22**(4):599 -605.
- Tamime, A. Y., Marshall, V. M. E., & Robinson, Richard K. (1995): Microbiological and technological aspects of milk fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Res*. **62**: 151-187.
- Taniguchi, M., Kotani, N. & Kobayashi, T. (1987): High concentration cultivation of *Bifidobacterium longum* in fermenter with cross-flow filtration. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **25**: 438–441.
- Tannock G. W. (1995): Microbiology of the gastrointestinal tract in relation to lactic acid bacteria. *Int. Dairy J*. **8**: 563-572.
- Tharmaraj N. & Shah N. P. (2003): Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. *J. Dairy Sci*. **86**: 2288–2296.
- Tharmaraj N. & Shah N. P. (2004): Survival of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium animalis* and *Propionibacterium* in cheese-based dips and the suitability of dips as effective carriers of probiotic bacteria. *Int. Dairy J*. **14**: 1055–1066.
- Timmerman, H.M., Koning, C.J.M., Mulder, L. Rombouts, F.M. & Beynen A.C. (2004): Monostrain, multistrain and multispecies probiotics —A comparison of functionality and efficacy. *Int. J. Food Microbiol*. **96**: 219– 233.
- Timmerman, P. Mattsson, E. Martinez-Martinez, L. De Graaf, L. Van Strijp, J. A. Verbrugh, H. A. Verhoef, J. and Fleer A. (1995): Induction of release of tumor

- necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. *Infect. Immun.* **61**: 4167 - 4172.
- Todorov, S. D., Unver, V. & Dicks, L. M. T. (2005):** *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technol.* **36**: 318–326.
- Tojo, M., Oikawa, T., Morikawa, Y., Ymashita, S., Iwata, S., Satoh, J., Hanada, J., & Tanaka, R (1987):** The effects of *Bifidobacterium breve* administration on *Campylobacter enteritis*. *Acta Paediatr. Jpn.* **29**: 160-167.
- Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I. & Lozo, J. (2006):** Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **112**: 230–235.
- Trejo, F. M., Minnaard, J., Perez, P. F., De Antoni, G. L. (2006):** Inhibition of *Clostridium difficile* growth and adhesion to enterocytes by *Bifidobacterium* supernatants. *Anaerobe.* **12(4)** : 186-193.
- Tuomola, E. M. & Salminen, S. J. (1998):** Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 45–53.
- Turnbull, P.C.B., Kramer, J.M., Jorgensen, K., Gilbert, R.J., Melling, J., (1979):** Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**: 219– 228.
- Ustunol, E. & Gandhi, C. (2001):** rotational mobility of extrinsic fluorophores as a probe of channel dynamics. *biophys. j.* **80**: 439-444.
- Van Den Berg, D. J., Smits, C. A., Pot, B., Ledebouer, A. M., Kersters, K., Varbakel, J. M. A. & Verrips, C. T. (1993):** Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation process and culture collections. *Food Biotechnol.* **7**: 189-205.
- Vaughan, E. E., De Vries, M. C., Zoetendal, E. G., Ben-Amor, K., Akkermans, A. D. L. & De Vos, W. M. (2002):** The intestinal LABs. *Int. J. Food Microbiol.* **82**: 341-352.
- Vaz-Velho, M., Todorov, S., Ribeiro, J. & Gibbs P. (2005):** Growth control of *Listeria innocua* 2030c during processing and storage of cold-smoked salmon-trout by *Carnobacterium divergens* V41 culture and supernatant. *Food Control.* **16**: 541–549.
- Vesterlund, S. Paltta, J., Karp, M., Ouwehand, A. C. (2005):** Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: Quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. *Res. Microbiol.* **156**: 238–244
- Viljanen, M. Pohjavuori, E. Haahntela, T. Korpela, R. Kuitunen, M. Sarnesto, A. Vaarala, O. & Savilahti, E. (2005):** Induction of inflammation as a possible mechanism of probiotic effect in atopic eczema–dermatitis syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**: 1254-1259.
- Vinderola, C. G., Mocchiutti, P. & Reinheimer, J. A. (2002):** Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J. Dairy Sci.* **85**: 721-729.
- Voravuthikunchai, S. P., Bilasoi, S. & Supamala, O. (2006):** Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli. *Anaerobe* **12** : 221–226.
- Walker, K., Ripandelli, N. & Flint, S. (2005):** Rapid enumeration of *Bifidobacterium lactis* in milk powders using impedance. *Int. Dairy J.* **15**: 183–188.
- Wang, K.-Y., Li, S.-N., Liu, C.-S., Perng, D.-S., Su, Y.-C. & Wu, D.-C., (2004):** Effects if ingesting *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**: 737–741.

- Weston, S., Halbert, A., Richmond, P. & Prescott, S. L. (2005) :** Effects of probiotics on atopic dermatitis : a randomised controlled trial. *Arch. Dis. Child.* **90**: 892–897.
- Wilson, P.D.G., Brocklehurst, T.F., Arino, S. Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J.W.T. & Van Impe, J.F. (2002):** Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *Int. J. Food Microbiol.* **73**: 275– 289
- Woodcock, N. P., Mcnaught, C. E., Morgan, D. R., Gregg, K. L. & Macfie J. (2004):** An investigation into the effect of a probiotic on gut immune function in surgical patients. *Clin. Nutr.* **23**: 1069–1073.
- Yildirim, Z. & Johnson, M. G. (1998):** Characterization and antimicrobial spectrum of Bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J. Food Prot.* **61**: 47–51.
- Yildrim, Z. (1998):** Isolation, purification, characterization, mode of action and amino acid sequence of bifidocin B and lactococcin R. Adissertation submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy. University of Arkansas. 171 pages.
- Yuguchi, H., Hiramatsu, A., Doi, K., Idach, & Okogoni, S. (1989):** Studies on the flavor of yogurt fermented with Bifidobacteria: Signifiame of volatils components and organic acids in the sensory acceptance of yogurt. *Jpn J. Zootech Sci.* **60**: 734-741.

Résumé

L'objectif de ce travail a été de tester trois souches expérimentales (isolées à partir de selles de bébés allaités exclusivement au sein : Bbv1, Bbv2 et BLE) et une souche de référence (BLR) de bifidobactéries pour leur pouvoir antagoniste vis-à-vis de deux bactéries pathogènes : *Staphylococcus aureus* 49444 et *Bacillus cereus* ATCC 9884. L'antagonisme de ces souches a été étudié en utilisant deux méthodes : l'une consiste à les cocultiver à 37°C avec les pathogènes et l'autre à mettre en contact à 37 et à 6°C le surnageant concentré de leur culture avec celle de ces mêmes pathogènes. L'effet d'une série de solvants organiques sur le pouvoir inhibiteur des souches bifides vis-à-vis de *S. aureus* et *B. cereus* a également été exploré. Les acides organiques (acides acétique et lactique) synthétisés par les bifidobactéries ont été quantifiés par HPLC. Les résultats obtenus indiquent qu'à 37°C, les surnageants concentrés issus de cultures de bifidobactéries exercent un effet antagoniste envers *S. aureus* et *B. cereus* bien supérieur à celui observé lors de la coculture des souches bifides avec les pathogènes. A basse température (6°C), le pouvoir inhibiteur des surnageants concentrés des cultures bifides sur les deux germes pathogènes est fortement réduit et étalé dans le temps puisque 48h de contact ne permettent que 60% d'inhibition en moyenne seulement. La vitesse d'inhibition de *S. aureus* et de *B. cereus* par les surnageants bifides met également en relief cette latence d'action à 6°C. Les solvants organiques tels que le formaldéhyde, le chloroforme, l'acétone, l'hexane, l'isobutanol, le méthanol et le diéthyléther n'ont aucun effet sur le pouvoir antagoniste des surnageants concentrés de cultures de bifidobactéries vis-à-vis des deux germes pathogènes testés. Ceci laisse penser que ces solvants ne dénaturent pas les substances protéiques à activité antagoniste (i.e. bactériocine-like). Les souches bifides testées synthétisent plus d'acide acétique que d'acide lactique et ceci dans un rapport molaire variable de 1.74 à 1.99.

Mots clefs : Bifidobactéries- Antagonisme- *Staphylococcus aureus*- *Bacillus cereus*.

Abstract

The aim of the present work was to assess three experimental (isolated from stools of exclusively breast-fed infants : Bbv1, Bbv2 and BLE) and one reference (BLR) bifidobacteria strains on the basis of their antagonistic activity against two pathogen bacteria *Staphylococcus aureus* 49444 and *Bacillus cereus* ATCC 9884 using two methods: the first one consist of an associated cell culture of the two types of bacteria at 37°C, and the second one was done with contact of concentrated bifidobacteria supernatant and the pathogen bacteria at 37 and 6°C. The effect of some organic solvents on the antagonistic activity of bifidobacteria strains against *S. aureus* and *B. cereus* was also investigated. Organic acids (acetic and lactic acids) levels were determined using HPLC method. The obtained results have shown that the antagonistic activity of the concentrated bifidobacteria supernatants towards *S. aureus* and *B. cereus* at 37°C was higher than that observed with the associated cultures of the two types of cells. At low temperature (6°C), antagonistic activity of the concentrated bifidobacteria supernatants against *S. aureus* and *B. cereus* was markedly reduced and spread out since no more than 60% of viable cells were inhibited after 48h of contact. Inhibition rate of the two pathogens by the concentrated bifidobacteria supernatants also brings out this reduced antagonistic activity at lower temperature (6°C). Organic solvents such as formaldehyde, chloroform, acetone, hexane, isobutanol, methanol and ether-diethyl did not show any effect on the antagonistic activity of the concentrated bifidobacteria supernatants towards *S. aureus* and *B. cereus* suggesting that these solvents did not denature the protein compounds having an inhibitory power (i.e. bacteriocin-like). Production of acetic acid by Bifidobacteria strains was higher than that of lactic acid in a ratio ranging from 1.74 to 1.99.

Keys words: Bifidobacteria- Antagonism- *Staphylococcus aureus*- *Bacillus cereus*.