

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie appliqué

THEME

**Etude in vitro du comportement de quelques souches
des bactéries lactiques vis-à-vis de quelques
paramètres physiques et chimiques du tube digestif.**

Présenté par :

Zoubiri Abd Elkarim / Salami Nasr Edin

Devant le jury :

Président(e) : Chaibi Rachid

Rapporteur : Zerrouki Hocine

Co-Rapporteur : Benaceur Farouk

Examineur(rice)s : Gouzi Hichem

Soutenu publiquement le :.....2018



Dédicace

Avec l'aide d'Allah, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

**A la mémoire de mes grands parents
A mon père mon professeur de toujours,
et ma très chère mère Pour leurs soutien et
encouragements.**

**A mes chères Frère, Soeurs et à tous mes amis
sans exception. A mes proches et toute mes**

**A gens qui m'aiment. A tous ceux qui sont
proches de mon coeur et dont je n'ai pas cité
leurs noms. Au bonheur des plus chers.**

Merci à tous.



Remerciements

Je remercie profondément mr.zerrouki hocine et mr benaceur farouk ses conseils et ses directives ont contribué fortement à la réalisation de ce rapport.

Je remercie tout particulièrement les prof de microbiologie pour leurs aides et leurs conseils et pour leurs grandes valeurs humaines.

Je souhaite aussi saluer et remercier nos collègues étudiants(es), avec qui nous avons eu le plaisir d'étudier durant ces trois dernières années.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe administrative particulièrement et tous les enseignants du département de Biologie de l'Université Amar Telidji.

Un grand merci à mes parents et à toute ma famille (salami; zoubiri) pour leur amour, leur aide et leur soutien.

Enfin, merci à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin durant ces années d'études.

Résumé

Pour être des probiotiques, les microorganismes doivent avoir une certaine tolérance des conditions dans le tractus gastro-intestinal.

Ce travail consiste à étudier *in vitro* le pouvoir de survie des souches lactiques isolées du lait de vache et de yaourt aux conditions du tube digestif, et ceci en recherchant les souches ayant une tolérance du pH gastrique ($\text{pH} = 2$), de différentes concentrations des sels biliaires, en absence de l'oxygène et enfin la sensibilité aux antibiotiques.

Parmi 32 souches, seulement 14 ont survécu dans un milieu acide ($\text{pH}2$). Toutes ces 14 souches ont montré une tolérance aux différentes concentrations des sels biliaires (0,2 %; 0,4%; 0,6 %; 0,8%) ainsi qu'en anaérobiose. La plupart des souches testées ont présenté une résistance à la majorité des antibiotiques.

Mots clés : *probiotiques, bactérie lactiques, tube digestif, sels biliaires.*

Abstract

For probiotics, microorganisms must have some tolerance of conditions in the gastrointestinal tract.

This work consists in studying *in vitro* the power of survival of lactic acid strains isolated from cow's milk and yoghurt to the conditions of the digestive tract, and this by looking for the strains having a tolerance of the gastric pH ($\text{pH} = 2$), of different concentrations of the bile salts, in the absence of oxygen and finally sensitivity to antibiotics.

Among 32 strains, only 14 are served in an acid medium ($\text{pH}2$). All these 14 strains showed tolerance to different concentrations of bile salts (0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%) and anaerobiosis.

Most strains tested showed resistance to the majority of antibiotics.

Key words: *probiotics, lactic acid bacteria, digestive tract, bile salts.*

المخلص

البروبيوتيك كائنات حية دقيقة لها القدرة على العيش في وسط الجهاز الهضمي. يتألف هذا العمل من دراسة قدرة البقاء على قيد الحياة لسلاسل حمض اللاكتيك المعزولة من حليب البقر والزيادي في ظروف الجهاز الهضمي، وذلك من خلال البحث عن السلالات التي تتحمل درجة الحموضة المعدية ($\text{pH} = 2$)، من تركيزات مختلفة من الأملاح الصفراوية، في غياب الأكسجين وأخيراً الحساسية للمضادات الحيوية. بين 32 سلالة، نجا 14 فقط في الوسط الحمضي ($\text{pH}2$). كل هذه السلالات 14 أظهرت التحمل لتركيزات مختلفة من الأملاح الصفراوية (0.2 %، 0.4 %، 0.6 %، 0.8 %) وفي الوسط اللاهوائي. كما أظهرت معظم السلالات التي تم اختبارها مقاومة لأغلبية المضادات الحيوية.

الكلمات الرئيسية: البروبيوتيك، وبكتيريا حمض اللاكتيك، والجهاز الهضمي، وأملاح الصفراء.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction	01
I. Les probiotiques	03
I.1. Historique de l'utilisation des probiotiques	03
I.2. Définitions	03
I.3. Les micro-organismes probiotiques	04
I.4. Critères de sélection des souches probiotiques	05
I.5. Effets positifs des probiotiques sur la santé	06
I.6. Persistance des probiotiques dans le tube digestif	07
II. Les bactéries lactiques	09
II .1. Généralités.....	09
II.1.1. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques.....	09
II.1.2. Habitat et origine.....	10
II.1.3. Classification des bactéries lactiques.....	10
II.2. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques.....	11
II.2.1. Le genre Lactobacillus.....	11
II.2.2. Le genre Lactococcus.....	11
II.2.3. Le genre Streptococcus.....	12
II.2.4. Le genre Enterococcus.....	12
II.2.5. Les genres Leuconostoc, Oenococcus et Weissella.....	13
II.2.6. Les genres Pediococcus et Tetragenococcus.....	13
II.2.7. Le genre Bifidobacterium.....	14
II.3 Bifidobacterium. spp et Lactobacillus. Spp	14
II.4. Effets antimicrobiens des bacteries lactiques	15
II.4.1 Antagonisme microbien.....	15
II.4.2 Activité antimicrobienne des bactéries lactiques.....	17
II.4.3 Production d'acides organiques.....	17
II.4.4 Formation du peroxyde d'hydrogène.....	18
II.4.5 Action de diacétyle.....	19
II.5 Production de bactériocines.....	19
II.5.1 Classement des bactériocines.....	20

Sommaire

II.5.2	Caractéristiques biochimiques des bactériocines de <i>Lactococcus lactis</i>	21
II.5.3	Caractéristiques des déterminants génétiques.....	22
II.5.4	Mode d'action.....	23
II.5.5	Facteurs influençant la production de bactériocines.....	23
II.5.6	Domaines d'application des bactériocines.....	25
III.	Généralités du système digestif.....	28
III .1	Structure du système digestif.....	28
III .2	Le microbiote.....	32
IV.	Matériel et méthodes	35
IV.1	Objectif.....	35
IV.2	Lieu d'étude.....	35
IV.3	Origine des souches.....	35
IV.4	Choix des milieux de culture.....	36
IV.5	Purification des souches.....	36
IV.6	Confirmation de l'appartenance des souches au groupe lactique.....	36
IV.6.1	Coloration de Gram.....	36
IV.6.2	Test Catalase.....	37
IV.7	Testes de croissance des souches en fonction de différentes conditions.....	37
IV.7.1	Test de pH.....	37
IV.7.2	Test d'anaérobiose	38
IV.7.3	Test des sels biliaire.....	38
IV.7.3.3	Essais avec la bile fraîche de bœuf à différentes concentrations.....	38
IV.7.3.4	Teste d'antibiogramme.....	40
V.	résultats et discussions	41
V.1	Résultats de purification et confirmation des souches	41
V.2	Observation microscopique.....	42
V.3	Résultats du test de pH.....	44
V.4	Test d'anaérobiose.....	46
V.5	Résultats du test des sels biliaire.....	47
V.6	résultats du test d'antibiogramme.....	50
	Conclusion.....	51

Références bibliographique

Liste des tableaux

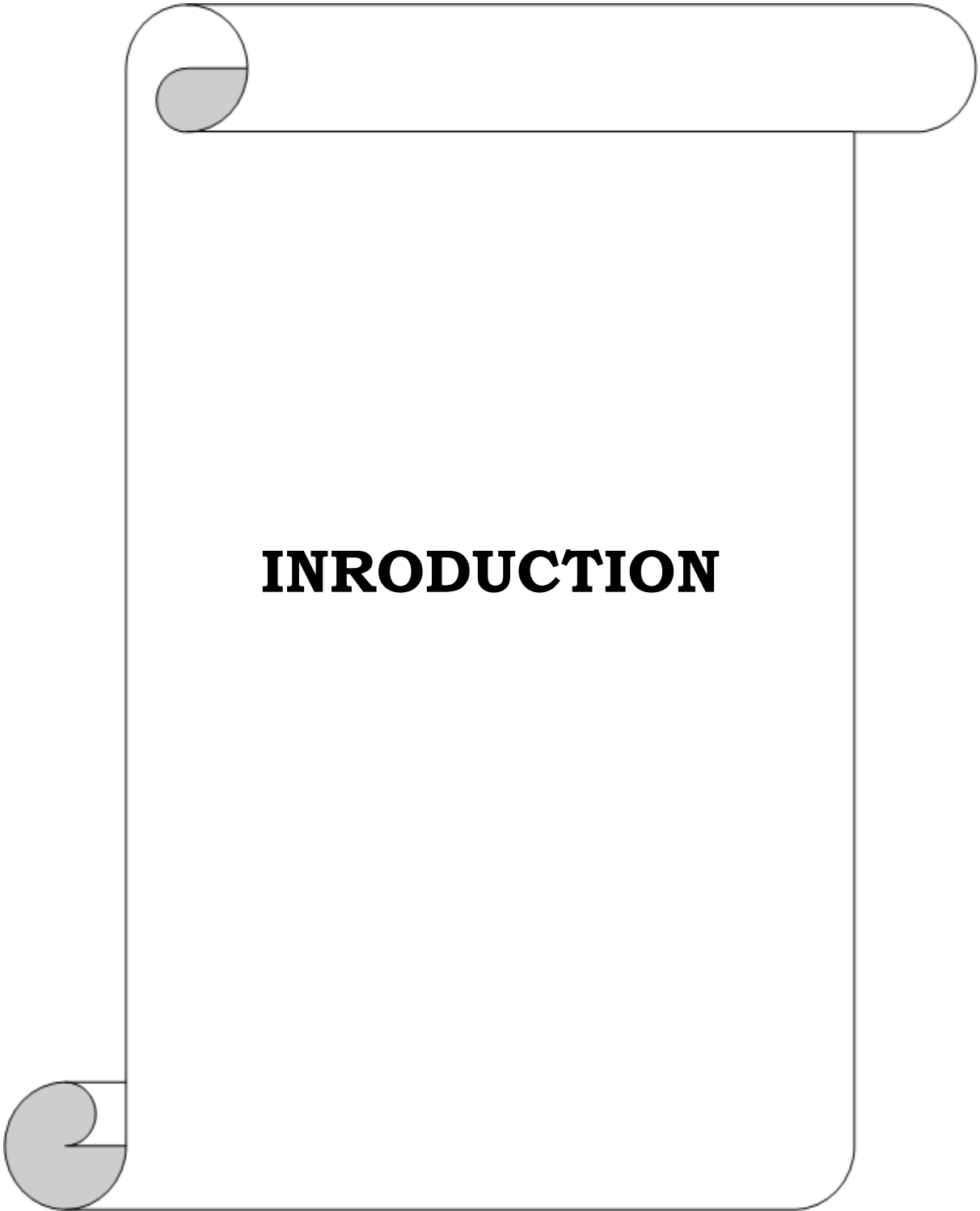
Tableau 1 :	Micro-organismes considérés comme probiotiques.....	4
Tableau 2 :	Proposition de critères de sélection des probiotiques à application Intestinale.	5
Tableau 3 :	Effets positifs des probiotiques sur la santé	6
Tableau 4 :	les différents genres des bactéries lactiques.....	10
Tableau 5 :	L'origine des souches de bactéries lactiques.....	35
Tableau 6 :	le code et la dose de chaque antibiotique utilisé.....	40
Tableau 7 :	caractéristique des colonies après purification.....	41
Tableau 8 :	l'observation microscopique de quelques souches.....	42
Tableau 9 :	résultats des comportements des souches lactiques vis-à-vis du Ph.....	45
Tableau 10 :	la tolérance des souches aux différentes concentrations des sels biliaires.....	46
Tableau 11 :	la sensibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques.....	49

Liste des figures

Figure 1 :	<i>Bifidobacterium longum</i>	14
Figure 2 :	<i>Lactobacillus plantarum</i>	15
Figure 3 :	Structure du système digestif	28
Figure 4 :	Structure de l'intestin grêle.....	29
Figure 5 :	La muqueuse intestinale.....	30
Figure 6 :	La muqueuse colique.....	31
Figure 7 :	Répartition des <i>phylums</i> majoritaires qui composent le microbiote intestinal..	33
Figure 8 :	L'aspect macroscopique des bactéries lactiques sur milieu MRS solide et liquide après purification.....	41
Figure 9 :	Observation microscopique des souches lactiques avec grossissement x 100	42
Figure 10 :	La croissance des souches qui ont résisté à pH 2.....	44
Figure 11 :	la croissance des souches de bactéries lactique en anaérobiose.....	46
Figure 12 :	résultat de l'antibiogramme de la souche L11.....	48

Liste des abréviations

FAO :	Food and Agriculture Organization
g :	gramme
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
C° :	Degré Celsius.
ATCC :	American Type Culture Collection
ATP :	Adénosine triphosphate
CO₂:	. Carbone Dioxyde
G+C :	Guanine + Cytosine
pH :	Potentiel d'Hydrogène
ADH :	Arginine Di hydrolase
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ARNr :	Acide Ribonucléique Ribosomique
UFC :	Unité Formant Colonie
UI :	Unité Internationale
Lb. :	Lactobacillus
Lc. :	Lactococcus
Ln. :	Leuconostoc
AAF :	aérobie anaérobie facultatif
TD :	tractus digestif
H₂O₂ :	peroxyde d'hydrogène
Ig :	immunoglobuline
LB :	lymphocyte B



INTRODUCTION

INTRODUCTION

Introduction :

Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, peuvent exercer de nombreux bénéfices pour la santé de l'hôte. L'intérêt et le champ des recherches dans ce domaine ont considérablement progressé ces dernières années. Les effets bénéfiques des probiotiques ont notamment été démontrés dans le traitement de l'intolérance au lactose (**Coombes et al., 2007**).

Les bactéries lactiques représentent un groupe diversifié de bactéries dont le produit majeur de fermentation est l'acide lactique. Ces dernières années, l'activité probiotique de certaines bactéries lactiques a été soulignée notamment sur modèle *Lactococcus lactis* (**Bermudez-Humaran., 2002**).

Toutefois, plusieurs travaux ont montré la possibilité de persistance de *Lactococcus lactis* chez l'homme ou chez l'animal. De nombreuses souches de Lactocoques étant traditionnellement utilisées comme « starter » dans la fabrication des fromages et d'autres produits laitiers fermentés, l'établissement de propriétés probiotiques chez *Lactococcus lactis* pourrait conduire au développement de nouveaux aliments fonctionnels « bio-thérapeutique » (**Doan-Thanh-LamLE, 2011**).

L'intolérance au lactose affecte 3/4 de la population mondiale. Environ 20% des personnes digérant mal le lactose sont intolérantes au lactose et souffrent de douleurs abdominales après consommation de lactose (**Suarez et al., 1995**).

L'hypothèse que certains microorganismes sont capables de diminuer le lactose dans l'intestin et d'améliorer les propriétés nutritionnelles, diététiques et thérapeutiques est maintenant sujette de plusieurs recherches (**Dilmi Bouras et al., 2007**), notamment Les bactéries lactiques qui provoquent sa transformation chimique en le dégradant en acide lactique grâce à l'enzyme même (**Clinquart, 2005**).

C'est pour cette raison, que de nombreux chercheurs se sont intéressés à étudier l'incidence que peuvent avoir ces bactéries sur la santé humaine (**Dilmi Bouras, 2006**).

INTRODUCTION

Il semble bien que leurs rôles soient propices, sous réserve du choix correcte des souches et des modalités pratiques d'application (**Givry, 2006**). Parmi les effets revendiqués, la modulation de l'activité lactasique du fait que la digestion du lactose du yaourt est assurée par les enzymes des bactéries, voir la β - galactosidase qui le converti en glucose et galactose au cours du transit dans le tube digestif (**Drouault et al., 2002**).

L'étude de la survie des probiotiques dans le tractus gastro -intestinal est importante pour une meilleure connaissance du devenir des bactéries lactiques ingérées avec l'aliment et une meilleure compréhension de l'action des probiotiques chez l'homme et l'animal. Il est probable que pour exercer un effet probiotique significatif, les bactéries doivent arriver vivantes et en nombre suffisant dans l'intestin (**Drouault et Corthier, 2001**). Ainsi ces ferments doivent pouvoir passer sans dommage irréversible la barrière acide de l'estomac, puis l'effet inhibiteur éventuel des sels biliaires (**Dilmi Bouras et Sadoun, 2002a**).

La présente étude est consacrée à:

- Sélectionner des souches de bactéries lactiques mésophiles locales dont les espèces sont *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris* et *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* ayant une grande capacité de dégradation de lactose ;
- Etudier la survie de ces souches en cultures pures et mixtes dans les conditions extrêmes du tube digestif (acidité gastrique et sels biliaires) *in vitro*, pour pouvoir à la fin sélectionner un lait fermenté dont les bactéries restent viables dans le tube digestif et peuvent être utilisé comme alicament destiné aux intolérants au lactose.



CHAPITRE I :
Les probiotiques

Chapitre I : Les probiotiques

I. Les probiotiques

I .1. Historique de l'utilisation des probiotiques

Selon Tissier (1906) et Metchnikoff (1907) qui ont été les premiers à avancer dans leurs travaux des propositions scientifiques au sujet de l'utilisation probiotique des bactéries, même si le mot "probiotique" n'a été forgé qu'en 1960, pour désigner des substances produites par des microorganismes qui favorisaient la croissance d'autres microorganismes (**Lilly et Stillwell, 1965**).

Une définition très semblable a été proposée par **Havenaar et Huis in 't Veld, (1992)** : une culture viable composée d'une ou d'un mélange de bactéries qui, lorsqu'elle est appliquée à l'animal ou à l'homme, exerce un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant les propriétés de la flore indigène".

Une définition plus récente, qui n'est probablement pas la dernière est:

"microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte" (**Guarner et Schaafsma, 1998 ., Tannock, 1999 et Michetti et al., 1999**).

I .2. Définitions :

Le terme probiotique a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques.

Une des premières définitions des probiotiques comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » a été proposée par **Lilly et Stillwell en 1965**.

Ensuite, Parker élargit cette définition à des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore » (**Parker, 1974**).

Cette définition inclut potentiellement des produits métaboliques microbiens y compris les antibiotiques. Plus tard, **Fuller (1989)** propose une définition très proche du sens actuel : « supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale ».

La FAO et l'OMS ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et formulent la définition suivante : « micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère» (**FAO/OMS, 2002**).

Chapitre I : Les probiotiques

I.3. Les micro-organismes probiotiques

Les bactéries qui constituent la microflore intestinale résidente, n'ont pas normalement d'effets négatifs sur les probiotiques et certaines d'entre elles sont nécessaires pour maintenir le bien-être de leur hôte. Comme exemple du rôle bénéfique de la microflore intestinale, il faut citer ce que l'on a appelé la "résistance à la colonisation" ou l'"effet de barrière" (van der Waaij *et al.*, 1971 et Vollaard et Clasener, 1994).

Sont considérés comme probiotiques différentes souches bactériennes ainsi que les levures. Les bactéries probiotiques sont principalement des bactéries lactiques et des bifidobactéries (Tableau 1) :

Tableau 1 : Micro-organismes considérés comme probiotiques .(Hozalpfel *et al.* (1998))

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres bactéries lactiques	Autres micro-organismes
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus spp.</i>
<i>L. amylovirus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	strain Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. cellobius</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>cerevisae</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. fermentum</i>		<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>bourlardii</i>
<i>L. gallinarum</i>			
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Chapitre I : Les probiotiques

I.4. Critères de sélection des souches probiotiques

Selon **Salminen et al.(1996)**, **Tannock (1999 a,b)** et **Stanton et al.(2001)**, pour qu'un organisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique il doit présenter les caractéristiques suivantes:

- être un habitant naturel de l'intestin .
- être capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier .
- adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduit l'adhérence des souches pathogènes .
- avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant des souches pathogènes (acides, H₂O₂, bactériocines...) .
- non invasif, non carcinogène et non pathogène .
- être capable de co-agrégation pour former une flore normale équilibrée .
- survivre aux différents procédés technologiques de production .
- garder sa viabilité dans l'aliment et durant le transit intestinal.

Dans toutes les définitions prononcées, la notion de viabilité apparaît comme un critère de sélection important. Cependant, cette notion demeure très controversée puisque des études récentes, ont clairement démontré que même les souches non viables de probiotiques sont capables d'exercer certains effets positifs sur la santé entre autres la stimulation de certaines fonctions immunitaires, l'inhibition de l'adhésion et l'invasion de certains pathogènes (**Coconier et al., 1993.,Ouwehand et al., 1999**). Le tableau 2 montre les critères de sélection des probiotiques .

Tableau 2 : Proposition de critères de sélection des probiotiques à application Intestinale
Saarela et al. (2000)

Critères de sécurité
<input type="checkbox"/> Souche pour l'usage humain d'origine humaine (isolée du tractus intestinal d'un homme sain ou alimentaire(utilisée dans les produits fermentés)
<input type="checkbox"/> Souche déposée dans une collection de cultures reconnue internationalement
<input type="checkbox"/> Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques
<input type="checkbox"/> Historique de non pathogénicité
<input type="checkbox"/> Pas de dé conjugaison excessive des sels biliaires au risque des lyses cellulaires
<input type="checkbox"/> Pas de transmission possible de gènes résistant au antibiotiques
<input type="checkbox"/> Pas de dégradation excessive de mucus

Chapitre I : Les probiotiques

Critères fonctionnels
<input type="checkbox"/> Tolérance à l'acidité et aux enzymes gastriques <input type="checkbox"/> Tolérance à la bile et aux enzymes digestives <input type="checkbox"/> Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus gastro-intestinal <input type="checkbox"/> Immuno stimulation <input type="checkbox"/> Production de substances antimicrobiennes et antagonisme vis -à-vis des pathogènes <input type="checkbox"/> Effets positifs sur la santé
Critères technologiques
<input type="checkbox"/> Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini <input type="checkbox"/> Conservation des propriétés probiotiques après production

I.5. Effets positifs des probiotiques sur la santé

Selon Sanders et Huis in't Veld (1999) ; Playne et Salminen (2002); Gueimonde et Salminen (2003), différents effets positifs sont ainsi attribués aux probiotiques. Ces effets sont décrits dans le tableau 3 et expliqués ci-dessous.

Tableau 3 : Effets positifs des probiotiques sur la santé Gueimonde et Salminen (2003)

EVIDENCES SCIENTIFIQUES FORTES	
EFFETS DES PROBIOTIQUES	MECANISMES DES PROBIOTIQUES
Aide à la digestion du lactose	<input type="checkbox"/> Action de la β -galactosidase bactérienne
Réduction des risques des diarrhées	<input type="checkbox"/> Activité anti pathogène <input type="checkbox"/> Stimulation du système immunitaire
Diminution des allergies alimentaires	<input type="checkbox"/> Amélioration de la fonction barrière de la muqueuse <input type="checkbox"/> Stimulation du système immunitaire <input type="checkbox"/> Dégradation des protéines allergènes
EVIDENCES SCIENTIFIQUES ET PROMETTEUSES	
EFFETS DES PROBIOTIQUES	MECANISMES DES PROBIOTIQUES
Activité hypocholestérolémiant	<input type="checkbox"/> Assimilation du cholestérol <input type="checkbox"/> Dé conjugaison des sels biliaires

Chapitre I : Les probiotiques

Prévention du cancer du côlon	<input type="checkbox"/> Dégradation des carcinogènes <input type="checkbox"/> Production de composés Anti mutagéniques <input type="checkbox"/> Modulation des enzymes fécales carcinogéniques <input type="checkbox"/> Stimulation du système immunitaire
Résistance contre les maladies inflammatoires et irritables des intestins	<input type="checkbox"/> Activité antipathogène <input type="checkbox"/> Stimulation du système immunitaire
Diminution des infections à <i>Helicobacter pylori</i>	<input type="checkbox"/> Activité antipathogène
Effet anti hypertenseur	<input type="checkbox"/> Action des peptidases sur les protéines du lait donnant des peptides bioactifs

1.6. Persistance et survie des probiotiques dans le tube digestif

La survie dans l'environnement gastro-intestinal est une condition essentielle pour nommer les bactéries lactiques des probiotiques (**Lievin-Le Moal et al., 2007. Ghadimi et al., 2008 et Lopez et al., 2008**).

Il est bien admis que les probiotiques transitent dans le tube digestif sans le coloniser. Néanmoins une colonisation provisoire est toutefois possible. Certaines bactéries lactiques peuvent persister jusqu'à plusieurs semaines. Même si les bactéries lactiques ne font que transiter dans le tube digestif, elles sont capables d'exercer leurs effets et d'avoir ainsi un impact sur l'hôte (**Dilmi-Bouras et Sadoun, 2002**).

L'étude de la survie des probiotiques dans le tractus gastro-intestinal est importante pour une meilleure connaissance du devenir des bactéries lactiques ingérées avec l'aliment et une meilleure compréhension de l'action des probiotiques chez l'homme et l'animal.

Il est probable que pour exercer un effet probiotique significatif, les bactéries doivent arriver vivantes et en nombre suffisant dans l'intestin (**Drouault et Corthier, 2001**).

Dans le tube digestif, les conditions d'environnement sont très différentes du produit contenant des probiotiques.

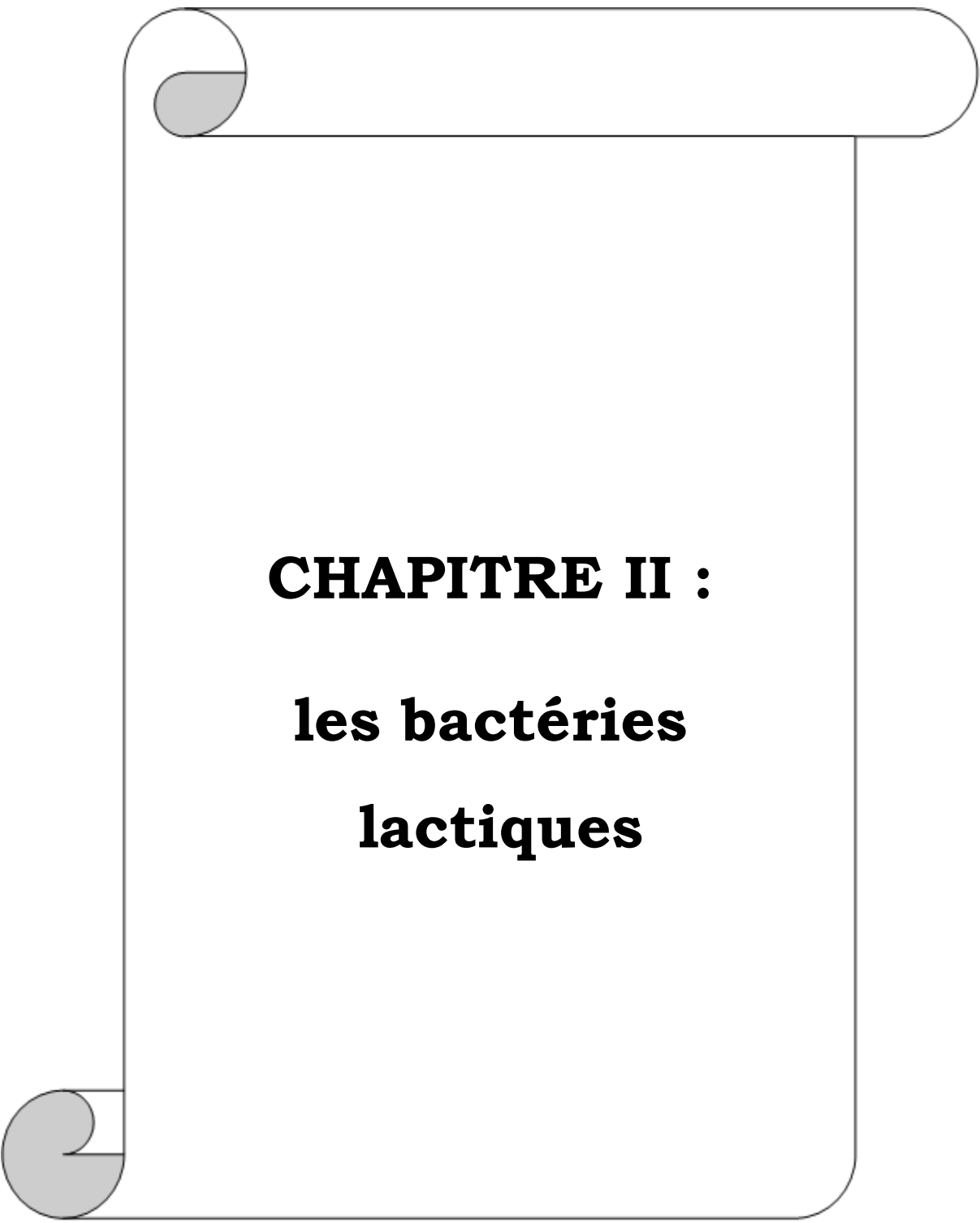
Chapitre I : Les probiotiques

Dans l'estomac, l'acidité peut être très élevée mais une part importante des bactéries lactiques est évacuée avec les premières vidanges gastriques et elles atteignent rapidement l'iléon en une à deux heures après le repas (**Lopez et al., 2008**).

Dans l'intestin grêle, les sels biliaires, les enzymes pancréatiques et des défensives produites par les cellules de l'intestin grêle peuvent réduire la viabilité des bactéries probiotiques. Dans le côlon, les bactéries se trouvent confrontées à une flore intestinale qui leur est 1 000 à 10 000 fois supérieure en nombre et qui peut avoir des répercussions sur leur viabilité et leur physiologie. Cependant il a été montré que non seulement les probiotiques étaient capables de survivre, mais également qu'ils étaient capables de moduler leur métabolisme pour s'adapter à l'environnement digestif de l'homme (**Oozeer et al., 2002**).

Le moyen le plus fiable d'étudier le devenir des bactéries ingérées dans le tractus digestif est d'effectuer des mesures *in vivo*. Pour cela, deux techniques peuvent être utilisées : le recueil des selles et l'incubation intestinale. Ces deux techniques ont déjà permis d'étudier la survie d'un petit nombre de bactéries lactiques, essentiellement des lactobacilles, dans le tractus digestif (**Marteau, Pochart et al., 1992 ; Dilmi-Bouras et Sadoun, 2002 et Koïche et Dilmi-Bouras, 2010**).

Plusieurs études sur souris gnotoxéniques (inoculées par un ou plusieurs microorganismes définis) montrent que les bactéries résidentes ont un effet sur l'hôte dès lors que leur taux dépasse 10⁷ bactéries/g de fèces. Cette condition est vraisemblablement valable pour les probiotiques (**Gill , 1998**), et le taux de survie dans le tube digestif (10 à 30% selon les souches) est ainsi un critère important pour avoir un effet (**Moreau, 2001**), la même constatation a été faite en utilisant le modèle lapin (Dilmi-Bouras et Sadoun, **2002**).



CHAPITRE II :
les bactéries
lactiques

Chapitre II : les bactéries lactiques

II. Les bactéries lactiques

II .1. Généralités

II.1.1. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres (**Hadef, 2012**).

Le terme "bactéries lactiques" désigne des bactéries produisant de l'acide lactique par fermentation des hydrates de carbone. Elles sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimioorganotrophes, ne se développent qu'en présence de substances hydrocarbonées telles que les sucres, les alcools et les acides organiques (**Desmazeaud, 1983**).

Les bactéries lactiques sont: Gram +, en général immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes, catalases (-) (certaines bactéries possèdent des pseudocatalases), nitrate (-), se présentent sous forme sphérique, allongée ou en bâtonnet. En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole, ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Deroissart et Luquet, 1994**).

Selon **Dellaglio (1988)** toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui en utilisant les glucides peuvent produire:

- L'acide lactique (bactéries homofermentaires).
- L'acide lactique et acétique, l'éthanol, le mannitol et CO₂ (bactéries hétérofermentaire).

Chapitre II : les bactéries lactiques

II.1.2. Habitat et origine

Elles ne se développent que dans des milieux riches et sont rencontrées dans des écosystèmes aussi variés que les produits alimentaires fermentés tels que le lait et ses dérivés (beurre, fromage et yaourt), les viandes (saucisses et saucissons), le poisson et ses dérivés, les boissons (vin, cidre et bière), le pain et les produits végétaux (choux, soja et manioc). On les a également retrouvées au niveau des cavités corporelles externes de l'Homme ou de l'animal (**Sharpe, 1981**).

II.1.3. Classification des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques impliquées dans la production des laits fermentés sont distribuées en plusieurs groupes phénotypiques et génotypiques. Ces groupes sont caractérisés par des différents besoins nutritionnels, métaboliques et propriétés technologiques (**Loones, 1994**). Parmi les nombreuses classifications proposées, la plus généralement adoptée avec quelques modifications est celle **d'Orla-Jensen (1919)**, faisant appel pour différencier ces bactéries à plusieurs critères comme l'indique le tableau 4 suivant :

Tableau 4 : les différents genres des bactéries lactiques. **Novel (1993)**

Genres	Cellules		Fermentation	ADN GC (%)
	Formes	Arrangement		
<i>Streptococcus</i>	Coque	Chaînes	Homolactiques	36-46
<i>Leuconostoc</i>	Coque	Tétrades	Hétérolactiques	36-43
<i>Pediococcus</i>	Coque	Tétrades	Homolactiques	34-42
<i>Lactobacillus</i>	Bacille	Chaînes	Homolactiques Hétérolactiques	32-53
<i>Bifidobacterium</i>	Variée	Variée	Acétiques et lactiques	55-67

Chapitre II : les bactéries lactiques

II.2. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

II.2.1. Le genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C.

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

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (**Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004**) :

Groupe I « *Thermobacterium* » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.

Groupe II « *Streptobacterium* » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*.

Groupe III « *Betabacterium* » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco*.

II.2.2. Le genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits « lactique », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (**Pilet et al., 2005**).

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que

Chapitre II : les bactéries lactiques

de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C.

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

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

II.2.3. Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques .

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (**Stiles et Holzapfel, 1997**).

Streptococcus thermophilus se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *St. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (**Haddie, 1986 ; Pilet et al., 2005**).

II.2.4. Le genre *Enterococcus*

Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10°C et 45°C (**Tamime, 2002 ; Ho et al., 2007**).

Chapitre II : les bactéries lactiques

II.2.5. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils ressemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrane, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al., 1998 ; Ho et al., 2007).

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des leuconostoc entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les leuconostoc principalement *Ln. mesenteroides* ssp.cremoris et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyle et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008).

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

II.2.6. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les pediococques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Guiraud et Rosec, 2004 ; Tosukhowong et al., 2005).

Chapitre II : les bactéries lactiques

II.2.7. Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G+C. Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007).

II.3 *Bifidobacterium. spp* et *Lactobacillus. Spp*

Bifidobacterium. spp est présent naturellement dans l'intestin qu'il colonise durant la première semaine après la naissance. Il fait partie des Actinobactéries, c'est un genre anaérobie strict à Gram positif qui possède un haut pourcentage en base GC (entre 55 et 64%) (Van Der Werf, 2001).

Son activité métabolique rejoint celle des BL, par la production d'acétate et de lactate. Il représente 95% du microbiote de l'enfant et 3% de l'adulte. On dénombre environ 30 espèces différentes dont certaines sont considérées comme probiotiques (Trebichavsky et al., 2009) (Figure1).

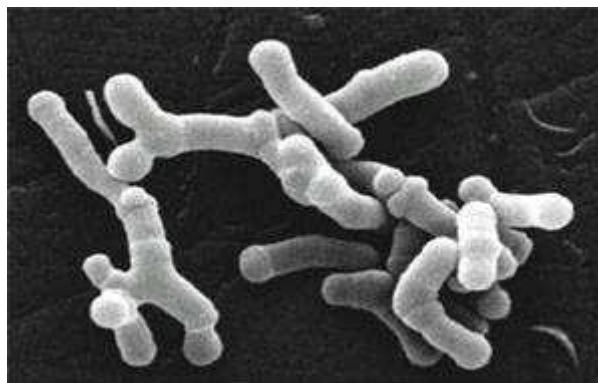


Figure 1: *Bifidobacterium longum* (Schell, université de Georgie).

Chapitre II : les bactéries lactiques

Les lactobacilles se présentent sous forme de bacilles ou coccobacilles, isolés ou en chaînettes, ils sont immobiles à Gram positif, leur type respiratoire est AAF (Figure2). Ils appartiennent au genre actinobactéries. Ils ont été isolés à partir de niches écologiques très variées : les flores buccales, intestinales et vaginales de l'être humain et des animaux, les produits laitiers, les végétaux, les viandes et les poissons... Considérés comme BL, ils sont couramment utilisés dans la fabrication des produits laitiers. Concernant l'écosystème intestinal, les lactobacilles font partie de la flore sous-dominante (**Guarner and Malagelada.,2003**).

De nombreuses espèces sont également considérées comme probiotiques, elles permettent notamment de diminuer les risques de caries induites par *Streptococcus mutans* (**Ahola et al., 2002**).

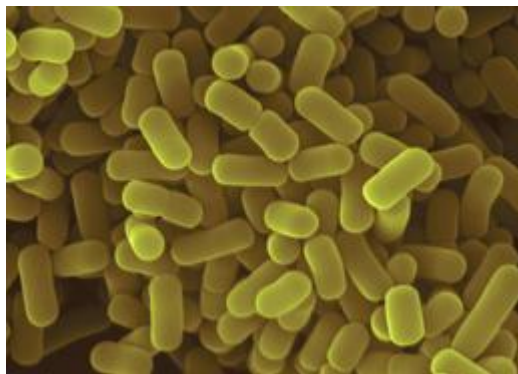


Figure 2 : *Lactobacillus plantarum* (Kunkel., 2004).

II.4. Effets antimicrobiens des bactéries lactiques

II.4.1 Antagonisme microbien

L'antagonisme est un phénomène très complexe, résultant de nombreuses activités connues, il influe sur les caractères morphologiques des microorganismes et divers processus physiologiques telle que la capacité de la production de pigments (**Bourgeois et al., 1996**).

Chapitre II : les bactéries lactiques

L'antagonisme est une relation d'exclusion qui s'établit entre des espèces microbiennes entrant en compétition dans un même milieu. Lorsque se crée une relation antagoniste entre deux espèces microbiennes vivantes dans le même milieu, le développement d'une espèce se trouve affectée par la présence de l'autre (**Singleton, 1984**).

Selon **Bourgeois et al. (1996)**, l'antagonisme repose sur la production, par une espèce donnée, d'une substance qui provoque la mort d'une autre espèce ou en inhibe le développement, c'est le cas des microorganismes qui produisent des antibiotiques ou d'autres substances chimiques à pouvoir bactéricide ou bactériostatiques. Selon **Matsuzaki et al., (1998)**, les types d'antagonismes sont définis comme suit :

- Type répressif: contribue dans un retard de croissance du microorganisme contrarié.
- Type bactéricide : résulte de la destruction du microorganisme contrarié par l'antagoniste sans production d'un effet lytique.
- L'antagonisme direct : est une activité qui consiste à produire par un antagoniste des métabolites possédant les propriétés lytiques qui modifient la croissance de diverses bactéries.
- L'antagonisme indirect : est une activité indépendante de l'action directe de l'antagoniste sur un organisme particulier, mais les conditions de la culture changent et deviennent défavorables.
- L'antagonisme recto ou recto verso : est une activité qui consiste à la répression d'un microorganisme par un autre, qui n'est pas antagoniste, ou quand la répression est vice versa.

En plus des interactions antagonistes entre les microorganismes, il existe d'autres types de relations entre les microorganismes (**Piard et Desmazeaud, 1992**) :

- Symbiose** : les termes "association" et symbiose" sont employés pour indiquer les relations bénéfiques mutuelles, contrairement à l'antagonisme qui se rapportent à une réduction de croissance et des activités.
- Synergisme** : est employé pour indiquer la vie d'ensemble de deux organismes.
- Commensalisme** : désigne une relation unidirectionnelle dans laquelle le microorganisme commensal tire bénéfice de l'association sans perturber l'hôte qui l'abrite. Il se nourrit des substances qui lui sont fournies mais il ne dépend pas obligatoirement du métabolisme de l'hôte (**Bourgeois et Larpent, 1989**).

Chapitre II : les bactéries lactiques

II.4.2 Activité antimicrobienne des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques jouent leur rôle le plus important dans la fabrication de produits alimentaires fermentés. Elles contribuent à l'amélioration du goût, de l'aspect et de l'innocuité microbiologique de l'aliment (**Lachance, 2000**). Ces bactéries produisent, en effet, une variété de composés à action antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocines (**Piard et al., 1993**).

II.4.3 Production d'acides organiques

□ **Effet de l'acidification** : La tolérance des microorganismes vis-à-vis du pH est très variable, dans un produit alimentaire, d'autres facteurs physiques comme la température, ou chimiques comme la concentration saline et l'activité de l'eau, peuvent réduire la tolérance des microorganismes face à l'acidification (**Nicoli et Pénaud, 1985**).

Dans les produits fermentés, la baisse du pH dépend de la matière première fermentée et des souches utilisées (plus ou moins acidifiantes). Il est plus souvent entre 4 et 4,5 dans le cas des yogourts, 4.8 pour la choucroute, 4.6 à 5.3 dans le cas des saucissons, c'est à dire à des valeurs inférieures aux valeurs limites de développement de la plupart des flores d'altération et de la flore pathogène (**Sutra et al., 1998**).

□ **La nature de l'acide organique** : La nature de l'acide organique présent dans le milieu influe sur la résistance des microorganismes face à l'acidification. Une étude faite sur les Salmonelles a montré que des pH minima de croissance variant de 4,04 avec l'acide chlorhydrique et l'acide citrique à 5,50 avec l'acide propionique et l'acide lactique (**Nicoli et Pénaud, 1985**).

□ **Effet inhibiteur spécifique** : L'effet inhibiteur spécifique des acides organiques est généralement attribué à leur forme non dissociée. Cette forme pénètre librement dans la cellule où elle s'ionise, ce qui provoque un abaissement de pH interne et un blocage de certains mécanismes de transport (**Pernoud et al., 2005**).

Les bactéries lactiques hétérofermentaires peuvent produire des quantités notables d'acides organiques autres que l'acide lactique, les produits de l'acide lactique et l'acide acétique. La présence simultanée de ces deux acides pourrait avoir un effet de synergie. Cette synergie a été observée à l'encontre de *Salmonella typhimurium* (**Piard et al., 1990**).

Chapitre II : les bactéries lactiques

II.4.4 Formation du peroxyde d'hydrogène

La consommation de l'oxygène dissous par les bactéries lactiques, aboutit en présence d'un substrat oxydable à la formation de composés de réduction de l'oxygène : anion superoxyde (O_2^-), peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'eau (H_2O). Les deux premiers composés sont très toxiques pour la cellule, et les microorganismes aérobies disposent d'un équipement enzymatique permettant leur élimination. Chez les bactéries lactiques, seules les enzymes aboutissant à la formation de H_2O_2 et de H_2O ont été identifiées, mais l'anion superoxyde peut apparaître comme composés intermédiaires (**Nicoli et Pénaud, 1985**).

La formation du peroxyde d'hydrogène se fait par l'intermédiaire de plusieurs enzymes. Chez les Streptocoques lactiques, la libération de H_2O_2 se fait par la NADH oxydase et chez les *Lactobacillus plantarum*, l'enzyme responsable est une pyruvate oxydase (Jack et al., 1995). Selon les travaux de **Premi et Botazi (1972)**, la capacité d'accumulation d' H_2O_2 dans des conditions de culture données varie grandement selon les espèces et même dans certains cas selon les souches d'une même espèce.

L'importance de l'accumulation dépend largement du substrat glucidique disponible, par exemple pour un *Streptococcus lactis*, la production de H_2O_2 est plus importante en présence de galactose qu'en présence de glucose ou de lactose. Pour éliminer le peroxyde d'hydrogène, les bactéries lactiques ne disposent pas de catalase à groupement hémique.

Cependant certaines d'entre elles présentent une activité catalasique, lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux renfermant du sang ou des groupements hémiques, d'autres présentent une activité pseudo-catalasique faisant intervenir des enzymes sans hème.

Dans le lait outre l'action directe du peroxyde d'hydrogène sur certains contaminants, le système lactoperoxydase-thiocyanate-peroxyde d'hydrogène a un rôle dans l'inhibition qui est due à l'interaction entre trois composés : la lactoperoxydase, le thiocyanate et le peroxyde d'hydrogène.

- La lactoperoxydase catalyse l'oxydation du thiocyanate par le peroxyde d'hydrogène en formant un composé inhibiteur.
- La lactoperoxydase et le thiocyanate sont présents initialement dans le lait ; le peroxyde d'hydrogène est produit par les bactéries lactiques. Le facteur limitant de ce système est le H_2O_2 . L'addition au lait de peroxyde à faible concentration peut rendre ce système actif contre certaines espèces Gram négatifs, même catalase positive Comme *E. coli*, *Salmonella* ...etc.

Chapitre II : les bactéries lactiques

□ Le chauffage du lait, en inactivant la Lactoperoxydase (70 °C, 20 minutes ou 82°C, 20 secondes) supprime cette inhibition .

II.4.5 Action de diacétyle

Le diacétyle produit par de nombreuses bactéries lactiques, est un inhibiteur actif contre de nombreux microorganismes. L'action inhibitrice est accrue en milieu acide, les bactéries à Gram négatif sont plus sensibles au diacétyle que celles à Gram positif. Cependant les concentrations nécessaires pour avoir une inhibition sont très supérieures à celles rencontrées dans les aliments (100 ppm pour les *Pseudomonas* qui sont les genres les plus sensibles). La production de diacétyle ne peut donc à elle seule être responsable des inhibitions dues aux bactéries lactiques (**Beliard et Thuault, 1989**).

II.5 Production de bactériocines

Une bactériocine est une substance de nature protéique possédant une activité antimicrobienne produite par une bactérie. La production d'une bactériocine peut être considérée comme une façon d'éliminer des bactéries envahissantes (**Nissen-Meyer et al., 1997**).

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

Morisset et al. (2005), ont montré que certaines bactériocines possèdent un large spectre d'activité qui inclut des bactéries éloignées au point de vue phylogénétique.

Le nom de bactériocine est généralement dérivé du germe ou de l'espèce bactérienne productrice: Colcine (*d'Escherichia coli*), helveticine (*Lb. helveticus*), pediocine (*Pediococcus sp.*), sakacine (*Lb. sakei*), Leucocine (*Leuconostoc sp.*) .

Chapitre II : les bactéries lactiques

II.5.1 Classement des bactériocines

Les bactériocines ont été divisées en quatre classes (**Klaenhammer, 1993**). Cependant, aucune bactériocine de *Lactococcus lactis* n'appartient aux classes III et IV. Un classement en deux groupes, plus pratique pour *L. lactis* a été proposé (**Nissen-Meyer et al., 1997**) :

□ **Groupe I** : Le groupe I ou classe I selon **Klaenhammer (1993)**, comporte des petites bactériocines nommées lantibiotiques. Il s'agit de peptides dont la taille est inférieure à 5 KDa. Ces peptides conservent leur activité après une exposition à la chaleur. Ils se composent d'un nombre variable d'acides aminés : la lanthionine, la B-méthyllanthionine et les résidus déshydratés (déhydroalanine et déhydrobutyrine). Quelques bactériocines ayant été identifiées comme appartenant à ce groupe sont : Carnocine U149, Cytolycine, lacticine 3147 , Lacticine 481 , Lactocine S et nisine.

□ **Groupe II** : Le groupe II ou classe II selon **Klaenhammer (1993)**, inclut des peptides de taille inférieure à 10 KDa. Ces peptides demeurent également stables après un traitement à la chaleur. Ce groupe comprend deux sous-groupes, nommés IIa et IIb.

Un autre sous-groupe avait été proposé par **Klaenhammer (1993)**, celui des bactériocines thiol-activées comme la lactococcine B qui était la seule connue (**Venema et al., 1997**).

□ Le sous-groupe II est composé des bactériocines formées d'un seul peptide.

Certaines de ces bactériocines sont apparentées à la pédiocine. Ces peptides ont la particularité d'être actifs contre le genre *Listeria*. Parmi ces bactériocines : Bavaricine MN ; carnobactériocines BM1 et B2 , curvacine A , enterocine A , Leucocine A , pediocine PA1 et sakacine P.

□ Le sous-groupe IIb comprend les bactériocines dont l'activité nécessite la présence de deux peptides distincts. Les deux peptides doivent être présents en quantités approximativement équivalentes pour obtenir une activité optimale (**Nissen-Meyer et al., 1997**).

Les bactériocines appartenant à ce sous-groupe sont : lactacine F , Lactobine A , Lactococcine G , Pédiocine L50 , Thermophiline 13.

□ **Groupe III et IV** : Ces deux groupes supplémentaires ont été proposés par **Klaenhammer** en 1993. La classe III regroupe les bactériocines de haut poids moléculaire (plus de 30 KDa). Ces bactériocines sont sensibles à la chaleur La classe IV comporte les

Chapitre II : les bactéries lactiques

bactériocines composées d'une partie non protéique nécessaire à l'activité inhibitrice (sucre ou lipide). Cependant, aucune bactériocine produite par *L. lactis* n'appartient à l'une de ces deux classes (**Jiménez – Diaz et al., 1995**).

II.5.2 Caractéristiques biochimiques des bactériocines de *Lactococcus lactis*

Plusieurs bactériocines produites par la bactérie *L. lactis* ont été identifiées et caractérisées étant donné l'intérêt porté à ces bactéries, très utilisées dans l'alimentation. Les caractéristiques biochimiques de ces peptides peuvent contribuer à les identifier et les distinguer :

□ La souche productrice de la lacticine 3147 et *L. lactis* DPC3147 (**Ryan et al., 1996**).

La lacticine 3147 possède un large spectre d'inhibition. Elle est active contre certaines bactéries des genres suivants : *Acetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *staphylococcus* et *Streptococcus*. Deux peptides sont nécessaires à son activité antimicrobienne puisque la combinaison de deux fractions résultant d'une purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), sur matrice de C18, est nécessaire pour que cette bactériocine exprime son activité.

□ La lacticine 481 (connue aussi sous le nom de Lactococcine DR) est un lantibiotique produit par deux souches de *L. lactis* : CNRZ 481 et ADRIA 85L030 (**Piard et al., 1990 ; Rincé et al., 1994**). Ce lantibiotique possède un large spectre d'inhibition, étant entre autre actif contre *clostridium tyrobutyricum*, un traitement d'une heure à 100 °C, lorsque le pH de la protéine est maintenu entre 4,5 et 7 n'affecte pas l'activité de la bactériocine. La bactériocine est inactivée par l' α -chymotrypsine, la ficine, la pronase et la protéinase K. L' α -amylase, la lipase, la phospholipase, la présure et la trypsine n'affectent pas l'activité de la protéine.

□ La lactococcine R est produite par la souche R de *L. lactis ssp. crémoris* (**Yildirim et Johnson, 1998**). Son spectre d'inhibition est large puisque ce peptide est actif contre certaines bactéries du genre *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listéria*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconotoc*, *Streptococcus* et *Pediococcus*. Elle n'est pas active contre les bactéries à Gram négatif testées jusqu'à ce jour.

L'activité de la lactococcine R reste stable après un traitement de 15 minutes à 121 °C, son activité est conservée de pH 2,0 à pH 9,0. Les protéases α -chymotrypsine, pepsine, Pronase E et Protéinase K affectent son activité, tandis que l'amylase, la catalase, la cellulase, la

Chapitre II : les bactéries lactiques

dextranase, la lipase, le lysozyme, la papaine, la peroxydase, la trypsine ainsi que divers solvants organiques ne l'ont pas affectée.

□ Il existe deux types de nisine, la nisine A et la nisine Z (**Mulders et al., 1991 ; Steen et al., 1991**). Ces deux bactériocines ne diffèrent que par un seul acide aminé. La nisine A possède, à la position 27 un résidu histidine tandis que sur la nisine Z on y retrouve un résidu asparagine. La nisine est produite par plusieurs souches de *L. lactis* ssp. *Lactis*, dont la souche *L.lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 pour la nisine A et la souche *L. lactis* ssp.*lactis* NIZO22186, dans le cas de la nisine Z, ce lantibiotique possède un large spectre d'inhibition.

La nisine inhibe en effet la majorité des bactéries à Gram positif dont *Listeria* et *Clostridium*, tandis que les Gram négatif sont généralement résistantes à la nisine. L'activité de la nisine est moins sensible à la chaleur à pH acide, étant stable à 115,6 °C à pH 2.

La nisine est inactivée par l' α -chymotrypsine, la Pancréatine et la subtilopectidase, mais pas par la carboxypeptidase A, l'élastase, la pepsine et la trypsine.

□ La diplococcine est produite par plusieurs souches de *L. lactis* ssp. *crémoris* (**Davey et Richardson, 1981**). Le spectre d'inhibition de cette bactériocine se limite à des bactéries de l'espèce *L. lactis* ssp.*cremoris*. L'activité de la diplococcine résiste à un traitement de 100 °C pendant une heure à pH 5. La protéine est sensible à l' α -chymotrypsine, la pronase et la trypsine mais elle résiste à l'action de la pepsine.

□ La Lactococcine A est produite par les souches 9B4 et LMG2130 de *L. lactis* ssp. *crémoris* et *L.lactis* biovar. *diacetyllactis* (**van Belkum et al., 1991**). Le spectre d'inhibition de ce peptide est restreint n'affectant que des lactocoques et quelques autres bactéries à Gram positif. La protéine s'avère inactivée par les endoprotéases.

II.5.3 Caractéristiques des déterminants génétiques

La synthèse des bactériocines par les bactéries est régie par des gènes dits "facteurs bactériocinogènes" qui sont porté soit par des chromosomes, soit par des éléments extrachromosomiques tels que les plasmides (**Morisset et al., 2005**).

En parallèle à la production de bactériocine, les bactéries synthétisent une protéine dite d'immunité qui leur permet de contrôler l'action du composé antagoniste par exemple des

Chapitre II : les bactéries lactiques

gènes NISI et Nis FEG sont impliqués dans l'immunité cellulaire à la nisine. Les facteurs bactériocinogènes et la protéine d'immunité sont portés par le même gène (**Le Loir et al., 2001**).

II.5.4 Mode d'action

Selon Tagg et al. (1976), le mode d'action des bactéries comporte deux étapes :

- L'adsorption de la bactériocine sur les récepteurs spécifiques ou non spécifiques de la membrane des cellules sensibles .
- modification pathologique de la cellule cible.

L'action des bactériocines se manifeste par la formation des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles et la fuite des constituants cellulaires (ATP, K⁺) qui ont un rôle dans le maintien et l'équilibre des réserves énergétiques et du pH intracellulaire. Cette perte de l'intégrité induit la baisse de la synthèse des macromolécules (ADN, ARN, protéines) (**Chung et al., 2000**).

Afin de déterminer la nature des récepteurs, **Corbier et al. (2001)** ont traité les parois cellulaires des bactéries sensibles à la pédiocine ACH (issue de *Pediococcus acidilactici*) avec le méthanol, le chloroforme et le trichloroacétique, ils ont extrait une fraction contenant l'acide lipotéichoïque (LTA) qui semble intervenir dans l'attachement de la pédiocine, ACH. Ce phénomène n'est observé que chez les bactéries à Gram positif.

Les bactériocines peuvent avoir trois types d'effets :

- Effet bactériostatique : se manifeste par un ralentissement ou arrêt de la croissance telle que la lactocine 27 (**Piard et al., 1992**).
- Effet bactéricide : se traduit par une perte de la viabilité avec une lyse cellulaire, telles que la nisine et la curvacine IFPL 105 (**Casla et al., 1996**).
- Effet bactéricide sans lyse cellulaire telle que la pédiocine SII (**Schved et al., 1994**).

II.5.5 Facteurs influençant la production de bactériocines

□ **Souche microbienne**: Différentes espèces de bactéries lactiques sont capables de produire des bactériocines. **Yang et Ray (1994)** ont constaté que le taux de production de nisine et Leucocine varie selon la souche. **De vuyst, (1994)** a sélectionné 21 souches de *Lactococcus lactis* productrices de nisine et 06 de la même espèce 1886 UI/ml. Cette

Chapitre II : les bactéries lactiques

différence entre les souches d'une même espèce est attribuée à la différence du niveau d'expression et d'activité des enzymes de maturation.

□ **Composition du milieu** : La production de bactériocine est affectée par le type et le taux de sources de carbone, d'azote, de phosphates ainsi que la présence de cations de surfactants et d'inhibiteurs.

□ **Source de carbone** : La nisine Z peut être produite sur différentes sources de carbone (glucose, xylose et saccharose) (**Matsusaki et al., 1996 ; Chinachoti et al., 1997**).

Biwas et al. (1991) ont constaté que le saccharose est la meilleure source de carbone que le glucose pour la production de l'enterocine 1146.

□ **Source d'azote** : La source d'azote est un facteur limitant pour la croissance des bactéries lactiques et la production de bactériocines. **De Vuyst et Vandamme (1993)** ont étudié l'effet de l'azote organique sur la production de la nisine, il en ressort que l'extrait de levure est une bonne source d'azote, un taux supérieur à 2000 UI/ml a été obtenu.

□ **Effet des ions et des surfactants** : La nature des ions (phosphate) et des cations (Ca^{2+} et Mg^{2+}) affecte la production de substance inhibitrice. Le phosphate inorganique augmente la production de nisine Z issue de *Lactococcus lactis* Ni 022186. Des taux de 3500 UI/ml de la nisine ont été obtenus en utilisant 50 g/l de K_2HPO_4 (**De Vuyst, 1995**). L'addition de CaCl_2 (0,1 mole/l) permet d'obtenir une concentration maximale de nisine Z. Ceci s'explique par le fait que les ions calcium augmentent l'immunité cellulaire .

La souche productrice en protégeant l'intégrité de la membrane cytoplasmique et en augmentant l'activité des peptidases (**Matsusaki et al., 1996 ; Chinachoti et al., 1997**).

Le rôle des ions Mg^{2+} a été démontré par addition de 0,05 % de MgSO_4 dans le milieu, la biomasse et la production de bactériocine sont stimulées (**Daba et al., 1993**).

□ **Conditions de fermentation** : La croissance des bactéries lactiques et la production de bactériocines peuvent être contrôlées par la mesure du pH. Le pH optimal de production du composé antagoniste (nisine) est entre 5,5 et 6,0 (**Chinachoti et al., 1997**).

Le type de fermentation a aussi fait l'objet d'étude, une concentration maximale de nisine a été obtenue en fermentation continue de *Lactococcus lactis subsplactis* (**Wan et al., 1995**).

La température optimale de production de bactériocines est en relation avec la température optimale de croissance de la souche productrice. Une production maximale a été observée, à 30 °C pour la nisine et la Sakacine A, à 37 °C pour la pédiocine et à 25 °C pour la Leucocine (**Yang et Ray, 1994**).

Davey et Richardson (1981) ont trouvé que la diplococcine est synthétisée durant la phase de croissance. Pour la nisine, elle a lieu lorsqu'on dépasse la moitié de la biomasse formée.

Chapitre II : les bactéries lactiques

Cependant un temps d'incubation excessif, conduit à une perte d'activité, ceci est dû à la sécrétion d'enzymes protéolytiques et à l'apparition d'inactivateurs spécifiques à ces substances (**Hurst, 1981**).

II.5.6 Domaines d'application des bactériocines

La sécurité alimentaire est devenue depuis quelques années un enjeu majeur de l'industrie agroalimentaire mondiale. Aux Etats-Unis, une étude récente montre que 76 millions de cas par an d'intoxications alimentaires, conduisent à 5000 décès (**Schved et al., 1994**).

Les agents les plus fréquemment impliqués dans ces pathologies sont d'origine bactérienne. Le coût annuel des maladies liées aux contaminations par *Compylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* et *Toxoplasma gondii* a été estimé, toujours aux Etats-Unis, dans une fourchette comprise entre 6.5 et 35 milliards de dollars (**Yang et Ray, 1994**).

Les alertes récentes, portant en particulier sur les contaminations par *Listeria monocytogenes*, ont conduit tous les acteurs de la filière agroalimentaire, industriels, pouvoirs publics et consommateurs, à rechercher de nouvelles méthodes de préservation alimentaire (**Morisset et al., 2005**).

La demande des consommateurs d'une nourriture à la fois la plus saine et la plus "naturelle" possible a conduit les acteurs du secteur agroalimentaire à se détourner des agents chimiques. En conséquence, l'intérêt pour les agents antimicrobiens "naturels" n'a cessé de croître.

Les bactéries lactiques sont depuis des millénaires utilisées pour leur qualité de "préservateurs" alimentaires. Cette préservation vis-à-vis des contaminants bactériens peut s'exercer selon deux schémas non exclusifs qui sont la compétition pour les nutriments et la production de métabolites tels que les acides organiques, dont bien entendu l'acide lactique, mais également de diacétyle, l'acétoïne, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines. Tous ces composés participent au contrôle de la flore bactérienne et ont un impact important sur la durée de vie de l'aliment ainsi que sur ses qualités gustatives (**Morisset et al., 2005**).

Aujourd'hui seule la nisine est autorisée par la F.A.O à être utilisée comme additif dans les industries agroalimentaires car elle répond aux critères suivants :

Chapitre II : les bactéries lactiques

- Produite par un microorganisme normalement utilisé dans les fermentations alimentaires.
- Sensible à l' α -Chymotrypsine (la nisine résiduelle dans les aliments sera digérée au niveau du tractus digestif).
- non toxique.

En ce qui concerne les autres bactériocines bien que répandant à ces critères, leur application reste toujours au stade de laboratoire (**Morisset et al., 2005**).

L'ajout de bactériocines dans les aliments permettrait non seulement de commercialiser des produits plus sains et plus sécuritaires mais aussi de diminuer l'emploi de conservateurs chimiques (**Klaenhammer, 1998**).

□ **Produits laitiers** : Les travaux de **Thuault et Quimper, (1997)** ont montré que lorsque les bactéries lactiques productrices de bactériocines étaient utilisées dans la fabrication du fromage à pâte molle, il y avait une réduction d'un facteur de 10 du taux de *Listeria monocytogènes*.

Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'utilisation de la nisine (2000UI/g) dans le fromage blanc, au bout de trois jours d'incubation à 20 °C (**Ferreira et Lund, 1996**).

La nisine est également utilisée au cours des procédés de fabrication du yoghourt pour diminuer les contaminations dues aux bactéries à Gram positif (*Bacillus et Listeria*).

Cependant l'inhibition de ces germes nécessite de fortes concentrations de nisine (entre 10 000 et 20 000 UI/ml) (**Morisset et al., 2005**).

Afin d'augmenter le spectre d'activité de la bactériocine (nisine), certains auteurs l'ont incorporée en combinaison avec d'autres agents conservateurs.

Thomas et Wimpenuy, (1996) ont constaté qu'à basse température (20°C) et à forte concentration de NaCl ((5,5 %) ; 100 UI/ml de nisine étaient suffisante pour inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*. **Nilson et al. (2005)** ont rapporté qu'il y'avait une action synergique de la nisine (2,5 µg/ml) et du CO₂ (100 %) sur l'inhibition de *listeria monocytogenes*. les bactériocines susceptibles d'être utilisées dans l'industrie de la viande et du poisson.

Richard, (1996) a rapporté qu'il fallait 5000 UI/ml de nisine pour inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes*,ensemencée dans la viande fraîche hachée et conservée à +4 °C. Une destruction de l'ordre de 99,9 % de la population initiale a été enregistré.

Katla et al., (2001) ont utilisé la Sakacine P (1,1 µg/g) seule ou en combinaison avec une culture de souche productrice *Lb. sakei* (103 CFU/g), ils ont observé une meilleure

Chapitre II : les bactéries lactiques

conservation à 10 °C sous vide en utilisant la mixture que dans le cas où chacun des constituants était utilisé seul.

□ *Utilisation dans le domaine thérapeutique* : Certaines bactériocines seraient préconisées lors des infections dermatologiques, comme dans le cas des infections staphylococciques observées chez les brûlés, ou encore dans le domaine des cosmétiques (déodorants et dentifrices) (Kim, 1997).

Montville et al. (1999) ont émis la possibilité d'utiliser la nisine comme agent antituberculeux après avoir étudié son effet bactéricide sur *Mycobacterium smegmatis*.



CHAPITRE III :

Le tube digestif

Chapitre III : Le tube digestif

III. Généralités du système digestif

III .1. Structure du système digestif

Le système digestif est composé successivement de la cavité buccale, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jejunum et iléon), le caecum, le côlon ou gros intestin (côlon ascendant, côlon transversal et côlon descendant) puis se termine par le rectum et l'anus (Figure 3).

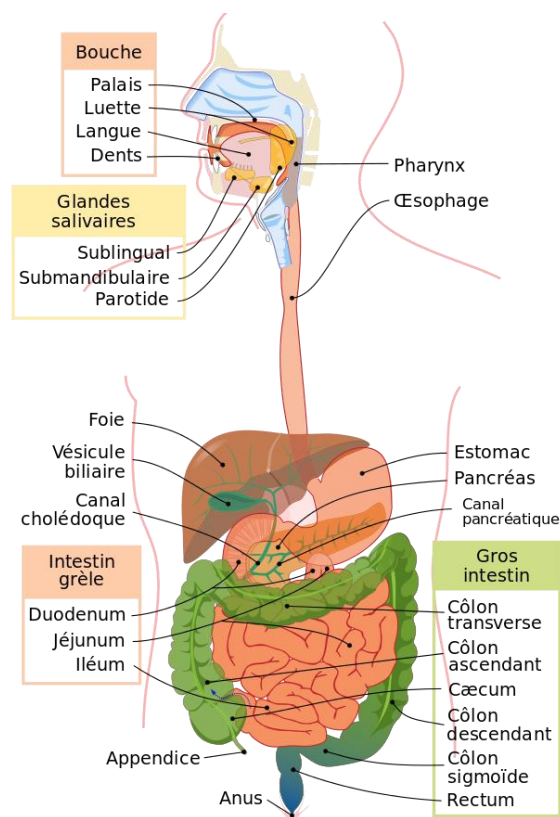


Figure 3 : Structure du système digestif (Villarrea, 2006).

La physiologie du tube digestif est constituée de 5 tuniques concentriques situées respectivement de l'extérieur vers l'intérieur de l'organisme (Figure4):

La muqueuse, qui comporte un épithélium de revêtement ainsi qu'un tissu conjonctif sous-jacent : le chorion ou *lamina propria*, qui lui-même contient des tissus lymphoïdes diffus ainsi que des follicules lymphoïdes. **La muscularis mucosae**, **la sous-muqueuse**, **la musculaire externe** comprenant la partie circulaire interne et longitudinale externe ainsi

Chapitre III : Le tube digestif

que la **tunique externe** constituée par un tissu conjonctif lâche qui la rend solidaire aux organes voisins (André *et al.*, 2002).

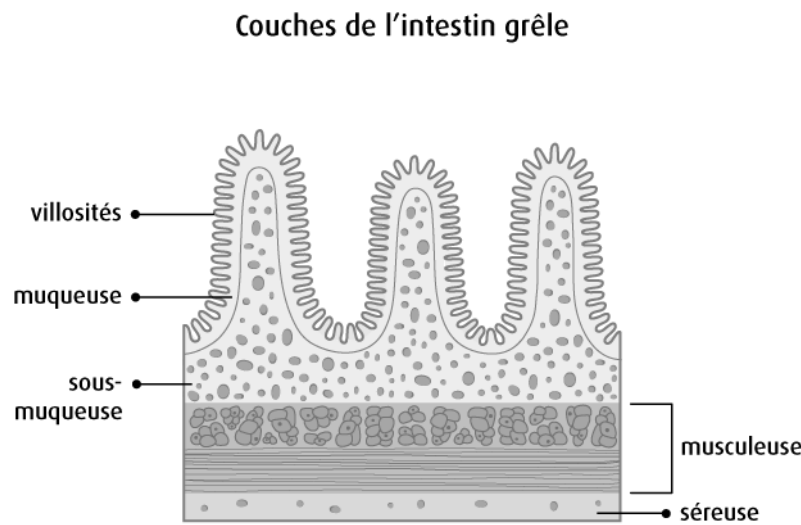


Figure 4 : Structure de l'intestin grêle.

La paroi du tube digestif comporte de nombreuses cellules immunitaires. Les plasmocytes et les lymphocytes T intra-épithéliaux (LTIE) sont principalement détectés au sein de l'épithélium. Les lymphocytes B (LB) et des plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines A (IgA) sont essentiellement répartis dans des follicules lymphoïdes au sein du tissu conjonctif du chorion de la muqueuse et de la sous muqueuse.

A présent, nous allons détailler la physiologie de la muqueuse, en particulier l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon, qui est en contact direct avec la lumière la composition du microbiote et les fonctions du système immunitaire intestinal.

• L'intestin grêle

L'intestin grêle mesure 4 à 7 m chez l'homme. Les parois sont recouvertes de plis circulaires, de villosités et de microvillosités formant la bordure en brosse, ce qui lui confère une surface d'échange avec la lumière de 400 m² en moyenne. Les sécrétions intestinales permettent de maintenir un pH neutre ou légèrement basique au alentour de 8. L'intestin grêle est le siège de phénomènes d'absorption mais joue également un rôle dans les phénomènes de sécrétion et participe à la réponse immunitaire. Il comprend le duodénum (0,25 m), le jejunum (2,5 m) et l'iléon (3,5 m).

La muqueuse de l'intestin grêle comprend un étage composé de villosités ainsi qu'un étage

Chapitre III : Le tube digestif

composé de glandes de Lieberkühn (ou cryptes) (Figure5) (Sergi, 1997; André *et al.*, 2002).

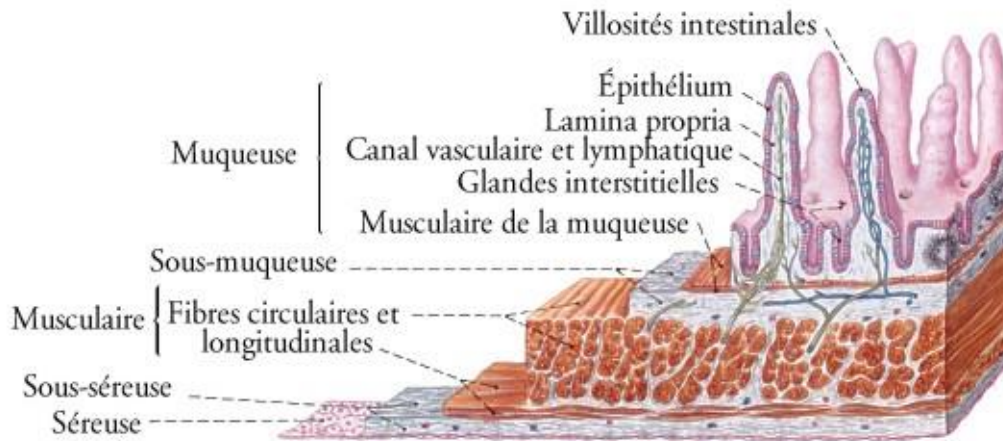


Figure 5 : La muqueuse intestinale.

Les villosités s'étendent vers la lumière et sont tapissées par l'épithélium prismatique simple constitué de plusieurs types cellulaires dont les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules neuroendocrines et au niveau de l'iléon, appartenant au système immunologique, les cellules « M ».

Les entérocytes sont les principales cellules de l'épithélium et sont plus spécifiquement responsables de la fonction d'absorption des nutriments. **Les cellules caliciformes** sont des cellules à mucus qui permettent de protéger l'intestin de l'agression des sucs gastriques mais qui jouent également un rôle dans la protection vis-à-vis des bactéries de la lumière.

Les cellules neuroendocrines sont responsables de la sécrétion hormonale.

Les cellules M, (microfold cells) situées au niveau des plaques de Peyer (amas constitués de 20 à 40 lymphoïdes situés principalement dans la partie terminale de l'iléon, dans le chorion et dans la sous-muqueuse), jouent un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire.

Les cryptes ou glandes de *Lieberkühn* sont composées de cellules immatures en prolifération donnant naissance à cinq types cellulaires : des cellules caliciformes, des entérocytes, des cellules « intermédiaires », des cellules neuroendocrines et au fond des cryptes les cellules de *Paneth*. Ces dernières, sont des cellules sécrétrices de lysozymes et

Chapitre III : Le tube digestif

de défensives qu'elles déversent dans la lumière des cryptes contribuant ainsi à l'effet barrière de la muqueuse intestinale.

Les cellules de l'épithélium ont un renouvellement très rapide (4 à 5 jours).

Des cellules souches pluripotentes sont situées au fond de la crypte, elles prolifèrent et les cellules filles issues de leur division se différencient pendant leur migration le long des villosités. Seules les cellules de *Paneth* restent au fond des cryptes.

Le côlon

De calibre plus large que l'intestin grêle, le gros intestin mesure environ 1,5 m de long, il comprend le côlon ascendant, transversal et descendant. Le pH est compris entre 4,7 et 7,5 respectivement dans sa partie proximale et distale. A la différence de la muqueuse de l'intestin grêle, le côlon ne comporte pas de villosités mais un épithélium plan (ou épithélium de surface), d'autre part, les cellules de *Paneth* y sont absentes. L'épithélium est constitué de colonocytes, cellules responsables de l'absorption de l'eau et des électrolytes, de cellules caliciformes et de cellules entéroendocrines. Le chorion lui, est riche en tissu lymphoïde. Les fonctions du côlon sont :

- 1) la déshydratation du bol alimentaire (absorption de l'eau et des électrolytes).
- 2) la digestion terminale de la cellulose et autres polysaccharides résistant à la digestion au niveau de l'intestin grêle par le microbiote et l'évacuation des déchets alimentaires.

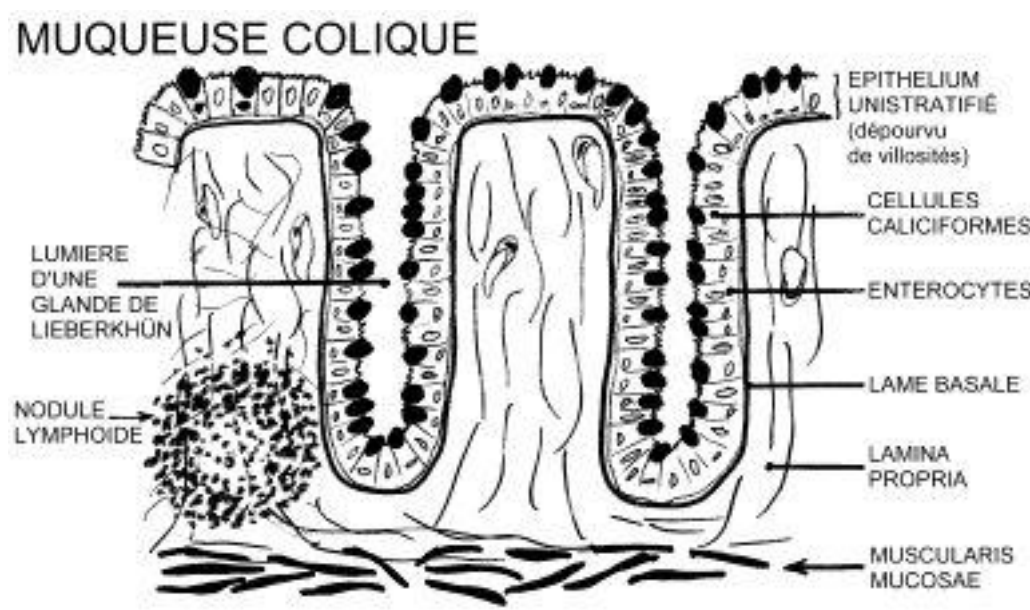


Figure 6 : La muqueuse colique.

Chapitre III : Le tube digestif

III .2. Le microbiote

L'écosystème microbien digestif est composé du microbiote, de l'hôte et des aliments ; il est responsable de l'homéostasie et participe au maintien de la santé de l'hôte.

Le microbiote comporte 10¹⁴ microorganismes vivant en symbiose avec l'hôte soit plus de 100 fois le nombre de cellules de l'organisme humain (Gill *et al.*, 2006). *In vitro*, le tube digestif est stérile, les premières colonisations se font principalement par la flore vaginale, intestinale et cutanée de la mère lors de la naissance, ainsi que par l'environnement extérieur (O'Hara and Shanahan, 2006). Sa composition va par la suite évoluer en fonction de l'environnement et de l'alimentation de l'hôte, pour se stabiliser vers les deux ans de l'individu. Chaque homme possède donc son propre microbiote, reflet de son environnement.

Chez l'individu sain, le microbiote, une fois stabilisé, ne subira que des changements ponctuels, conséquence de la prise d'antibiotiques ou d'un changement d'alimentation. Très complexe et diversifié, le microbiote est composé d'environ 1000 espèces différentes réparties selon trois *phylums* majoritaires, le *phylum* des Firmicutes représentant 79% du microbiote, constitué principalement de bactéries à Gram positif à bas GC. La plus grande majorité des espèces des Firmicutes appartient à la classe des Clostridu parmi lesquels on retrouve les groupes *Clostridium coccoïdes* et *Cl. Leptum*. Moins de 5% des autres espèces du *phylum* Firmicutes appartiennent aux classes Mollicutes et Bacillu .

Les deux autres *phylums* majoritaires sont *Bacteroidetes* et *Actinobacteria* qui représentent respectivement 17% et 3% de l'écosystème intestinal (Lay *et al.*, 2005; Tap *et al.*, 2009) (Figure 7).

Enfin, les autres *phylums* rencontrés sont principalement ceux des *Proteobacteria* et *Verrumicrobia* qui ne représentent que quelques pourcents des bactéries totales.

Les progrès effectués concernant l'analyse génomique des procaryotes a fait considérablement évoluer la taxonomie.

Anciennement basée sur l'analyse morphologique (coque/bacille) et phénotypique (coloration de Gram), elle est aujourd'hui basée sur l'analyse métagénomique *via* l'ARN ribosomique 16S. En effet, il s'est avéré que les précédentes techniques de classification ne permettaient pas d'obtenir une classification totale des espèces peuplant le microbiote mais uniquement des espèces cultivables qui ne représentent que 30% de l'écosystème intestinal.

Chapitre III : Le tube digestif

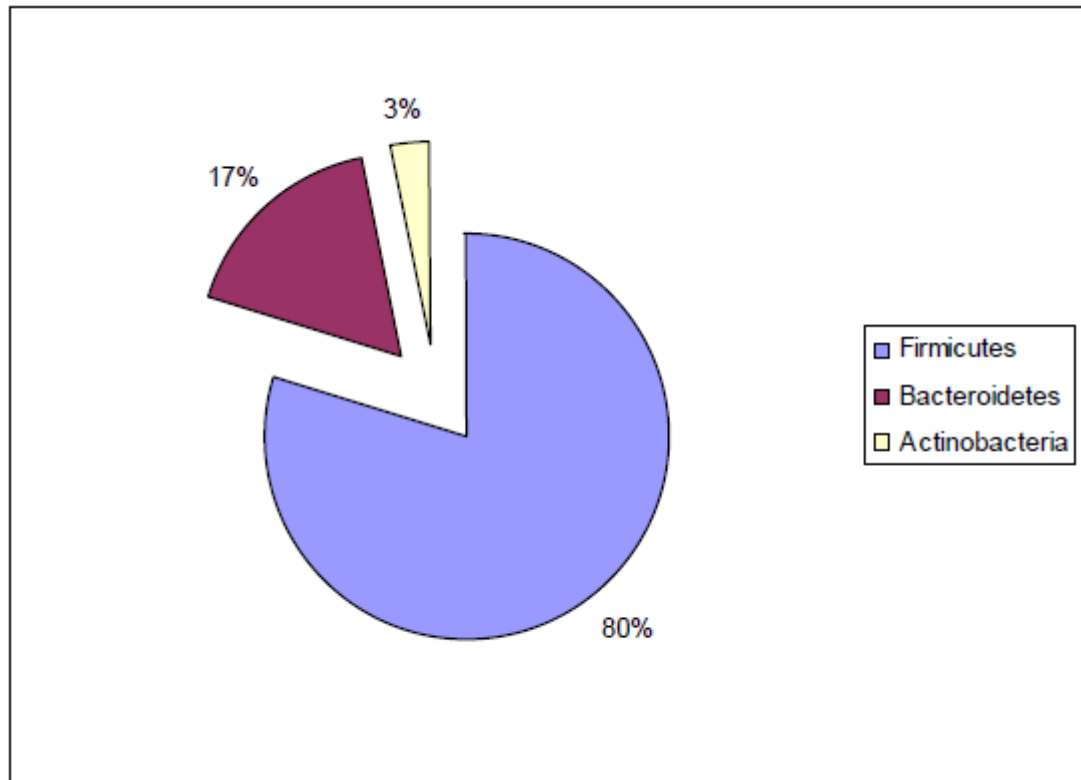


Figure 7 : Répartition des *phylums* majoritaires qui composent le microbiote intestinal (Tap et al., 2009).

Parmi les espèces rencontrées au sein du TD, 99% sont anaérobies. La concentration et la diversité bactérienne augmentent parallèlement avec l'augmentation du pH. La composition varie en fonction de la teneur en oxygène qui diminue le long du TD, ainsi, l'estomac est constitué d'environ 10⁴ unités formants colonies (UFC)/g de contenu, le duodénum Introduction bibliographique: généralités du système digestif et le jéjunum sont constitués de 10⁴ à 10⁷ UFC/g, la majeure partie étant des bactéries aérobies anaérobies facultatives (AAF) telles que des lactobacilles, des streptocoques ou encore des entérobactéries. Dans l'iléon, la proportion augmente de 10⁵ à 10⁷ UFC/g, principalement constitué de bactéries AAF et anaérobies telles que *Bacteroides*, enfin le côlon contient 10⁹ à 10¹¹ UFC/g de contenu principalement anaérobies strictes telles que *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium* et *Clostridium* (Butel and Collignon, 2004).

On peut distinguer le **microbiote endogène** ou **autochtone**, qui colonise principalement le côlon et qui est capable de se multiplier *in vivo*, du **microbiote en transit** ou **allochtone**, qui provient principalement de l'alimentation et persiste peu de temps au sein du TD.

Les principales fonctions du microbiote peuvent être définies selon 3 catégories:

Chapitre III : Le tube digestif

Les fonctions métaboliques : le microbiote réalise la fermentation des résidus alimentaires non digestibles et produit ainsi des acides gras à chaînes courtes tels que le butyrate, de l'énergie et des vitamines essentielles au développement de l'hôte (**Wong *et al.*, 2006; Macfarlane and Macfarlane, 2007**).

Les fonctions trophiques : le microbiote participe au développement de l'anxiogènes de l'intestin *via* les cellules de *Paneth*, et aide ainsi au développement du système immunitaire (**Stappenbeck *et al.*, 2002; Macpherson and Harris, 2004**).

Les fonctions de protection : le microbiote permet d'augmenter l'effet barrière de la muqueuse intestinale en colonisant les sites de fixation à la muqueuse du TD, en créant une compétition vis-à-vis des nutriments ou encore en libérant des composés anti-microbiens luttant ainsi contre les bactéries pathogènes (**Hooper *et al.*, 2003**).



**Matériel et
Méthodes**

IV- Matériel et méthodes**IV- 1- Objectif**

L'objectif de notre étude consiste à tester le comportement de quelques souches lactiques vis-à-vis des conditions du tube digestif in vitro par étapes. Ceci pour choisir parmi les 32 souches

Celles qui sont capable d'être des probiotiques, si elles possèdent les autres caractéristiques (Avoir un effet bénéfique sur l'hôte).

Pour réaliser cet objectif, nous avons passé par les axes suivants

- Test des croissances des souches à un pH de 2 (pH de l'estomac).
- Culture en anaérobiose des souches qui ont dépassé la première barrière.
- Vérification de la sensibilité aux antibiotiques.
- Test de croissance en présence de différentes concentrations des sels biliaires.

IV-2-Lieu d'étude

Cette étude a été effectuée au niveau du laboratoire de Microbiologie du Département de biologie, Université Ammar Thelidji Laghouat.

IV-3- Origine des souches

Les souches qui font l'objet de notre étude nous ont été ramenées sous une conservation. Elles ont été isolées à partir du lait de vache et de yaourt dans la région de laghouat les origines des 32 souches utilisées dans cette étude sont présenté dans le tableau 5.

Tableau 5 : L'origine des souches de bactéries lactiques (L 1-20. Y 1-12)

Lait de vache	yaourt
L1 ; L2 ; L3 ; L4 ; L5 ; L6 ; L7 ; L8 ; L9 ; L10 ; L11 ; L12 ; L13 ; L14 ; L15 ; L16 ; L17 ; L18 ; L19 ; L20.	Y1 ; Y2 ; Y3 ; Y4 ; Y5 ; Y6 ; Y7 ; Y8 ; Y9 ; Y10 ; Y11 ; Y12.

IV-4-Choix des milieux de culture

Les milieux de culture sont utilisés liquides ou solides après addition d'agar-agar.

Selon **Larpent, (1996)**, les milieux utilisés pour la culture des bactéries lactique tiennent compte dans leur composition des caractères essentiels de ces germes à la fois acidotolérants, mais aussi exigeants sur le plan nutritionnel tel que :

- **MRS (De Man Rogsa et Sharpe)** qui est utilisé pour réaliser les tests d'isolement et la culture.
- **Muller Hinton** qui est utilisé pour réaliser le test d'antibiogramme.

IV-5- Purification des souches

La purification consiste à effectuer des repiquages successifs de façon alternée en milieu MRS liquide et solide jusqu'à purification afin d'avoir des colonies bien distinctes pour nous aidées a caractérisé de celles des bactéries lactiques.

Pour la purification des souches sur milieu solide on utilisant la méthode de stries. Dès l'obtention sur les boites de Pétri de culture pure, on arrête la purification.

IV- 6- Confirmation de l'appartenance des souches au groupe lactique

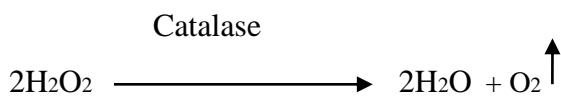
IV- 6-1-Coloration de Gram

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de Gentiane ; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courant, traité pendant une minute par une solution de lugol, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et en fait couler le solvant sur le frottis pendant 10 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. A ce stade, les cellules Gram négatif seront incolores, les cellules Gram positif seront violettes. On Soumet ensuite le frottis à une

contre coloration de 30 secondes à la fushine pour colorer les cellules Gram négatif présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif à immersion ($G \times 100$) (Singleton, 1999).

IV- 6-2. Test Catalase

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase. Celle-ci des compose l'eau oxygénéeselon la réaction suivante :



Le but de ce test c'est pour distinguer les bactéries lactiques (catalase -) et les entérobactéries (catalase+). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de Péroxyde d'hydrogène (10 volume) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O_2) (Marchal et al., 1991).

IV-7-Testes de croissance des souches en fonction de différentes conditions

IV-7-1 -Test de pH

Sachant bien que la tolérance à l'acidité des bactéries varie d'une espèce à une autre, et d'une souche à une autre au sein de la même espèce.

Pour tester la tolérance de nos souches à un pH extrême, nous avons procédé à l'ajustement du pH du milieu MRS liquide avec l'ajout de HCl jusqu'à $\text{pH}=2$ (pH de l'estomac) par l'utilisation d'une électrode de pH, relié à un enregistreur de données (pH-mètre).

Le milieu MRS dont le pH est ajusté à 2, est ensuite réparti en tubes en raison de 10 ml/tube, autoclavé à $121^\circ\text{C} \pm 1$ pendant 15 minutes et en finensemencé par nos souches à raison de 0.1 ml (1%) (Larpent, 1996).

Les cultures sont ensuite incubées à 37°C pendant 2h culture t₁ (Le passage d'aliment dans l'estomac).

Ensuite, la survie des bactéries dans des conditions extrêmes de pH est déterminée en réalisant à partir de culture t₁, un repiquage sur milieu MRS se fait par la méthodes d'ensemencements en surface.

La lecture s'effectue après l'incubation à 37°C pendant 48 h.

IV-7-2-Test d'anaérobiose (Larpent, 1996)

Ensemencer les 14 souches en stries à l'aide d'anse de platine sur le milieu MRS dans les boites de Pétri.

Pour assurer les condition d'anaérobiose pour nos souches de bactéries lactiques étudiées, les cultures (boites) sont incubées dans une jarre d'anaérobiose par la technique d'ensemencements en masse et en surface. Pour éliminer l'oxygène dans la jarre, les bougies sont allumées à l'intérieur. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 48 heures dans l'étuve.

IV-7-3-Test des sels biliaires

L'évaluation de la capacité de la tolérance aux sels biliaires des souches a été effectuée seulement pour les souches qui ont été capable de survivre à pH 2.

A cause du manque de produits (oxagale- sels biliaires déshydraté), on a réalisé des teste avec différents types de milieu; de culture qui contiennent les sels biliaires, et un autre essai avec les sels biliaires frais de bœuf à de différents concentrations.

IV-7-3-3- Essais avec la bile fraiche de bœuf à différents concentrations

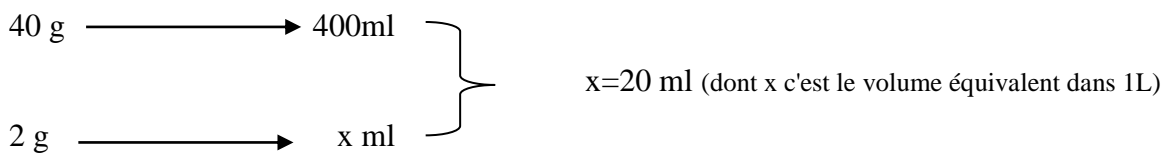
L'additionnement des sels biliaires dans le milieu MRS gélosé à raison d'une concentration finale de 0,2% ; 0,4% ; 0,6 % et 0,8 % (p/v).

La détermination de la quantité des sels biliaires frais en volume pour les concentrations Désigné 0,2%. ; 0,4%. ; 0,6%. Et 0, 8%, est réalisé par la manière suivante :

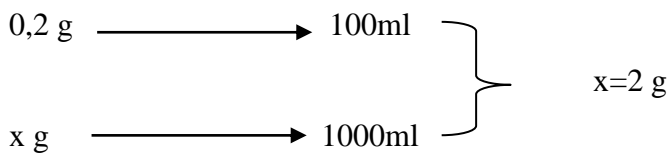
-Pour la concentration 0,2 %

D'après Guiraud (2003), 40g de sel biliaire déshydraté est l'équivalent de 400ml de la bile fraîche de bœuf.

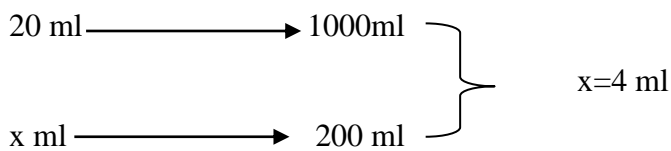
Pour obtenir une concentration de 0,2 (p/v) on calcule le volume de sels biliaires frais à ajouter dans 1 litre du milieu de culture.



-On cherche le volume équivalent de 2g dans un 1L.



-Après on calcule pour 200ml.



-C'est les mêmes étapes pour les autres concentrations (0,4 ; 0,6 et 0,8 %)

Pour les concentrations 0,2% ; 0,4% ; 0,6 % et 0,8%, on ajoute respectivement les volumes suivant : 4 ml, 8 ml, 12 ml, 16 ml de sels biliaires frais dans 4 flacons avec l'ajout du milieu MRS gélose de volume 196, 192, 188 et 184 respectivement à raison d'avoir un volume total de 200 ml dans chaque flacon pour les autoclavés.

Le milieu MRS additionné des sels biliaires est ensuite coulé dans les boites de Pétri, ces

dernières sont ensemencées par les 14 souches qui présente une tolérance au pH 2 en stries à l'aide d'une anse de platine.

L'incubation s'effectuant toujours à 37°C et la croissance a été suivie pendant 48h.

IV-7-3-4-Teste d'antibiogramme

Le test d'antibiogramme a été effectué seulement sur les 14 souches parmi les 32 qui ont présenté une tolérance vis-à-vis du pH 2.

Nous avons réalisé un ensemencement de notre souche en inondant toute la surface de la gélose Muller Hinton avec 2 ml de culture bactérienne en bouillon. Des disques imprégnés de solution d'antibiotiques (5 disques d'antibiotiques) sont disposés en surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile.

Après incubation à 37°C pendant 48h pour les bactéries lactiques la sensibilité ou la résistance des souches est évaluée par la présence ou non d'une zone d'inhibition de croissance autour du disque d'antibiotique. Le résultat a été exprimé comme sensible (S), résistant(R) ou intermédiaire(I) à l'aide des abaques de lecture spécifique (**Larpent, 1996**).

Les antibiotiques utilisés dans ce test sont présentées dans le tableau 6

Tableau 6: le code et la dose de chaque antibiotique utilisé.

Antibiotique	Code	Dose
Ampicilline	AMP	10 µg
Penicillin-G	P	10 µg
Doxycycline	DO	30 µg
Gentamicin	CN	10 µg
Lincomycin	L	2 µg
colistine	CL	25 µg



**Résultats
et discussions**

V- résultats et discussions :

V-1-Résultats de purification et confirmation des souches

Les colonies de bactéries lactiques isolées sur MRS sont représentées dans la figure suivante :



Figure 8 : L'aspect macroscopique des bactéries lactiques sur milieu MRS solide et liquide après purification.

La purification de nos souches a été faite en se basant sur les critères macroscopiques des bactéries lactiques, qui sont :

Tableau 7 : caractéristique des colonies après purification

colonies	Contour et mesure	Couleur
Grosse colonies circulaires	contour régulier de diamètre 2mm.	blanchâtre,
Très petites colonies	diamètres inférieurs à 0.5 mm	blanchâtre,
Petites colonies	contour régulier. de diamètre 0.5 mm	jaunâtre
Petites colonies	contour régulier. de diamètre 0.5 mm	blanchâtre

V-2- Observation microscopique

Après la coloration de Gram, on est passé à l'observation microscopique au (G X 100) avec l'huile à immersion, où on a pu observer que les bactéries étaient Gram positives apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'associations comme il est représenté dans la figure 9.

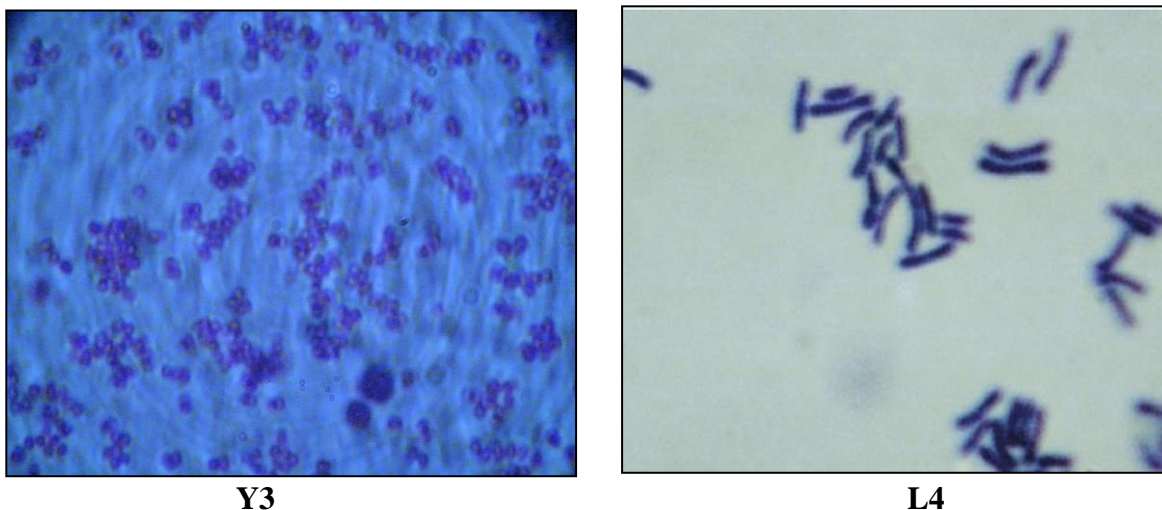


Figure 9 : Observation microscopique des souches lactiques avec grossissement $\times 100$.

L'observation microscopique des souches a montré que 28 sont des Cocci contre 4 bacille a les 32 souches, dont la majorité sont catalase (catalase négative). Les critères microscopiques de nos souches sont regroupés dans le tableau 8.

Tableau 8: l'observation microscopique de quelques souches.

souche	Coloration de gramme		Agencement	Activité catalisique
	gram	forme		
L1	+	coques	Chainettes, Dispersées	-
L2	+	Coques	dispersées	-
L3	+	Coques	Dispersées	-

L4	+	Bacilles	Amas	-
L5	+	Coques	Amas, Dispersées	-
L6	+	Coques	Amas, chainettes	-
L7	+	Coques	dispersées	-
L8	+	Coques	Diplocoques	-
L9	+	Coques	Diplocoques	-
L10	+	Coques	chainettes	-
L11	+	Coques	Amas	-
L12	+	Coques	Amas, chainettes	-
L13	+	coques	Dispersées	-
L14	+	coques	Amas	-
L15	+	coques	Amas	-
L16	+	coques	Dispersées	-
L17	+	coques	Dispersées ; Amas	-
L18	+	coques	Amas	-
L19	+	coques	chainettes	-
L20	+	coques	Amas	-
Y1	+	coques	Amas	-
Y2	+	bacilles	Dispersées ; chainettes	-
Y3	+	coques	Dispersées, Chainettes	-
Y4	+	coques	Dispersées	-
Y5	+	coques	Dispersées	-
Y6	+	coques	Dispersées ; Amas	-
Y7	+	coques	chainettes	-
Y8	+	coques	Dispersées ; paires	-
Y9	+	bacilles	Amas ; chainettes	-

Y10	+	bacilles	Dispersées	-
Y11	+	coques	Dispersées ; paires	-
Y12	+	coques	Amas	-

V- 3- Résultats du test de pH

Le test de survie des 32 souches on montre que 14 souches seulement ont présenté une tolérance variable à pH 2 sur le milieu MRS (figure 10).

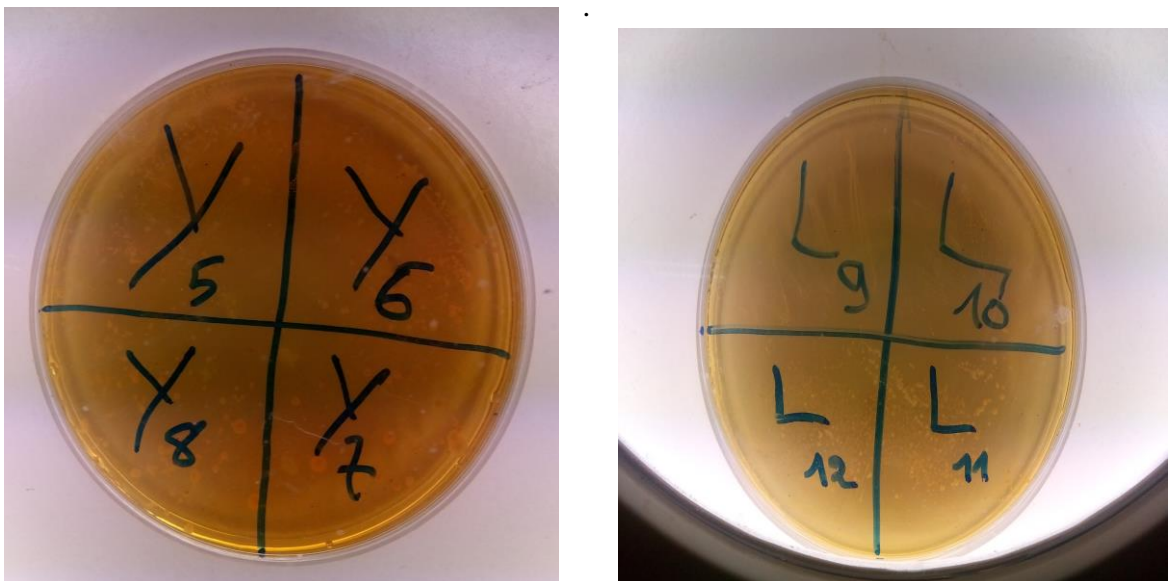


Figure 10 : La croissance des souches qui ont résisté à pH 2

Les résultats de la tolérance de nos souches à pH 2 sont montrés dans le tableau suivant :

Tableau 9 : résultats des comportement des souches lactiques vis-à-vis du pH

souches	tolérance
L1	-
L2	+
L3	-
L4	+

souches	tolérance
L17	-
L18	-
L19	-
L20	-

L5	-
L6	-
L7	-
L8	-
L9	+
L10	+
L11	+
L12	+
L13	+
L14	+
L15	+
L16	+

Y1	-
Y2	-
Y3	-
Y4	-
Y5	+
Y6	+
Y7	+
Y8	+
Y9	-
Y10	-
Y11	-
Y12	-

D'après plusieurs auteurs, (Conway et al., 1987 ; Chou et Weimer, 1999 ; Rallu, 1999), la capacité de survie à l'acidité gastrique varie beaucoup selon le genre et la souche. La différence constatée est liée essentiellement à la composition en acides gras de la paroi cellulaire des bactéries lactiques. Ce mécanisme de tolérance caractérise en particulier les genres *Pediococcus* et *Enterococcus* (Marteau et al., 2003; Gagnon et al., 2004).

V.4. Test d'anaérobiose

Les 14 souches qui ont présenté une tolérance du pH 2, ont toutes marqué une croissance plus ou moins importante en anaérobiose (**figure 11**).



Figure 11 : la croissance des souches de bactéries lactique en anaérobiose.

Puisqu'elles sont aéro-anaérobies facultatives, Selon (Pilet et al., 1998).. Les bactéries lactiques peuvent croître dans les deux milieux avec une préférence en anaérobiose

V- 5- Résultats du test des sels biliaires

Le tableau 9 présente les résultats de la tolérance des souches aux différentes concentrations des sels biliaires frais.

Tableau 10 : la tolérance des souches aux différentes concentrations des sels biliaires

Souches	0.2	0.4	0.6	0.8
L2	+	+	+	+
L4	+	+	+	+
L9	+/-	+/-	+/-	+/-
L10	+	+	+	+
L11	+/-	+/-	-	-
L12	+	+/-	-	-
L13	-	-	-	-
L14	+	+	+	+/-
L15	-	-	-	-
L16	+/-	+/-	-	-
Y5	+/-	+/-	-	-
Y6	-	-	-	-

Y7	+/-	+/-	+/-	+/-
Y8	+/-	-	-	-

(+) : fort croissance

(+/-) : croissance moyenne

(-) : faible croissance

Après le test de sels biliaires nous remarquons que :

-souches (L2 , L4 ,L10, L14) présentent une forte croissance

-souches (Y6, L13,L15) présentent une faible concentration

- souches restantes présentent une croissance moyenne ou variable

Notre résultat est cohérent avec ce de **Dutoit et al. (1998)**,

Nous avons remarqué que toutes les souches se développent en présence des sels biliaires à des différentes concentrations la tolérance des bactéries lactiques aux sels biliaires est liée à l'activité enzymatique (hydrolases de sels biliaires BSR) qui permet l'hydrolyse de ces substances conjuguées. Cette activité est observée particulièrement chez les souches isolées à partir des produits d'origine animale ou bien des selles (**Bateup et al., 1995 ; Tannock., 1999**). Donc c'est le cas de nos souches qui sont toutes isolées à partir du lait de vache et de yaourt.

Les variations observées sur la tolérance de nos souches aux différentes concentrations des sels biliaires sont dues probablement à la physiologie qui se diffère d'une espèce bactérienne à l'autre ainsi que d'une souche à l'autre dans la même espèce. Ceci est en accord avec les travaux de (**Marteau et al., 1996**) qui ont clairement démontré, in vitro, que les sels biliaires avaient un effet bactéricide de la même manière que l'acidité gastrique, cette étude démontre une différence dans la sensibilité aux sels biliaires entre les espèces bactériennes et entre les souches elles-mêmes. Les sels biliaires auraient un effet détergeant sur les membranes cellulaires ce qui a un effet sur la perméabilité cellulaires (**Tannock et al., 1999**).

V. 6- résultats du test d'antibiogramme

La figure 12 présente quelques résultats de l'antibiogramme réalisé sur les 14 souches lactiques acido-tolérantes.

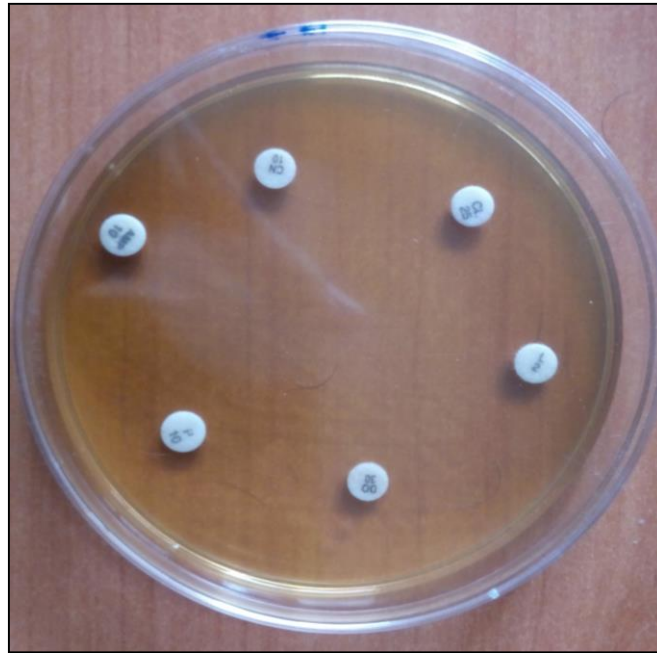


Figure 12 : résultat de l'antibiogramme de la souche L11

Les résultats d'étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques sont représentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : la sensibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques

S/Ant	AMP	P	DO	CN	L	CL
L2	R	R	R	s	R	R
L4	R	R	R	I	S	R
L9	R	R	R	s	R	R
L10	S	R	R	R	R	R
L11	R	R	R	R	R	R
L12	R	R	R	s	R	R
L13	S	R	R	I	S	R
L14	R	R	R	R	R	R
L15	R	R	R	s	R	R
L16	S	R	R	s	R	R
Y5	R	R	R	s	S	R
Y6	R	R	R	I	S	R
Y7	I	R	R	s	R	R
Y8	S	R	R	I	S	R

(R) : résistant (I) : intermédiaire (S) : sensible

Les résultats dans le, tableau 11 ont montré que toutes les souches testées sont résistantes aux antibiotiques : Penicillin-G , Colistine , Doxycycline .

Seulement 3 souches L10 , L11 et L14 sont résistant au Gentamicin

Pour le Lincomycin les souches présentant une sensibilité sont(L4 , L13 , Y5 , Y6 , Y8) et 4 sont sensibles à l'Ampicilline (L10 , L13 , L16 , Y8) .

Selon **Halami et al., (2000)**, la plupart des bactéries lactiques sont résistantes aux principaux antibiotiques. Cette résistance est marquée en particulier pour des *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus* vis-à-vis de la famille des Cyclines tels que le Doxycycline. La résistance aux antibiotiques peut être attribuée à la synthèse des enzymes contre ces derniers.

A graphic of a scroll with a grey shadow on the left side. The word "CONCLUSION" is written in bold, black, uppercase letters in the center of the scroll.

CONCLUSION

CONCLUSION

Conclusion:

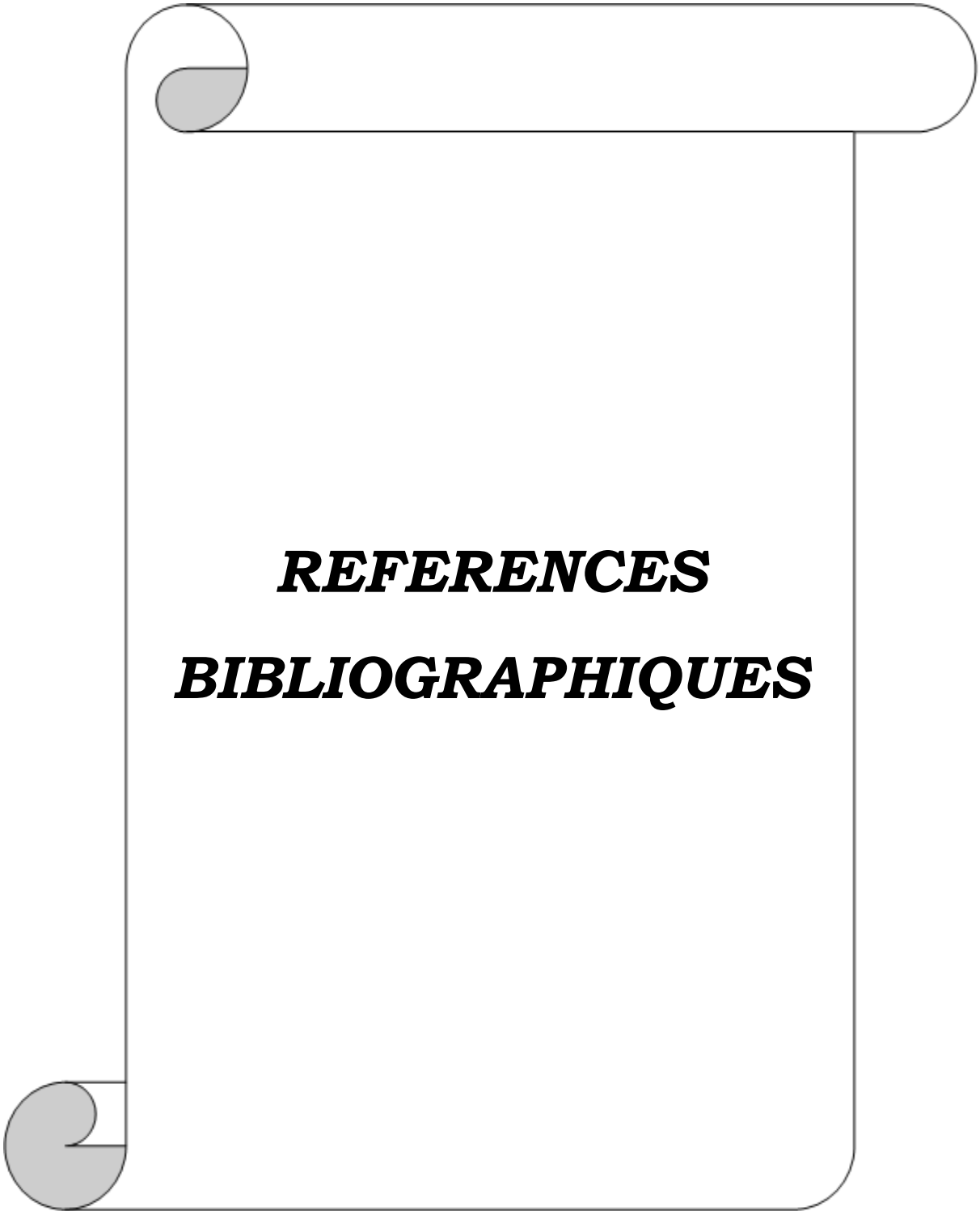
L'idée d'incorporer des microorganismes dans l'alimentation humaine ou d'utiliser des effets bénéfiques potentiels de la présence de ces microorganismes remonte à la plus haute antiquité. A l'heure actuelle, différentes études mettent en exergue l'effet bénéfique des bactéries et leurs innocuités liées aux caractères non pathogènes des souches utilisées.

Notre étude avait comme but de tester le comportement des souches de bactéries lactiques vis-à-vis des conditions du tube digestif in vitro.

Les 32 souches qui font l'objet de cette étude ont passé par quatre tests à savoir : le pH de l'estomac, l'anaérobiose, les sécrétions biliaires et la sensibilité aux antibiotiques.

Les résultats obtenus révèlent une tolérance du pH 2 par 14 souches parmi les 32. Pour l'anaérobiose et la résistance aux sels biliaires, toutes les souches qui ont montré une tolérance au pH de l'estomac ont réussi à passer par ces deux barrières. Le test de l'antibiogramme a montré que la plupart des souches ont développé une résistance à la majorité des antibiotiques utilisés ce qui est justifié par l'origine de ces souches prévenante des animaux déjà traités par ces substances.

Nous proposons comme suite à ce travail l'étude de l'effet probiotique, des propriétés technologiques et sanitaires par la détermination de la nature de leurs métabolites ainsi que le test in vivo de ces caractéristiques.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

-A-

Ahola, A.J., yli-knuutila, H., suomalaisen, T., poussa, T., ahlstrom, A., meurman, J.H., and korpela, R. (2002). short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. Arch oral biol 47: 799-804.

André, J.M., catala, M., Poirier, J. (2002). L'appareil digestive.

Url <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histop2/appdigest.html>

Axelsson L., 2004. Classification and physiology. In : lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects ((salminen s., wright a.v. et ouwehand a.). 3e ed., marcel dekker, inc. New york. 1-66.

-B-

Beliard, E., Thuault, D. (1989). Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. In : microbiologie alimentaire. Ed. : lavoisier : 282-293.

Bateup, J.m., Jenkinson, H et Tannock, G. 1995. Comparison of (Lactobacillus) strains with respect to bile salt hydrolase activity, colonization of the gastrointestinal tract and growth rate of murine host. Applied and Environmental Microbiology 61, Pp:] 147-1 149.

Bermudez-humaran, L.G., Langella P., Miyoshi a., Gruss, A., Guerra, R.T., montes de oca-luna r., Leloir, Y. (2002). Production of human papillomavirus type 16 e7 protein in lactococcus lactis. Appl. Environ. Microbiol ,68 :917-922.

Biwas, S.R., Johnson, M.C., Ray, B.(1991). Influence of growth conditions on the production of bacteriocin, pediocin ach by pediococcus acidilactic. H. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 1265-1267.

Bourgeois, C.M., Larpent, J.P. (1989). Microbiologie alimentaire vol. 2. Ed. Tec et doc.lavoisier, , paris : 343 – 408.

Bourgeois, C.M., Mescle, J.F., Zucca, J. (1996). Microbiologie alimentaire : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Techniques et documentation lavoisier. Paris.

Butel, M.J., Collignon, A. (2004) établissement et composition de la flore microbienne intestinale. In flore microbienne intestinale. Physiologie et path ologie digestives. Eurotext, l.j. (ed). Paris, pp. 19-35.

-C-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Casla, D., Requena, T., Gomez, R.** (1996). Antimicrobiol activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by lactobacillus carvatus ifpl 105. *J. Appl. Bacteriol*, 81: 1, 35 – 41.
- Chinachoti, N., Matsusaki, H., Sonomoto, K., Ishikazi, A.** (1997). Utilization of xylose as on alternative carbon source for nisin z production by lactococcus lactis 10 – 1. *J. Fac. Agric. Kyushu. Univ.* 42 : 171 – 181.
- Chung, H.T., Monteville, J.J., Chikindas, M.L.** (2000). Nisin depletes atp and proton motive force in mycobacteria. *Lett. Appl. Microbiol*, 31 , 6: 416 – 420.
- Coconier, M. H., Bernet, M.F., Kerneis, S., Chauviere G., Fourniat, J., Servin, A.L.** (1993). Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal caco-2 cells by lactobacillus acidophilus strain lb decreases bacterial invasion. *Fems microbiology letters*, 110: 299-306.
- Coombes, J.L., K.J., Maloy .**(2007). "control of intestinal homeostasis by regulatory t cells and dendritic cells." *semin immunol* .19(2): 116-26.
- Corbier, C., Kier, I., Mulliert, G., Vitoux, B., Et Revol-Junelles, A.M.** (2001). Biological activities and structural properties of the atypical bacteriocins mesenterocin 52b and leucocin b-ta33a. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 : 4 -10.
- Corthier, G., Drouault, Sophie.** (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Inra, edp science. Veterinaire reseach*, 32: 101-117.

-D-

- Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., Simard, R.** (1993). Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a stain of leuconostoc mesenteroides. *Appl. Microbiol. Biotech.* 39 : 166 – 173.
- Davey, G.P., Richardson, B.C.** (1981). Purification and some properties of diplococcin from streptococcus cremoris 346. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 : 46-54.
- Davey, G.P., Richardson, B.C.** (1981). Purification and some properties of diplococcin from streptococcus cremoris 346. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 : 46-54.
- Devuyst, L.** (1994). Nisin production variability between natural lactococcus lactis subsp lactis strains. *Biotechnol. Lett.* 16 : 287 – 292.
- Devuyst, L.** (1995). Nutritional factors affecting nisin production by lactococcus lactis subsp lactis nizo 22 186 in a synthetic medium. *J. Appl. Bacteriol.* 78 :28-33.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Devuyst, L., Vandamme, E.J.** (1993). Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp *lactis* batch fermentation using a complex medium. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 40 : 17 – 22.
- Dellaglio, F.** (1988). Starters for fermented milks, section 3: thermophilic starters in "*fermented milks, sciences and technology*". *Bulletin fil.* 227: 27-33.
- Dellaglio, F.** (1988). Starters for fermented milks, section 3: thermophilic starters in "*fermented milks, sciences and technology*". *Bulletin fil.* 227: 27-33.
- Deroissart, H.B., Luquet, M.** (1994). " bactéries lactiques" .vol i. Ed. Loriga. 605 p.
- Desmazeaud, M.** (1983). L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques, *le lait*, 63: 267-316.
- Dilmi Bouras, A.** (2006). Assimilation (in vitro) of cholesterol by yogurt bacteria, *ann. Agric. Environ. Med.*, 13 :49-53.
- Dilmi Bouras, A., Koïche, M., Tabti, M.** (2007). The effect of *Lactobacillus paracasei* on the rabbit's cholestolemia, *African journal of biotechnology*, vol.6 (24): 2840- 2845.
- Dilmi Bouras, A., Sadoun, D.** (2005). Les techniques de conservation des aliments, *revue: sciences et technologie*, 44, faculté de médecine vétérinaire.
- Dilmi Bouras, A., Sadoun, D.** (2002a). Effet du yaourt à *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* sur le cholestérol sanguin chez le lapin. *Médecine et nutrition*, 38 (1): 24-32.
- Doan-Thanh-Lam, Le.** (2011). Identification et caractérisation des déterminants physico-chimiques et biologiques mis en jeu dans l'adhésion de *Lactococcus lactis* à la mucine modèle pgm. Thèse de doctorat. Institut national des sciences appliquées de toulouse (insa toulouse).
- Drouault, S., Corthier, G.** (2001). Health effects of lactic acid bacteria ingested in fermented milk. *Vet. Res.* 32(2): 101-17.
- Drouault, S., Anba, J., Corthier, G.** (2002). *Streptococcus thermophilus* is able to produce a β -galactosidase active during its transit in the digestive of germ free mice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(2): 936-941.
- DuToit, M., Franz, C., Schillinger, U.N., Warles, B ., et Holzappel, W.H.,** 1998. Characterization and selection of probiotics *Lactobacilli* for a preliminary minipig-feeding trial and their effect on serum cholesterol level , faeces moisture contents *International Journal of Food Microbiology* 40, sz 93-104

-F-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

Ferreira, M.A., Lund, B.M. (1996) the effect of misin on listeria monocytogenes in culture mediunand long life cottage cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 22 6: 433-438.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365–378.

-G-

Ghadimi, D., Folster-Holst, R., Devrese, M., Winkler, P., Heller, K.J., Schrezenmeir, J.(2008). Effects of probiotic bacteria and their genomic dna on th1/th2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (pbmcs) of healthy and allergic subjects. *Immunobiology.* 213 : 677–692.

Gill, H. (1998). "stimulation of the immune system by lactic cultures." *international dairy journal*, 8: 535-544.

Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S. Et Al. (2006) metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312: 1355-1359.

Givry, L. (2006). Optimisation de la fermentation lactique sur sirop de son de blé et purification d'une arabinose isomérase de lactobacillus bifermentans, thèses de doctorat, université de champagne ardenne reims, 184p.

Guarner, f., schaafsma gj. (1998). *Probiotics. Int. J. Food microbiol.* 39: 237-238.

Gagnon, M ., Kheadr, E.E.,Le Blaya, G et Flissa, I., 2004. In vitro inhibition of Escherichia coli 0157:117 by bifidobacterel strains of human origin. *International Journal of food, Microbiology*, 92, Pp: 69-78.

Guarner, F., Malagelada, J.R. (2003) gut flora in health and disease. *Lancet* 361: 512-519.

Gueimonde, M., Salminen, S. (2003). Probiotics : efficacy in gut health promotion. *Nutrafoods.* 2(2):13-21.

Guiraud, J.P., Rosec, J.P. (2004). *Pratique des normes en microbiologie alimentaire.* Afnor. 237- 251.

Guiraud, J.P. (2003). *Microbiologie Alimentaire. Pouvoir pathogène-Notion d'immunologie Relation microorganismes êtres vivants.* Edition Dunod.Paris .pp :37-38.

Guiraud, J.P. (2003). *Microbiologie alimentaire.* Tec & doc, dunod. Paris. 90-292.

-H-

Haddie, J.M. (1986). Other streptococci. In : *bergey's manual of systematic bacteriology* (sneath p.h.a., mair n.s., sharpe m.e., holt j.g.w. et baltimore w.). 1 : 1070.

Hadef, S. (2012). Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales. Thèse de magister de microbiologie appliquée. Université kasdi merbeh-ouargla. 88p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

Halami, P.M., Chandrashekar, A., et Naud, K., 2000. Lactobacillus fariminis MD, a newer strain with potential for bacteriocins and antibiotic assay. Letters in Applied Microbiology. 30, Pp: 197-202.

Hassan, A.N., Frank, J.F., (2001). Starter cultures and their use. In: applied dairy microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.

Havenaar, R., Huisin't Veld, J.H.J. (1992).: *probiotics: a general view*. In: *Wood BJB: the lactic acid bacteria*, vol. 1: the lactic acid bacteria in health and disease, Chapman & Hall, New York, NY: 209–224.

Ho, T.N.T., Tuan, N., Deschamps, A., Caubet, R. (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the nem chua fermented meat product of Vietnam. Int. Workshop on food safety and processing technology. 134-142.

Hooper, L.V., Stappenbeck, T.S., Hong, C.V., Gordon, J.I. (2003) angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. Nat Immunol 4: 269-273.

Hurst A. (1981). Nisin. Adv. Appl. Microbiol. 27: 85-123. Ibrahim S. A. Et bezkorovainy A. (1993). Inhibition of E. coli by bifidobacteria. J. Food Protein, 56 : 713-715.

-J-

Jack, R.W., Tag, R.J., Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram positive bacteria. Microbiol. Rev. 59, 2 : 171-200.

Jimenez Diaz, R., Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Holo, H., Nes, I.F., Sletten; K.H. Et Warner, P.J. (1995). Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum lpco10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 4459 – 4463.

-K-

Katla, T., Moretro, T., Aasen, I.M., Holch, A., Axelsson, L., Naterstard, K. (2001). Inhibition of Listeria monocytogenes in cold smoked salmon by addition of Lactobacillus sakei and/or live Lactobacillus sakei cultures. Food Microbiol 18 , 4 : 431 – 439.

Khalid, N.M., Marth, E.H. 1990. Lactobacilli, their enzymes and role. In: ripening and spoilage of cheese. Rev. Dairy Sci. 73 : 158-167.

Kim, W.S. (1997). Nisin production by Lactobacillus lactis using two phase batch culture. Lett. Appl. Microbiol. 25,3: 169-171.

Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Fems Microbiol. Rev. 12 : 39 – 86

Klaenhammer, T.R. (1998). Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie. 70 : 337- 349.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

Koiche m. Et dilmi bouras, a. (2010). Selection of local extremophile lactic acid bacteria with high capacity to degrade lactose: potential use to reduce intolerance to lactose in vitro. African journal of biotechnology. Vol. 9(11) : 1635-1640.

-L-

Lachance, M. (2000). Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par lactococcus lactis ssp. Lactis mjc15. Thèse de grade de maître des sciences (msc).

Lay, C., Rigottier-Gois, L., Holmstrom, K., Rajilic, M., Vaughan, E.E., De Vos, W.M.. (2005) colonic microbiota signatures across five northern european countries. Appl environ microbiol 71: 4153-4155.

Larpent, J.P., 1996. Microbiologie Alimentaire (tome 2), Lavoisier. Paris. P: 33.

Le Loir, Y., Nouaille, S., Ribeiro, L., Commissaire, J., L'haridon, R., Gruss, A., Langella, P. (2001). Sécrétion de protéines d'intérêt thérapeutique chez lactococcus lactis. Lait, 81 : 217 – 226

Leclerc, H., Gaillard, F.L., Simonet, M. (1994). Les grands groupes de bactéries. In : microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. Doin. Paris. 445.

Lievin-Le Moal, V., Sarrazin-Davila, L.E., Servin, A.L. (2007). An experimental study and a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial to evaluate the antisecretory activity of lactobacillus acidophilus strain lb against nonrotavirus diarrhea. Pediatrics ,120, :795–803.

Lilly, D.M., Stillwell, R.H. (1965). Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147 : 747-748.

Loones, A. (1994). Les laits fermentés par les bactéries lactiques. Bactéries lactiques, coord. Lorica édition, 2 : 135 – 154.

Lopez, M., Li, N., Kataria, J., Russell, M., Neu, J. (2008). Live and ultraviolet-inactivated lactobacillus rhamnosus gg decrease flagellin-induced interleukin-8 production in caco-2 cells. Journal of nutrition. 138 : 2264–2268.

-M-

Macfarlane, G.T., Macfarlane, S. (2007) models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. Curr opin biotechnol 18: 156-162.

Macpherson, A.J., Harris, N.L. (2004) interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. Nat rev immunol4: 478-485.

Marchal, N. , Bourdon, J.L et Richard, C.L.,1991.les milieux de culture pour l'isolement et

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

identification biochimique des bactéries .3ème Ed .,Doin éditeurs. Paris

Marteau, P., Pochart, P. (1992). Survival of lactobacillus acidophilus and bifidobacterium sp. In the small intestine following ingestion in fermented milk. A rational basis for the use of probiotics in man. *Gastroenterol. Clin. Biol*,16 (1): 25-8

Marteau, P., Doré, J., Walbanks, S., Seksik, P et Lepage, P., 2003. Cellular and physiological effects of probiotics and prebiotics. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 4, Pp: 889-896.

Matsusaki, H. N., Endo, N., Sonomoto, K., Ishizaki, I. (1996). Lantibiotic nisin –z fermentive production by lactococcus lactis 10.1- relationship between production of the lantibiotic and lactate and all-growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45 : 36-40.

Matsusaki, H. N., Endo, N., Sonomoto, K., Ishizaki, I. (1996). Lantibiotic nisin –z fermentive production by lactococcus lactis 10.1- relationship between production of the lantibiotic and lactate and all-growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45 : 36-40.

Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S., Yokokara, T. (1998). Effect of oral feeding of lactobacillus casei strains shirota on immunoglobulin e production in mice j. *Dairy su* : 81 : 48 – 53.

Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P.H., Brassart , D., Verdu, E., Herranz, M., Felley, C., Porta, N., Rouvet, M., Blum, A.L., Corthesy-Theulaz, I. (1999). Effect of whey-based culture supernatant of lactobacillus acidophilus (johnsonii) la1 on helicobacter pylori infection in humans. *Digestion*, 60: 203-209.

Montville, T. J., Chung, H.J., Chikindas, M. L., Chen, Y. (1999). Nisin a depletes intracellular atp and acts in bactericidal manner against mycobacterium smegmatis. *Lett. Appl. Microbiol.* 28 : 189 – 193.

Moreau, M.C. (2001). "les probiotiques : des microorganismes bénéfiques pour notre système immunitaire ?" *cholé-doc* numéro 63. (janvier/février).

Morisset, D., Berjeaud, J.M., Frere, J., Hechard, Y. (2005). Bacteriocines de bactéries lactiques in « bactéries lactiques et probiotiques ». Ed. Tec et doc. Lavoisier p 113 – 194.

Mulders, J.W.M., Boerrigier, I.J., Rollema, H.S., Siezen, R.J. De Yos, W.M. (1991). Identification and characterization of a lantibiotic nisin z, a naturel nisin variant. *Eur. J. Biochem.* 201 : 581-584.

-N-

Nicoli, A.M., Penaud, A. (1985). *Elements de microbiologie relationnelle. La vie. Interrelations des êtres vivants.* Medsi.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

Nilson, L., Chen, Y., Chikindas, M.L., Huss, H.H., Gram, L., Montville, T.J. (2005). Cardon dioxide and nisin act synergistically on *listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2: 769 – 774.

Nissen-Meyer, J., Hauge, H.H., Fimland, G., Eijsink, V.G.H., Nes, I.F. (1997) . Ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria : their function, structure, biogenesis and their mechanism of action. *Recent. Res. Devel. Microbiol.* 1 : 141-154.

Novel, G. (1993). Les bactéries lactiques in «microbiologie industrielle" les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. Leveau, g.v., bouix, m. Techniques et documentation lavoisier. Paris. Pp. 171-215.

-O-

Ogier, J.C., Casalta, E., Farrokh, C., Saihi, A. (2008) . Safety assessment of dairy microorganisms: the *leuconostoc* genus. *Int. J. Food microbiol.* 126 : 286-290.

O'hara, A.M., Shanahan, F. (2006) the gut flora as a forgotten organ. *Embo rep* 7: 688-693.

Oozer, R., Goupil-Feuillerat, N. (2002). "lactobacillus casei is able to survive and initiate protein synthesis during its transit in the digestive tract of human floraassociated mice." *appl. Environ. Microbiol.* 68(7): 3570-4.

Orla-Jensen, S. (1919). The lactic acid bacteria. Copenhagen i, komission.

Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Gronlund, M.M., Isolauri, S.J. Salminen, S. (1999). Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International dairy journal*, 9: 623-630.

-P-

Pernoud, S., Schneid-Citrain, N., Agnetti, V., Breton, S., Faurie, J.M., Marchal, L., Obis, D., Oudot, E., Paquet, D., Robinson, T. (2005). Application des bactéries lactiques dans les produits laitiers frais et effets probiotiques. In « bactéries lactiques et probiotiques » ed. Tec. Et doc. Lavoisier : 3-12.

Piard, J.C., Desmazeud, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2- bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.* 72 : 113-142.

Piard, J. C., Delorme, F., Giraffe, G., Commissaire, J., Desmazeud, M. (1990). Evidence for a bacteriocin produced by *lactococcus lactis* cnrz 481. *Neth. Milk dairy j.* 44 : 143 – 158.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Piard, J.C., Kuipers, O.P., Rolleur, H.S., Desmazeaud, M.J., Devos, W.M.** (1993). Structure, organisation and expression of the ict gene for lacticin 481, a novel lantibiotic produced by lactococcus lactis. J. Boil.chem. 268 : 16361-16368.
- Pilet, M.F., Magras, C., Federighi, M.** (2005). Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (federighi m.). 2e ed., economica. Paris. 219-240.
- Pilet, M.F., Magras, C., Federighi, M.** (1998). Bactéries lactiques. In : manuel de bactériologie alimentaire (sutra l., federighi m., jouve j.l.). Polytechnica. Paris. 235-260.
- Playne, M., Salminen, S.** (2002). Health benefits of probiotics : human studies and clinical trials. Nutrafoods, 1(1):5-11.
- Pot, B.** (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In : bactéries lactiques de la génétique aux ferments (corrieu g. Et luquet f.m.). Tec & doc, lavoisier. Paris.1-106.
- Pot, B., Devriese, L.A., Uris, D., Vandamme, P., Haesebrouck, F., Kersters, K.** (1996). Phenotypic identification and differentiation of lactococcus strains isolated from animals. Syst. Appl. Microbiol. 19 : 213-222.
- Premi, V., Bottazi, V.** (1972). Hydrogen peroxide formation and hydrogen peroxid splitting activity in lactic acid bacteria. Milchwissenschaft, 27 : 265-267. Produced by a new strain of streptococcus sp. Inhibitory to gram positive foodborne pathogens. Research. Microbiol. 148: 757-766.

-R-

- Richard, J.** (1996). Utilisation de bactériocines pour la production des aliments plus sûrs : mythe ou réalité Lait. 76 : 179 – 189.
- Rince, A., Dufour, A., Le Pogam, S., Thuault, D., Bourgeois, C.M., Le Pennec, J.P.** (1994). Cloning expression and nucleotide sequence of genes involved in production of lactococcin dr, a bacteriocin from lactococcus lactis ssp. Lactis. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 1652 – 1657.
- Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C., Ross, R.P.** (1996). An application in cheddar cheese manufacture for a strain of lactococcus lactis producing a novel broadspectrum bacteriocin, lacticin 3147. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 612 – 619.

-S-

- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattilasanholm, T.** (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of biotechnology ,84(3): 197-215.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E.** (1996). Clinical uses of probiotics for stabilising gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 347-358.
- Sanders, M., Huis In't Veld, J.** (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market : microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76 :293-315.
- Schved, F., Lalzar, A., Lindner, P., Juven, B.J.** (1994). Interaction of the bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* sj1 with the cell envelope of *Lactobacillus* spp. *Cett. Appl. Microbiol.* 19 : 281-283.
- Schved, F., Lalzar, A., Lindner, P., Juven, B.J.** (1994). Interaction of the bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* sj1 with the cell envelope of *Lactobacillus* spp. *Cett. Appl. Microbiol.* 19 : 281-283.
- Sergi, R.** (1997) l'intestin grêle le reflet de notre image santé. In, p. 13.
- Sharpes, M.** (1981), the genus *Lactobacillus*. In: a handbook in habitats. Isolation and identification of bacteria, New York pp 1653-1679
- Singleton, P** (1984). Abrégés de bactériologie. Ed. Masson, Paris : 353 – 364.
- Singleton, P** (1999) . Bactériologie 4 Ème Edition . Dunod , Paris Pp : 3-4.
- Stappenbeck, T.S., Hooper, L.V., Gordon, J.I.** (2002) developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15451-15455.
- Steen, M.T., Chung, Y. J., Hansen, J.N.** (1991). Characterization of the nisin gene as part of a polycistronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC 11454. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1181-1188.
- Stiles, M.E., Holzappel, W.H.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36 : 1-29.
- Stiles, M.E., Holzappel, W.H.** (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36 : 1-29.
- Suarez, F., Savalano, D.A.** (1995). Lactose intolerance. *Food Technol.* 51
- Sutra, L., Federighi, M., Jouve, J.L.** (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Ed. : Polytechnica, Paris, 306 (6) : 31-249.

-T-

- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W.** (1976). Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40,3: 722-756.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Tamime, A.Y.**(2002). Microbiology of starter cultures. In: dairy microbiology handbook (robinson r.k.). 3e ed., john wiley and sons, inc., new york. 261-366.
- Tannock , G.W.** (1999): analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie van leenwenhoek*,76: 265-278.
- Tannock , G.W.** (1999a). The normal microflora: an introduction. In medical importance of normal microflora. Tannock, g. W., ed., pp. 1-23.
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.P.** (2009) towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ microbiol* 11: 2574- 2584.
- Thomas, L.V., Wimpenny, Z.T.** (1996). Investigation of the effect of combined variation in temperature and nacl concentration on nisin inhibition of listeria monocytogenes and staphylococcus aureus. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 6 : 2006 – 2012.
- Thuault, D., Qimper, A.** (1997). Interactions microbiennes : si leur maîtrise n'était conté. *Food-techno.* 17: 18 – 19.
- Tosukhowong, A., Nakayama, J., Mizunoe, Y., Sugimoto, S., Fukuda, D., Sonomoto, K.** (2005). Reconstitution and function of tetragenococcus halophila chaperonin 60 tetradecamer. *J. Biosci. Bioengin.* 99 : 30-37.
- Trebichavsky, I., Rada, V., Splichalova, A., Splichal, I.** (2009) cross-talk of human gut with bifidobacteria. *Nutr rev* 67: 77-82.

-V-

- Van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Geis, A., Kok, J., Venema, G.** (1992). Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol*, 55 : 1187 – 1191
- Van Der Waaij, D., Berghuis-De Vries, J.M., Lekkerkerk–Van Der Wees, J.E.C.** (1971). Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J. Hyg. (lond)*, 69: 405-11.
- Van Der Werf, M.** (2001) bifidobacteria: genetic modification and the study of their role in the colon. . *Journal of agricultural and food chemistry* 49: 378-383.
- Venema, K., Dost, M., Beun, P.A.H., Haandrikman, A.J., Venema, G., Kok, J.** (1997). The genes for secretion and maturation of lactococcins are located on the chromosome of lactococcus lactis il 14o3. *Appl. Anviron. Microbiol.* 62: 1689 – 1692.
- Vollaard, E.J., Clasener, H.A.** (1994). Colonization resistance. *Antimicrob agents chemother*, 38: 409-14.

-W-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

Wan, J., Hikey, M.W., Coventry, M.J. (1995). Continuous production of bacteriocins, brevecin, misin and pediocin, using calcium alginate. Immobilized bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 671-676.

Wong, J.M., De Souza, R., Kendall, C.W., Emam, A., Jenkins, D.J. (2006) colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J clin gastroenterol* 40: 235-243.

-Y-

Yang, R., Ray, B. (1994). Factors influencing producing of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food. Microbial.* 11 : 281-291.

Yildirim, Z., Johnson, M.G. (1998). Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* r isolated from radish. *Cett. Appl. Microbiol.* 26 : 297-304.