الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de La Vie Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire



جامعة جيجل
كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية
جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Mémoire De Fin D'études Pour L'obtention Du Diplôme Master en Biologie

Option: Microbiologie Appliquée

Intitulé

Etude du pouvoir probiotique de cinque souches bactériocinogènes de *Lactobacillus* isolées chez l'Homme

Membres de Jury:

Président: Dr. Boudjerda. J

Examinatrice: Dr. Ouled Haddar. H

Encadreur: Mme. Bahri. F

Présenté par :

Boussandel Hadda Zaabat Fatima

Année universitaire: 2011-2012



Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, la patience et la volonté pour accomplir ce travail.

Nous exprimons nos remerciements les plus sincères à Mme Bahri Fathia chargée de notre encadrement, Nous tenons à la remercier vivement pour sa patience durant ce travail, pour son soutien lors des moments difficiles pour faire évoluer ce projet. Nous la remercions encore pour son encadrement, Sa disponibilité, sa pédagogie, ses compétences, sa modestie et son aide précieuse tout au log de ce projet.

Nous adressons également nos remerciements aux membres de jury **Dr. Ouled Haddar. H** et **Dr. Boudjerda. J** qui ont accepté d'évaluer notre travail.

Nous adressons nos remerciements à toute l'équipe de Laboratoire de Microbiologie et à tous ceux qui ont participé de prés au de loin à notre formation.

Liste des abréviations

.

FAO/OMS : Food and Agriculture Organization / Organisation Mondiale de la Santé

GN: Gélose nutritive.

GRAS: Generally Regarded As Safe.

MRS: Man Rogosa Sharp.

rpm: rotation par minute.

SI: souches indicatrices.

ST: souches tests.

UFC: Unité Formant Colonie.

kDa: Kilo Dalton.

NRPS: non ribosomal peptides synthétase.

PBS: Phosphate Buffer Saline.

L: Lactobacillus.

SNTC: surnageant neutralisés et traités par catalase.

CWBI: Centre de la Walonie Bio-Industrie de la Belgique

Liste des tableaux

Titre des tableaux	Numéro de page
Tableau(1): Quelques espèces de Lactobacillus isolées chez L'Homme.	2
Tableau(2): Fermentation des sucres par quelques espéces de <i>Lactobacillus</i> isolées chez l'Homme.	4
Tableau(3): Les principaux groupes formés au sein du genre <i>Lactobacillus</i> , sur la base des caractéristiques phénotypiques.	5
Tableau(4): Classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques selon Eijsnik <i>et al.</i> (2002)	15
Tableau(5): Souches bactériennes indicatrices utilisées au cours de ce travail.	18
Tableau(6): Résultats de l'antagonisme bactérien entre les souches de <i>Lactobacillus</i> et les germes tests.	22
Tableau(7): l'activité antimicrobienne des surnageant neutralisés et traités par catalase vis-à-vis de Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline, Klebsiella, E.coli ATCC, E.coli pathogène et Salmonella. Tableau(8): L'effet de l'acidité (pH=2) sur la viabilité des souches de	25
Lactobacillus. Tableau (9): L'effet des sels biliaires à 3% sur la viabilité des souches de Lactobacillus.	28
Tableau (10) : Adhésion des différentes souches de <i>Lactobacillus</i> aux cellules épithéliales de rat.	29

Liste des figures et des photos

Titre des figures et des photos	Numéro de page
Figure (1): Lactobacillus observé au microscope électronique à transmission (x 10000).	3
Figure (2): Schéma de l'appareil digestif de l'Homme.	7
Figure (3): Compartiments de l'appareil digestif de l'Homme et leurs microflores.	8
Figure (4): Principales espèces utilisées comme probiotiques et exemples des souches commercialisées.	11
Figure (5): Séquence et structure de lantibiotique de type A(Nisine) .B(Mersacidine) et d'un lantibiotique à deux peptides (Lacticine).	14
Figure (6): Mode d'action des bactériocines des bactéries lactique.	17
Figure(7): Pouvoir antagoniste des souches de <i>Lactobacillus vis-à-vis</i> des souches indicatrices Gram positives.	23
Figure (8): Pouvoir antagoniste des souches de <i>Lactobacillus vis-à-vis</i> des souches indicatrices Gram négatives.	23
Figure (9): l'activité antimicrobienne des surnageant neutralisés et traités par catalase vis-à-vis des germes indicateurs Gram positifs.	25
Figure (10) : Effet du pH 2 sur la viabilité des souches de <i>Lactobacillus</i> en temps T=0h et T=3h.	27
Figure (11): effet des sels biliaires à 3% sur la viabilité des souches de Lactobacillus en temps T=0 h et T=3 h.	28
Figure (12) : Adhésion des différentes souches de <i>Lactobacillus</i> aux cellules épithéliales de rat.	30
Photo (1): Résultat de l'activité antagonistique des souches de Lactobacillus vis-à-vis Bacillus cereus.	24

Sommaire

Introduction1
Partie I : Etude bibliographique
Chapitre I : Le genre Lactobacillus
I-1-Définition et habitat2
I-2- Critères morphologiques des <i>Lactobacillus</i>
I-3- Critères biochimiques et physiologiques des <i>Lactobacillus</i>
I-4-Classification des <i>Lactobacillus</i>
I-4-1- Classification phénotypique des <i>Lactobacillus</i>
I-4-2-Classification génotypique des <i>Lactobacillus</i>
Chapitre II : La microflore digestive de l'Homme
II-1- L'appareil digestif de l'Homme
II-2-La microflore digestive
II-3-Répartition de la microflore dans le tube digestif
II-3-1- Intestin grêle
II-3-2-Colon
Chapitre IV : Les probiotiques
IV-1-Historique et définition
IV-2- Les grands groupes des probiotiques
IV-2-1- Les ferments lactiques
IV-2-2- Les bifidobactéries
IV-2-3- Les levures
IV-3- Critères de sélection des souches à fort potentiel probiotique11
IV-4- Effets positifs des probiotiques sur la santé
IV-4-1- Amélioration de la digestion du lactose
IV-4-2- Réduction du risque de diarrhée
IV-4- 3-Prévention du cancer du colon et autre cancer
IV-4-4- Les effets immuno-modulateurs
Chapitre IV : Les bactériocines
IV-1-Définition
IV-2-Classification
IV-2-1-Les bactériocines de classes I : les lantibiotiques

IV-2-2-Les bactériocines Classe II	14
IV-2-2-1-Les bactériocines de classe IIa	14
IV-2-2-Les bactériocines de classe IIb	14
IV-2-2-3- Les bactériocines de classe IIc : les bactériocines circulaires	15
IV-2-3-Les bactériocines de classe III	15
IV-2-4-Les bactériocines de classe IV	15
IV-3-Les mécanismes d'action des bactériocines	16
IV-3-1-Les lantibiotiques	16
IV-3-2-Les bactériocines de classe II	16
IV-3-3-Les bactériocines de classe III	16
Partie II : Etude expérimentale	
Matériel et méthodes	
I- Matériel et méthodes	18
I-1- Matériel	18
I-1-1- Matériel biologique	18
I-1-1- Les souches de <i>Lactobacillus</i>	18
I-1-1-2- Les souches bactériennes indicatrices	18
I-1-2- Milieux de cultures	19
I-1-3- Réactifs	19
I-1-4- Matériels et appareillages	19
I-2- Méthodes	19
I-2-1- Enrichissement	19
I-2-2- Isolement	19
I-2-3- Pouvoir antagoniste des souches	19
I-2-5- Etude de l'activité bactériocinogène	20
I-2-5-1- Préparation du surnageant	20
I-2-5-2- Détermination de l'activité bactériocinogène du surnageant	20
I-2-6- Evaluation des aptitudes probiotiques in vitro	20
I-2-6-1-Croissance sur milieu acide	20
I-2-6-2-Croissance en présence de la bile	21
I-2-6-3- Test d'adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliales	21
Résultats et discussion	
II- Résultats et discussion	22
II-1- L'activité antibactérienne	22

Annexes	
Références bibliographiques	31
Conclusion	30
II-3-3- Test d'adhésion des <i>Lactobacillus</i> aux cellules épithéliales	29
II-3-2- Croissance en présence de la bille	28
II-3-1-Croissance sur milieu acide	26
II- 3- Evaluation des aptitudes probiotiques in vitro	26
II-2- Détermination de l'activité bactériocinogène	24

Introduction

Introduction

Le genre Lactobacillus constitue un groupe génétiquement et physiologiquement hétérogène. Il s'agit de bacilles ou coccobacilles à Gram positif, asporulés, catalase négative microaérophiles ou anaérobies strictes. Ils sont utilisés en alimentaire dans la production des produits fermentés et généralement reconnus comme organismes inoffensifs et bénéficient du statut GRAS (generally recognized as safe) et par conséquent peuvent être employés en médecine humaine et vétérinaire (Saad, 2010).

En industrie alimentaire et en pharmaceutique, les Lactobacillus sont employés également comme microorganismes probiotiques. Les probiotiques sont définis comme étant de « microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingères » OMS/FAO (2001). En effet, plusieurs effets bénéfiques ont été rapportés et validés par des travaux de recherche tels que le maintien de l'équilibre de la flore naturelle de l'intestin de l'hôte et la diminution de l'incidence des infections intestinales. (Chukeatirote, 2003).

Les critères de sélection, in vitro, des Lactobacillus probiotiques sont : la résistance à l'acidité et à la bile, l'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin de l'hôte et une activité antimicrobienne contre les germes pathogènes et ou indésirables (Dunne et al. 2010). L'activité inhibitrice des Lactobacillus est due à la diminution du pH; condition défavorable au développement des bactéries, mais aussi à la production de substances antagonistes comme l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène et la synthèse des bactériocines : petites molécules de nature peptidiques ayant une activité bactéricide ou bactériostatique contre des espèces génétiquement proche de la souche productrice (Grattepanche, 2005)

Le but de notre travail est de savoir si une souche bactériocinogène présenterait ou non les autres traits probiotiques. Pour ce faire nous avons suivi les objectifs suivants :

Confirmer l'activité bactériocinique chez des souches de *Lactobacillus* présumées bactériocinogènes, isolées à partir de selles d'enfants, tester ces souches *vis-à-vis* de la tolérance à la bile; tester ces souches *vis-à-vis* de leur tolérance aux sels biliaires; tester leur pouvoir d'adhésion sur les cellules épithéliales du rat et tester s'il y'a une corrélation entre l'activité bactériocinogène et les autres critères probiotiques.

Etude bibliographique

Chapitre I Le genre Lactobacillus

I- Le genre Lactobacillus:

I-1-Définition et habitat :

Le genre *Lactobacillus* est, quantitativement, le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques et bénéficient du statut GRAS (Generally Recognised As Safe). Il a été proposé pour la première fois par Beijerinck en 1901, il renferme de nombreuses espèces et comprends 113 espèces et 16 sous espèces (**Bekhouche**, **2006**; **Varsalovic et Wilson**, **2008**).

Les Lactobacillus sont des bactéries ubiquitaires, présents dans de nombreux biotopes : eau, sol, lait et produits laitiers, végétaux, ensilages, produits carnés, poissons, bière, vin, fruits et jus de fruits (Federeghi, 2005). Dans le corps humain, les espèces de Lactobacillus font partie de la flore naturelle de la bouche, de l'intestin grêle, du colon et du vagin (Tableau 1) .Il sont importants pour l'industrie alimentaire, notamment dans les fermentations laitières et végétales (Izquierdo, 2009).

Tableau (1): Quelques espèces de Lactobacillus isolées chez L'Homme (Bazo, 2011).

Lactobacillus		
L.acetotolerans	L.jensenii	
L.acidophilus	L.johnsonii	
L.agilis	L.ruminis	
L.plantarum	L.kandleri	
L.alimentarius	L.kefir	
L.amilophilus	L.kefiranofaciens	
L.avarius	L.malefermentans	
L.bifermentans	L.mali	
L.brevis	L.rhamnosus	
L.buchneri	L.vaginalis	
L.casei ssp	L.salivarius	
L.collinoides	L.intestinalis	
L.confusus	L.oris	
L.coryniformis		
L.crispatus		
L.curvatus		
L.delbrueckii		
L.farciminis		
L.fermentum		
L.fructivorans		
L.fructosus		
L.gallinarum		
L.gasseri		
L.graminis		
L.halotolerans		

I-2- Critères morphologiques des Lactobacillus :

Les *Lactobacillus* sont des bactéries Gram positive, en forme de bâtonnets et parfois de coccobacilles de 3-5 µm de long et de 0.8-1 µm d'épaisseur, isolés ou en chaînettes, non flagellés, immobiles, non sporulés (Saad, 2010; Slover et Danziger, 2008).

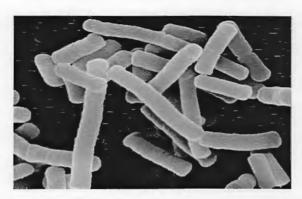


Figure (1): Lactobacillus observé au microscope électronique à transmission (x 10000) (Makhloufi . 2012).

I-3- Critères biochimiques et physiologiques des Lactobacillus :

Les Lactobacilles sont des anaérobies et obtiennent leur énergie du métabolisme fermentatif, mais ils peuvent survivre en présence d'oxygène grâce à leur activité peroxydase capable d'inactiver le peroxyde d'hydrogène, dépourvu de catalase, de nitrate réductase, de cytochrome, de gélatinase, de l'indole et de H2S. (Izquierdo, 2009).

Ces bactéries ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique par la fermentation de plusieurs sucres (**Tableau 2**), certaines espèces sont homolactiques; produisent seulement l'acide lactique, d'autre hétérolactiques; produisent de l'acétate, formate, succinate, de l'éthanol et du CO₂ à coté de l'acide lactique (**Varsalovic and Wilson, 2008**).

De plus, ces microorganismes sont auxotrophes avec de fortes exigences en facteurs de croissance tels que les acides aminés, des dérivés d'acides nucléiques, des sels et des vitamines. Ils ont également la capacité de survivre à des pH bas de 5.5 à 6.5 dans les milieux qu'ils acidifient par la production d'acide lactique. Ils tolèrent des concentrations de 1-9 % de NaCl. Leur température de croissance est généralement comprise entre 20°C et 53°C, avec un optimum entre 30 °C et 40 °C (Saad, 2010 ; Varsalovic and Wilson, 2008).

Tableau (2): Fermentation des sucres par quelques espèces de *Lactobacillus* isolées chez l'Homme. (Bazo, 2011).

Fermentation des glucides	Lactbacillus acidophilus	Lactobacillus salivarius	Lactobacillus delbrueckii
Amygdaline	+	-	-
Cellobiose	+	-	_
Galactose	+	+	-
Lactose	+	+	+
Maltose	+	+	-
Mannitole	-	+	-
Mannose	+	-	-
Melibiose	-	+	-
Sucrose	+	+	-

I-4-Classification des Lactobacillus:

D'un point de vue phylogénétique, les *Lactobacillus* appartiennent au règne de *Bacteria*, à la division des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la Famille des *Lactobacillaceae* (Varsalovic and Wilson, 2008).

Il regroupe de nombreuses espèces qui sont caractérisées par l'hétérogénéité de la composition de leur ADN : le GC% varie de 32 à 53 % (Saad, 2010).

I-4-1- Classification phénotypique des Lactobacillus :

Stiles and Holzapfel, (1997), rapportent que les Lactobacilles peuvent être classés en trois groupes à la base de la température optimale de croissance et leur métabolisme fermentaire (**Tableau 3**):

Groupe I:

Il comprend les Lactobacilles homofermentaires obligatoires thermophiles contenant les espèces du groupe *Thermobacterium* qui se développent à 45°C mais pas à 15°C, ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate.

Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces comme *Lb. delbruekii*, et *Lb helveticus* qui participent à la fermentation des produits laitiers, et *Lb. acidophilus* issue de la flore intestinale(**Federeghi**, 2005).

Groupe II:

Les Lactobacilles homofermentaires facultatifs formé de groupe *Streptobacterium* mésophiles, qui se développent à 15 C° (ils peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat). La fermentation des hexoses est homofermentaires (mais peut être hétérofermentaires dans certains cas), celle des pentoses et du gluconate est hétérofermentaires avec une production d'acide lactique et d'acide acétique. Il est constitué d'une vingtaine d'espèce, leurs cellules sont courtes, souvent arrangées en filaments dont *Lb. curvatu*, *Lb. sakei* et *Lb. plantarum*, intervenant dans la fermentation des produits carnés et céréaliers, et *Lb. casei* utilise pour ses propriétés probiotiques(Federeghi, 2005).

Groupe III:

Il comprend les lactobacilles hétérofermentaires obligatoires, regroupant les *Betabacterium* qui fermentent les hexoses en produisant de l'acide lactique, de l'acide acétique ou l'éthanol et du CO₂ et qui dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique. Ces bactéries produisent du CO₂ lors de la fermentation du glucose et du gluconate.

C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb* .sanfransisco et *Lb* .brevis qui font partie de la flore des levains de panification, et *Lb* .kefir isolé du grain de kéfir (Federeghi, 2005).

Tableau (3): Les principaux groupes formés au sein du genre Lactobacillus, sur la base des caractéristiques phénotypiques (Saad, 2010).

Groupe 1 homofermentaires strictes	Groupe 2 hétérofermentaires facultatifs	Groupe 3 hétérofermentaires strictes
L. acidophilus	L. acetotolerans	L. brevis
L. amylophilus	L. agilis	L. buchneri
L. anylovorus	L. alimentarius	L. collinoides
L. aviarius subsp. araffinosus	L. bifermentans	L. fermentum
L. aviarius subsp. Aviarius	L. casei	L. fructivorans
L. crispanus	L. coryniformis	L. fructosus
L. delbrueckii subsp. bulgaricus	subsp. torquens	L. hilgardii
L. delbrueckii subsp.	L. coryniformis	L. kefir
delbrueckii	subsp. coryniformis	L. malefermentans
L. delbrueckii subsp. laciis	L. cuvatus	L. oris
L. farciminis	L. graminis	L. panis
L. gallinarum	L. hamsteti	L. parabuchneri
L. gasseri	L. homohiochii	L. parakefir
L. helveticus	L. intestinalis	L. pontis

I-4-2-Classification génotypiques des Lactobacillus :

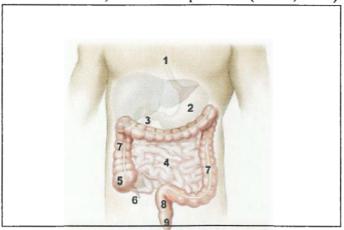
En raison de la diversité des phénotypes et des morphotypes des lactobacilles l'identification de certaines espèces par les approches classiques, reste délicate voire impossible. C'est le cas en particulier des espèces apparentées à *L. acidophilus*, dont certaines font l'objet de nombreux travaux compte tenu de leur importance dans le domaine des probiotiques.

L'utilisation des outils de taxonomie moléculaire comme l'hybridation quantitative ADN/ADN les séquences des gènes d'ARNr 16S, ont permis de lever des ambiguïtés et de nommer précisément les quelques espèces de Lactobacilles d'intérêt en santé et en alimentation humaines parmi plus d'une centaine d'espèces de lactobacilles actuellement décrites (Tailliez, 2004).

Chapitre II La microflore digestive de l'Homme

II-1- L'appareil digestif de l'Homme :

Le rôle essentiel de l'appareil digestif est d'assimiler, d'absorber les nutriments dans la circulation sanguine et lymphatique et d'éliminer les éléments non assimilables. Chez l'Homme l'appareil digestif représenté à la figure (5), est composé du tube digestif qui comprend les éléments suivants : L'Œsophage, l'estomac, les intestins et des glandes annexes. Ces dernières comprennent les glandes salivaires, le foie et le pancréas (Gilda, 2010).



(1) Œsophage, (2) Estomac, (3) Duodénum, (4) Jéjunum+Iléon, (5) Caecum, (6) appendice, (7) Colon, (8) Rectum, (9) Anus.

Figure (2): Schéma de l'appareil digestif de l'Homme (Gilda, 2010).

II-2-La microflore digestive :

Le microbiote intestinal, autrefois appelé microflore intestinale, est l'ensemble des bactéries qui vivent dans le tube digestif, de façon constante et capables de s'y multiplier dans les conditions environnementales du tube digestif. La microflore digestive s'implante dés la naissance et évolue dans ses composantes jusqu'au sevrage. Elle se stabilise alors dans un équilibre qualitatif d'adulte, indépendamment de régime alimentaire. Sa répartition verticale dans le tube digestive est très inégale, en raison des conditions physiologiques très diverses des différents compartiments digestifs. La flore microbienne est estimée numériquement 10 fois supérieure au nombre de cellules de l'organisme. Elle représente un écosystème très complexe d'au moins 500 espèces dont 30 à 40 espèces dominantes regroupant 99 % de la flore totale (Aitbelgnaoui, 2006; Bousseboua, 2002; Prioult, 2003). Si l'on exclut la bouche, directement en contact avec le milieu extérieur, les populations bactériennes présentes dans la lumière du tube digestif augmentent progressivement de l'estomac jusqu'aux selles (Figure 6), en fonction des conditions extrêmes, telle que l'acidité et l'action inhibitrice des sels biliaires (Gilda, 2010). Cette flore microbienne se divise en trois groupes:

- A) La flore dominante composée de Bifidobacterium et Bacteroïdes
- B) La flore sous-dominante composée en particulier de Lactobacillus
- C) La flore contaminante, potentiellement pathogène mais théoriquement absente (Robin et Rouchy, 2001).

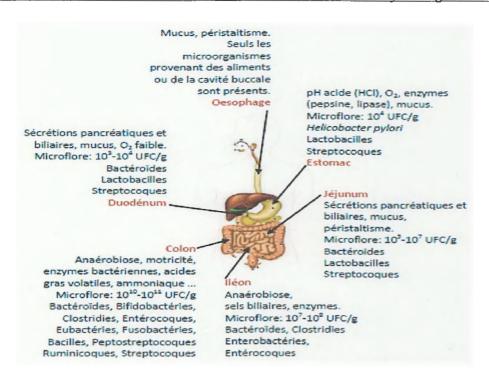


Figure (3): Compartiments de l'appareil digestif de l'Homme et leurs microflores (Gilda, 2010).

II-3-Répartition de la microflore dans le tube digestif :

La répartition de la microflore varie selon les segments du tube digestif. Elle dépend de la teneur du milieu en oxygène, des sécrétions du tube digestif haut, des nutriments disponibles et de la vitesse du transit (rapide de la bouche au caecum, plus lent ensuite), dans l'estomac la prolifération microbienne est fortement réduite à cause de l'oxygène apporté par la déglutition et par la présence d'une forte acidité, la flore est quasi inexistante (inférieure à 10^3 UFC/g) (Prioult, 2003). Seuls les micro-organismes à Gram positif aérobies ou anaérobies facultatives acidotolérantes sont capables d'y survivre, comme les lactobacilles et les streptocoques...etc. Il a fallu attendre la découverte d'Helicobacter pylori, bactérie se développant spécifiquement dans l'estomac et responsable de la pluspart des ulcères gastriques, pour reconsidérer cette vision. Mais malgré cette situation, H.pylori est considérée comme membre de la microflore normale de l'estomac, puisqu'elle est présente chez la majorité de la population humaine, sans causer la moindre pathologie (Bousseboua, 2002; Ait_belgnaoui, 2006; Gilda, 2010).

II-3-1- Intestin grêle:

L'intestin grêle n'est pas un organe où les bactéries peuvent se multiplier chez un sujet sain, et constitue une région de transit. Lorsque les bactéries y prolifèrent, en particulier parce qu'elles possèdent des facteurs leur permettant d'adhérer à la muqueuse, il s'agit toujours d'un phénomène pathologique. En effet, la croissance bactérienne dans l'intestin grêle est limitée, malgré son pH moyen proche de la neutralité et sa richesse en nutriments divers, il reçoit les secrétions biliaires et pancréatiques qui ont un effet inhibiteur des bactéries (Bousseboua, 2002; Ait_belgnaoui, 2006). L'intestin grêle est composé de deux segments aux conditions physiologiques différentes: le duodénum dont les conditions s'apparentent à celles de l'estomac (Bousseboua 2002). Comportent une flore très faible, constituée seulement par les bactéries gastriques en transit de 10^3 - 10^4 UFC/g et l'iléum ou le pH augmente progressivement jusqu'au colon. Une augmentation importante de la flore en nombre 10^6 - 10^8 UFC/g et en variété a été observée (Ait-belgnauoi, 2006; Prioult, 2003).

Des espèces anaérobies facultatives à Gram négatif (entérobactéries) apparaissent à côté des espèces à Gram positif (*Bacteroides*, clostridies, entérobactéries, entérocoques) (Gilda, 2010; Ait-belgnauoi, 2006).

II-3-2-Colon:

Le côlon est le segment le plus peuplé grâce aux les conditions de milieu très favorable (richesse en nutriments, issus des résidus alimentaires non digérés par les enzymes intestinales, les conditions physico-chimiques stable température de 37°C, pH relativement neutre et tamponné (Bousseboua, 2002; Ait-begnaoui, 2006).

La flore colique est en revanche extrêmement variée et abondante. Elle comprend 10¹¹-10¹² bactéries/gr avec une nette prédominance des anaérobies stricts (99,9 %), surtout *Bacteroïdes* (≈10¹¹ par gramme de selle), *Bifidobactérium*, *Clostridium*. Viennent ensuite les Entérobactéries (*E.coli*, 10⁸/gr, *Proteus*, *Klebsiella...*), Entérocoques et Staphylocoques. Cette flore est habituellement stable et limite l'implantation d'espèces pathogènes telles que Salmonelle, Shigelle ou *Campylobacter* et le développement de bactéries commensales potentiellement dangereuses.

La flore microbienne intestinale endogène est présente de façon permanente dans l'intestin et est capable de s'y multiplier. Elle exerce de nombreuses fonctions physiologiques (fermentation...) et a un effet de barrière face à la colonisation par des micro-organismes pathogènes. La résultante pour l'hôte est souvent bénéfique mais peut être parfois néfaste ; ainsi, le rôle de la flore endogène est suspecté dans la pathogénie des maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin et des cancers coliques. L'idée d'administrer de nouveaux micro-organismes afin de moduler la flore endogène dans un sens bénéfique, ou plus simplement d'utiliser leurs propriétés métaboliques, est ancienne et a conduit à introduire le terme de probiotique (Robin et Rouchy, 2001).

Chapitre III Les probiotiques

III-1- Historiques et définition :

Le concept des probiotiques a été introduit pour la première fois au début du siècle dernier par Elie Metchnikoff, un chercheur russe ayant reçu un prix Nobel pour ses études, il est à l'origine de l'observation scientifique originale du rôle positif joué par certaines bactéries sur la santé. Metchnikoff (1908) suggéra que «la dépendance des microbes intestinaux par l'alimentation rend possible l'adoption de mesures pour modifier la microflore du corps en remplaçant les microbes nocifs par des microbes utiles » (Mélanie, 2007; Baruzzi et al. 2011). Une des premières définitions des probiotiques comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes» a été proposé par Lilly et Stillwell en 1965. Ensuite, Parker en 1974 élargit cette définition à des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore » (Ait belgnaoui, 2006).

Le terme probiotique provient de deux mots grecs, pro et bios, qui signifient littéralement « pour la vie ». Il a été popularisé par Fuller en 1989 lorsqu'il lui donna sa première définition officielle : « les probiotiques sont des suppléments alimentaires à base de micro-organismes vivants qui agissent de façon bénéfique sur l'être vivant en améliorant l'équilibre et la stabilité de sa microflore intestinale». Cette définition a été révisée à plusieurs reprises et actuellement, la plus acceptée est celle recommandée par un panel d'experts mandatés par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture et l'Organisation Mondiale de la Santé, elle indique que les probiotiques sont : « des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte » (Mélanie, 2007).

Il s'agit le plus souvent de bactéries ou de levures présentes soit dans des aliments, notamment les produits laitiers fermentés, soit dans des compléments alimentaires sous forme lyophilisée. Les micro-organismes tués par la chaleur ne répondent pas à la définition des probiotiques, même si certains effets thérapeutiques leur ont été attribués (Robin et Rouchy, 2001).

III-2- Les grands groupes des probiotiques :

III-2-1- Les ferments lactiques

Ils sont capables de produire de l'acide lactique par la fermentation de certains sucres comme le lactose. Ils sont regroupés en 2 catégories, en fonction de leur morphologie : les Lactobacilles (Lactobacillus bulgaris, Lactobacillus acidophilus et Lactobacillus casei) et les coques (Enterococcus et Streptococcus) (Robin et Rouchy, 2001).

III-2-2- Les bifidobactéries

D'origine humaine ou animale, elles appartiennent à la flore intestinale normale et possèdent une bonne résistance aux sucs gastriques (Robin et Rouchy, 2001).

III-2-3- Les levures

Les souches de levures probiotiques appartiennent généralement au genre Saccharomyces (Robin et Rouchy, 2001).

La figure (2) montre les principales espèces utilisées comme probiotiques et quelque exemples des souches commercialisées.

Espèces de Espèces de Autres bactéries Microorganismes lactobacilles bifidobactéries « non-lactiques » lactiques L. acidophilus La5 (car Hansen) B. longum BB536 (Morinaga) S. thermophilus 1131 (Mell Mill) S. boulardii Ultra-levure® (alocodes) E. faecalis Symbioflor (symbiophann) L. acidophilus NCFM (Danieco) B. breve Yakult (Yakut) S. cerevisiae L. casei Shirota grando B. lactis Bb 12 (Chr. Hansen) E. faecium SF68 (certics) E. coli Nissie 1917 (Ardevokarm) L. casei DN-114 001 (Danone) P. acidilactici Bactocell® (Laterran B. subtilis B. lactis HN019 (Danteco) L. reuteri ATCC 55730 (Blogata) B. cereus B. animalis DNI 73010 (Danone) L. delbrueckii subsp. B. Infantis 35264 (Procter & Gamble) bulgarious 2038 (Melli Mill) L. gasseri K7 (ALP) L. johnsonii La1 (Nestle) L. paracasei CRL431 (Chr. Hansen) L. paracasei F19 (Medipharm) L. plantarum 299V (Probl AB) L. rhamnosus GG (vallo) L. crispatus L. gallinarum

Figure(4): Principales espèces utilisées comme probiotiques et exemples des souches commercialisées (Izquierdo, 2009).

III-3- Critères de sélection des souches à fort potentiel probiotique

- Les microorganismes potentiellement probiotiques doivent être sélectionnés selon différents critères (Rousseau, 2004):
- Etre d'origine humaine pour une utilisation chez l'Homme.
- Ces bactéries doivent être sans danger pour l'hôte, c'est à dire qu'ils ne sont ni pathogènes, ni toxiques.
- Etre résistantes au passage des voies gastriques, aux enzymes pancréatiques, aux sels biliaires et à l'acidité.
- Adhérer aux différents tissus épithéliaux du tractus gastro-intestinal et avoir une bonne colonisation du tube digestif.
- Produire des substances antimicrobiennes capables d'inactiver des pathogènes.
- Avoir de bonnes propriétés technologiques, de sorte qu'elles puissent être cultivées à
 grande échelle, et conserver leurs propriétés durant des longues périodes de conservation
 et en cas d'utilisation dans les produits fermentés, contribuer à l'amélioration du goût

III-4- Effets positifs des probiotiques sur la santé

III-4-1- Amélioration de la digestion du lactose :

L'un des effets des probiotiques qui a été le plus mis en avant et démontré chez l'homme est celui qui concerne l'amélioration de l'intolérance au lactose. La digestion de ce disaccharide nécessite une lactase, ou β-galactosidase qui permet alors l'absorption des sucres simples libérés.

Chapitre III Les probiotiques

Plusieurs études ont montré que la β-galactosidase des probiotiques participait à la digestion du lactose dans l'intestin.

En principe, le remplacement du lait par du yaourt conduit à une meilleure absorption et une meilleure tolérance chez les sujets présentant une intolérance au lactose (Izquierdo, 2009).

III-4-2- Réduction du risque de diarrhée

Plusieurs types de diarrhées sont dus à des infections microbiennes. Des effets protecteurs de souches probiotiques contre certaines infections intestinales ont été observés sur des modèles animaux. Les mécanismes potentiellement impliqués incluent la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène, d'autres substances antimicrobiennes telles que les bactériocines, la compétition pour des nutriments ou des récepteurs d'adhésion, des actions anti-toxines et la stimulation du système immunitaire.

Plusieurs études randomisées contrôlées sur l'homme ont montré l'efficacité des souches probiotiques pour prévenir ou atténuer les perturbations digestives liées à la prise d'antibiotiques et les diarrhées nosocomiales infantiles dues surtout à des rotavirus. Cependant ces effets ne sont pas universels et les probiotiques ne semblent pas efficaces en toutes circonstances (Izquierdo, 2009).

III-4- 3-Prévention du cancer du colon et autre cancer

La flore intestinale et le système immunitaire jouent un rôle dans la cancérogenèse.

Plusieurs études ont montré que certains probiotiques pouvaient diminuer l'activité d'enzymes, la concentration de mutagènes ou d'acides biliaires secondaires dans les selles, qui pourraient être impliqués dans la cancérogenèse colique. Les probiotiques pourraient empêcher la croissance d'autres souches qui transforment les procancérogènes en cancérogènes réduisant ainsi la quantité de cancérogènes dans l'intestin (Izquierdo, 2009).

III-4-4- Les effets immuno-modulateurs

Les cellules épithéliales de l'intestin sont en contact direct avec les micro-organismes présents dans la lumière intestinale. Les bactéries du tractus peuvent se lier aux récepteurs présents à la surface des cellules épithéliales et déclencher ainsi une cascade de mécanismes de défense immunitaire (Saad, 2010).

Chapitre IV Les bactériocines

Chapitre IV Les bactériocines

IV-1-Définition:

Il existe plusieurs définitions du terme bactériocine. A l'origine, ce terme a été utilisé pour désigner les protéines et peptides antimicrobiens, synthétisés selon la voie ribosomique. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines ayant une activité bactériostatique ou bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action. Toutes les bactériocines produites par les bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram positive. Aucune bactériocine produite par les bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram négative n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram négative ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Dortu et Thonart, 2009; Makhloufi, 2012; Garry et al. 2008).

IV-2-Classification:

Les bactériocines diffèrent entre elles par leur structure primaire, leur structure tridimensionnelle, leur mode d'export et leur mécanisme d'action. Cette forte divergence a rendu leur classification assez difficile et plusieurs classifications ont été successivement proposées. Les bactériocines sont réparties en quatre classes (Dortu et Thonart, 2009; Makhloufi, 2012). Détaillée dans le tableau (4).

IV-2-1-Les bactériocines de classes I : les lantibiotiques

Les lantibiotiques : sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique (Makhloufi, 2012), de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la β-méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types : la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés. Deux exemples bien connus de lantibiotiques sont la nisine et la mersacidine (Dortu et Thonart, 2009 ; James et al. 2009). Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticin 3147.

Les séquences et structures d'un lantibiotique de chaque type se trouvent à la figure (5).



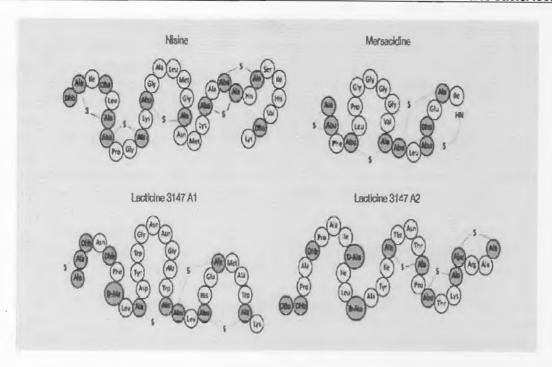


Figure (5): Séquence et structure de lantibiotique de type A(Nisine).B(Mersacidine) et d'un lantibiotique à deux peptides (Lacticine) (Izquierdo, 2009).

IV-2-2- Les bactériocines Classe II:

Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés et chargés positivement à un pH neutre. Leur point isoélectrique varie entre 8 et 10. Contrairement aux lantibiotiques, les bactériocines de classe II ne présentent pas de modifications post traductionnelles (Dortu, 2008; Dortu et Thonart, 2009).

IV-2-2-1- Les bactériocines de classe IIa :

Sont aussi communément appelées bactériocines « pediocin-like » en référence à la pédiocine, une des premières bactériocines de la classe IIa caractérisées. Ces bactériocines sont produites, pour la plupart, par des bactéries lactiques et représentent le groupe de bactériocines de classe II le mieux étudié (Makhloufi, 2012). Elles contiennent entre 27 et 48 acides aminés qui ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action. Elles ont toutes une activité contre L. monocytogenes. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Ces bactériocines semblent par ailleurs avoir une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (Dortu et Thonart, 2009).

IV-2-2-Les bactériocines de classe IIb :

Les bactériocines, communément appelées « two-peptides », sont formées de deux peptides différents, α et β. Ces bactériocines possèdent une taille très variable allant de 25 résidus (plantaricine J,PlnJ) à 62 résidus (thermophiline A, ThmA). Comme les autres bactériocines de classe II, les bactériocines de classe IIb possèdent un spectre d'activité incluant de nombreux genres de bactéries à Gram positif pathogènes telles que Bacillus, Clostridium, Enterococcus, Listeria, Staphylococcus et Streptococcus ou commensales comme Lactobacillus, Lactococcus et Pediococcus) (Makhloufi, 2012). L'activité optimale de ces bactériocines est dépendante de la présence de deux composants de structure différente (bacteriocine des bacteries lacique) (deux

peptides) pour avoir une activité Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (Enhancing) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (Synergy) où les deux peptides sont complémentaires, ils doivent être présents pour avoir une activité (**Dortu et Thonart**, 2009).

IV-2-2-3- Les bactériocines de classe IIc : les bactériocines circulaires

Les bactériocines circulaires se différencient des autres bactériocines par la présence d'un cycle liant d'une façon covalente leurs extrémités N- et C-terminales via un mécanisme enzymatique encore mal connu à ce jour. La structure circulaire est responsable de la protection de ces bactériocines à l'égard de la protéolyse, en raison de l'absence de site de clivage aux exopeptidases et joue un rôle important dans l'augmentation de l'activité antimicrobienne due à une stabilité accrue de la molécule. Comme les autres bactériocines, les bactériocines circulaires agissent par la perméabilisation de la membrane cytoplasmique et la perturbation de la force protomotrice membranaire de la bactérie cible aboutissant à la mort cellulaire (Makhloufi, 2012).

IV-2-3- Les bactériocines de classe III:

Elle contient les protéines de taille supérieure à 30kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par Lactobacillus helveticus A, l'enterolysin A produite par Enterococcus faecium, la zoocin A produite par Spreptococcus zooepidemicus et la millericin B produite par Streptococcus milleri (Dortu et Thonart, 2009; Diop et al. 2008)

IV-2-4- Les bactériocines de classe IV:

Elle contient les peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite (Dortu et Thonart, 2009).

Tableau (4): Classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques selon Eijsnik et al. (2002) (Naghmouchi, 2007).

Classe de bactériocine	Sous classe de bactériocine	Bactériocines
Classe I: lantibiotiques contenants	Type A molécules de forme	Nisine A
des lanthionines ou P-lanthionines à	allongée (<4 kDa).	Nisine Z
faible poids moléculaires	Type B molécules globulaires (1,8	Subtiline
	à 2,1 kDa).	Actagardine
		Mutacin II
Classe II : bactériocines à faible poids	Sous classe IIa: pediocin like anti-	Pédiocine PA-1
moléculaires (<10 kDa) theromstables	Listeria	Leucocine
	Sous classe Ilb: bactériocines à 2	Sakacine A
	peptides	Plantaricine JK
	Sous classe Ilc: autres	Plantaricine EF
	bactériocines	Lactococcine
		972
Classe III : bactériocines de haut		Helvéticine J
poids moléculaires (>30 kDa) non thermostable.	/	Millericine B

IV-3- Les mécanismes d'action des bactériocines :

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram-négatif. Cependant, les modes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés figure (6) (Dortu, 2008).

IV-3-1- Les lantibiotiques

Les lantibiotiques ont principalement la membrane cytoplasmique pour cible. Pour les lantibiotiques, comme par exemple la Nisine l'effet antimicrobien est le résultat à la fois de la perméabilisation de la membrane cytoplasmique et de l'inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne ou de l'inactivation d'une enzyme essentielle à la biosynthèse de la paroi bactérienne. Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II, un précurseur de peptidoglycanes. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide de petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP... Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, c'est à dire le potentiel transmembranaire ($\Delta \Psi$) et le gradient de pH (Δ pH), à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. L'interaction avec le lipide II permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de réduire la concentration du lantibiotique nécessaire pour former un pore. La liaison des lantibiotiques avec le lipide II peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire. D'autre part, certains lantibiotiques peuvent inhiber la sporulation (Dortu, 2008).

IV-3-2-Les bactériocines de classe II:

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « mannose perméase », pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule. Le mécanisme de formation des pores n'est pas connu, même si l'hypothèse la plus courante est l'association de différentes molécules de la bactériocine.

Les bactériocines de classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram⁺. Elles forment des pores et rendent la membrane perméable à différentes petites molécules, des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la force proton motrice. Les ions transportés sont spécifiques de la bactériocine (**Dortu**, 2008).

IV-3-3-Les bactériocines de classe III :

Le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'enterolysin A, la zoocin A et la millericin B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles. La zoocin A a un spectre d'action étroit alors que l'enterolysin A et la millericin B ont un spectre d'action large. L'helveticin J a un mode d'action bactéricide (**Dortu**, 2008).

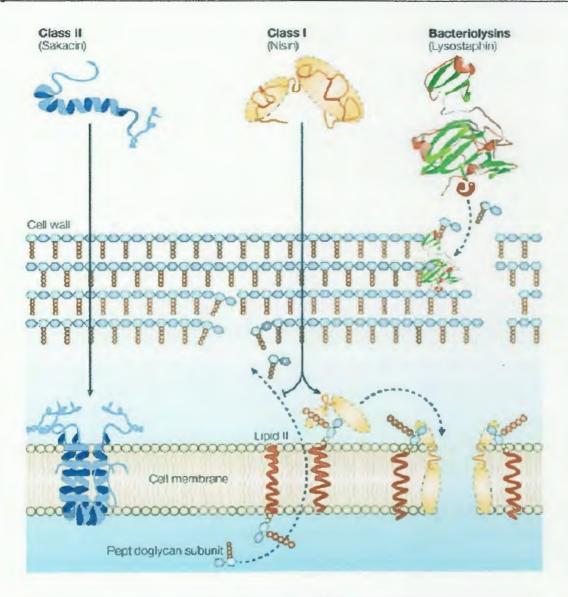


Figure (6): Mode d'action des bactériocines des bactéries lactique (Izquierdo, 2009).

Etude expérimentale

Matériel et méthodes

I- Matériel et méthodes :

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la vie de l'Université de Jijel durant la période qui s'étend du mois d'avril jusqu'au mois de juin de l'année 2011-2012.

I-1- Matériel

I-1-1- Matériel biologique :

I-1-1-1 Les souches de Lactobacillus :

Notre travail a été réalisé sur des souches de *Lactobacillus* bactériocinogènes isolées à partir des selles d'enfants par nos collègues étudiants durant l'année 2010-2011 :

Lactobacillus acidophilus (I2).

Lactobacillus paracasi subsp paracasei (A9).

Lactobacillus paracasi subsp paracasei (A20).

Lactobacillus gasserii (D8).

Lactobacillus fermentum (H7).

I-1-1-2- Les souches bactériennes indicatrices :

Lors de ce travail, les germes utilisés comme souches indicatrices pour l'étude de l'activité bactériocinogénique et l'activité antibactérienne sont cités dans le **tableau (5)** ci-dessous :

Tableau (5): Souches bactériennes indicatrices utilisées au cours de ce travail.

Souches indicatrices	Référence
Gram positif	
Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline Bacillus cereus CWBI Listeria monocytogenes CWBI	Isolée en médecine humaine Centre de la Walonie Bio-Industrie de la Belgique Centre de la Walonie Bio-Industrie de la Belgique
Gram négatif	-
Escherichia coli pathogène Escherichia coli (29522) ATCC Salmonella pathogène. Klebsiella pathogène.	Isolée en médecine humaine American Type Culture Collection Isolée en médecine humaine Isolée en médecine humaine

I-1-2- Milieux de cultures :

- Milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe): Milieu sélectif pour la culture de *Lactobacillus* additionné de 1% de cystéine (préparé au laboratoire).
- Gélose nutritive : pour la réalisation du test d'antagonisme (Institut Pasteur d'Alger).
- Milieu Muller-Hinton : pour les tests de l'activité antimicrobienne (Institut Pasteur d'Alger).
- Bouillon nutritif: pour la culture des germes indicateurs (Institut Pasteur d' Alger).
- -M17 : pour la culture de *Listeria* (Institut Pasteur d' Alger).

I-1-3- Réactifs:

Au cours de notre travail, nous avons utilisés les réactifs suivants :

- HCl (1N), la soude NaOH (5N).
- L'huile à immersion.
- Les enzymes : la catalase.
- Les sels biliaires (Institut Pasteur d' Alger).

I-1-4- Matériels et appareillages.

- pH mètre (Hanna Instruments).
- Bain Marie (Gerhardt, Memmert).
- Etuve de 37°C (Memmert).
- Microscope optique (Olympus).
- Four Pasteur (Controls).
- Spectrophotométre (UV Shimadzu).
- Centrifugeuse (Hettich).
- Agitateur magnétique chauffant (Bunsen).
- Vortex (Minishaker IKa).
- Réfrigérateur (Condor).
- Balance (Denver).
- Autoclave (Slli).
- Les seringues de 5 ml.
- Filtre millipore (0.22) en acétate.
- Papier Watman.
- Compteur de colonies (Funke Gerber).

I-2- Méthodes:

I-2-1- Enrichissement:

Les souches de *Lactobacillus* conservées dans des billes d'alginate sont ensemencées dans de bouillon MRS enrichi à la cystéine, ensuite les bouillons MRS sont homogénéisés au moyen d'un vortex et incubés 37⁰ C en anaérobiose.

I-2-2- Isolement:

L'isolement est réalisé sur milieu MRS solide, milieu adapté à la recherche spécifique des lactobacilles. Les cultures sont incubées 24 à 72 heure à 37°C dans des boîtes de Pétri en anaérobiose. Après l'incubation, 04 repiquages successifs sont effectués afin de s'assurer de la pureté des souches.

I-2-3- Pouvoir antagoniste des souches :

L'étude du pouvoir antagoniste des *Lactobacillus vis-à-vis* des germes indicateurs a été réalisée selon la technique de Tadesse et al (2004) (méthode des disques ou portes germes). (Metlef et Dimili-Bouras, 2009)

Des cultures jeunes sont préalablement préparés aussi bien pour les *Lactobacillus* que pour les germes tests. Les cultures doivent avoir une DO_{620nm} de 0.6 à 0.8 après 18 à 24h d'incubation.

Le test consiste à :

- Inonder en surface les boites de Pétri contenant le milieu GN et (le milieu M17 pour *Listeria monocytogenes*) par 50 μl de cultures de souches indicatrices, Gram négatif (*Escherichia coli* pathogène, *Escherichia coli* ATCC, *Salmonella* pathogène, *Klebsiella* pathogène) et Gram positif (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*)
- incuber les boites pendant 3heures à 37°C. Après incubation, déposer à la surface de la gélose des disques en papier Wattman stériles et imprégnés par la culture des *Lactobacillus* à tester.
- Mettre les boites à 4°C pendant 4h pour assurer la diffusion des substances responsables de l'interaction antagoniste, enfin incuber les boites à 37°C pendant 24h.
- L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques dont le diamètre est mesuré à partir du centre du disque en mm. Une inhibition est considérée positive si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 2mm (**Tabak et Bensoltane**, 2012).

I-2-5- Etude de l'activité bactériocinogène :

I-2-5-1- Préparation du surnageant :

Une culture des souches de *Lactobacillus* est réalisée sur bouillon MRS à 1% de glucose pendant 24 heures à 37 °C, 20ml pour chaque souche. Cette étape une fois effectuée, la culture est soumise à une centrifugation à 6000 rpm durant 40min à 4°C et le surnageant obtenu est filtré sur filtre millipores stériles de diamètre 0,22µm.

L'exclusion de toute inhibition de l'organisme indicateur qui pourrait être due à l'effet conjugué des acides organiques (notamment l'acide lactique et l'acide acétique) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été réalisée par ajustement du pH à 6,5 avec NaOH 5N et l'addition de quelques gouttes de la catalase au surnageant des souches sélectionnées (**Diop** et al. 2007).

I-2-5-2- Détermination de l'activité bactériocinogène du surnageant :

L'activité antimicrobienne du surnageant brut a été testée selon la méthode de la diffusion des puits selon la technique de Barefoot et al (1983) cité dans **Diop** *et al.* (2007), 10µl d'une culture d'une nuit des germes indicateurs sont ensemencés dans 20ml de gélose Muller-Hinton fondue dans des boites de Pétri. Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement sur cette surface. Ces puits seront remplies avec 60 µl du surnageant. Ces boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C pendant 4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne. Les cultures seront mises dans leur conditions optimales de croissance. La lecture se fait par la mesure du diamètre en mm des zones d'inhibition formée autour des puits. On dit qu'une inhibition est positive si le diamètre est supérieur à 8 mm. Le test a été répété trois fois.

I-2-6- Evaluation des aptitudes probiotiques in vitro

I-2-6-1-Croissance sur milieu acide:

La technique décrite par Hyronimus et al (2000), a été appliquée.

Pour la réalisation de ce test, une culture jeune de chaque souches a été centrifugée à 6000 rpm pendant 10 minutes. Le culot a été reparti sur des tubes contenant du bouillon MRS ajusté à une valeur de pH =2 avec HCL (1N).

On procède à la mesure de la DO à 660 nm et au dénombrement des cellules à T= 0 h et après 3 h d'incubation à 37C. Le dénombrement a été réalisé sur gélose MRS après 24h d'incubation. Le test a été répété trois fois.

I-2-6-2- Croissance en présence de la bile :

La tolérance des cultures de *Lactobacillus* à la bile a été évaluée en utilisant la méthode de **Celestine** *et al.* 2011.

Ce test a été réalisé sur milieu MRS à pH acide. Une fraction de bouillon MRS additionnée de 0,3% de la bile et ajusteé a pH2 a été utilisée.

Le bouillon a été reparti en tubes avec un rapport V/9V. Chaque tube est additionné de 1ml d'inoculum d'une culture jeunes de *Lactobacillus*. On procède à la mesure de la DO à 660 nm et au dénombrement des cellules à T=0h et après 3h. Pour le dénombrement nous avons réalisé une série de dilution jusqu'à 10⁻⁹ dans des tubes contenant l'eau physiologique, ensuite la gélose a été coulée dans une série de boites de Pétri et laissée prendre en masse, puis ensemencée par 1 ml de la dernière dilution de cellule de *Lactobacillus*.

Le test a été répété trois fois.

I-2-6-3- Test d'adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliales :

La méthode décrite par Celestine et al. (2011), avec quelques modification été appliquée, est réalisée en trois étapes :

Séparation des cellules épithéliales : une portion de l'iléon du rat a été utilisée : tout d'abord ce fragment est lavé par solution tampon de phosphate salin PBS à pH 7.2 pour le débarrasser de tout son contenu ; il est ensuite placé dans un bain de PBS et soumis a une réfrigération à 4°C pendant 30min, afin de faciliter la récupération des cellules de la muqueuse. Après ce temps d'incubation, la préparation est soumise à 4 lavages dans le PBS suivis d'un repos pendant 3h à 4°C. La solution obtenue après cette durée d'incubation est la suspension des cellules épithéliales.

Préparation des *Lactobacillus*: une culture âgée d'une nuit est centrifugée à 6000Tr/min pendant 15 minutes; ensuite on récupère le culot et on lui ajoute 2ml du PBS, à partir de la suspension obtenue, on prépare les dilutions décimales V/9Vjusqu'à l'obtention de la dilution 10⁻⁸. A partir de cette dernière on effectue une observation microscopique à l'objectif x100 pour confirmer que le nombre des cellules des bactéries est approximativement supérieur à 10⁸ cellules/ml.

Adhésion : 1ml de la suspension des souches de *Lactobacillus* ensemencées dans le PBS est mélangé avec 1ml de la suspension des cellules épithéliales, puis incubé à 37°C pendant 45 min. Après l'incubation une goutte de ce mélange est colorée avec une goutte de cristal violet additionne d'alcool.

Observation microscopique: elle est faite à l'objectif x100 après la préparation des frottis et coloration au cristal violet. Le test est positif s'il y aura une adhésion au mois 15 cellules de *Lactobacilus* aux cellules épithéliales.

Le test a été répété trois fois.

Analyse statistique:

L'étude statistique par le test de l'ANOVA.

Résultats et discussion

II- Résultats et discussion :

II-1- L'activité antibactérienne :

Les résultats obtenus au cours de ce test, visant à mettre en évidence une éventuelle production de substance inhibitrices par notre collection de *Lactobacillus* humain envers les différentes souches indicatrices, sont résumés dans le tableau (6).Le test est significatif, il a été répété indépendamment 03 fois avec une p<0,05.

Tableau (6): Résultats de l'antagonisme bactérien entre les souches de *Lactobacillus* et les germes tests.

SI ST	E.colipath ogène	E.coli ATCC	Bacillus cereus	Listeria monocytogene	Salmonella	SARM*	Klebsiella
L.paracasei subsp paracasei (A20)	20,67±0,33	12,00±1,00	26,00±1,00	24,00±1,00	14,33±1,33	15,67±1,33	14,00±1,00
L.fermentum (H7)	00	00	15,00±1,00	22,33±1,33	00	25,33±0,33	00
L.paracasei subsp paracasei (A9)	12,33±0,33	17,33±0,33	26,00±1,00	22,67±0,33	14,00±0,00	23,67±1,33	14,67±1,33
L.acidophilus (12)	23,00±1,00	19,67±0,33	30,00±1,00	15,00±1,00	15,00±1,00	22,67±0,33	14,33±0,33
L.gasserii (D8)	16,00±0,00	13,67±1,33	37,30±0,33	36,33±0,33	28,33±0,33	19,67±0,33	24,67±0,33

Les zones d'inhibition ont été mesurées en mm. Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'erreur standard de la moyenne. Chaque donnée est la moyenne de trois mesures répétées issues de trois expérimentations reproduites indépendamment (n=3) avec un p < 0.05.

SARM* Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline.

SI: souches indicatrices.

ST: souches tests.

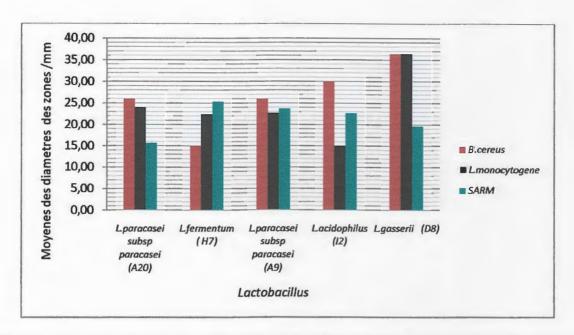


Figure (7): Pouvoir antagoniste des souches de *Lactobacillus vis-à-vis* des souches indicatrices Gram positives.

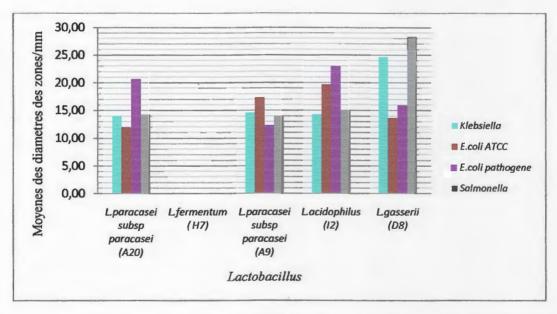


Figure (8): Pouvoir antagoniste des souches de *Lactobacillus vis-à-vis* des souches indicatrices Gram négatives.

Un résultat positif du test de l'antagonisme d'une souche microbienne vis-à-vis des germes tests par la technique de diffusion sur gélose se traduit par la présence d'une zone d'inhibition claire autour du disque. Les résultats sont mesurés en mm. Dans notre travail, nous avons remarqué que le meilleur profil d'inhibition a été observé chez la souche L.gasserii (D8) qui présente les zones d'inhibition les plus importantes contre les germes tests Gram positifs : Bacillus cereus et Listeria monocytogenes avec des moyenes des diamètres de 37, 30 mm et de 36, 33mm respectivement. Par ailleurs, les diamètres d'inhibition de cette souche envers les autres germes indicateurs varient entre 13,67 et 28,33mm. Les souches L.acidophilus (I2) et L.paracasi subsp

paracasei (A9) et *L. paracasi subsp paracasei* (A20) présentent des activités antagonistes *vis-àvis* de tous les germes tests avec des zones d'inhibitions intéressantes. La souche *L. fermentum* n'inhibe aucun germe Gram négatif comme le montre la figure (8).

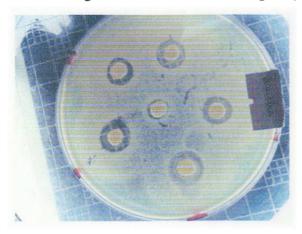


Photo (1): Résultat de l'activité antagonissique des souches de Lactobacillus (A20) (A9) (D8) vis-à-vis Bacillus cereus.

Le pouvoir inhibiteur des souches de *Lactobacillus* provient de la production de différents métabolites antagonistes, extracellulaires et diffusibles (Celestine et al. 2011):

- Production des acides organiques, essentiellement de l'acide lactique, dont le pouvoir antimicrobien repose sur l'abaissement du pH.
- Production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).
- Production des bactériocines.

A ce stade de notre travail nous supposons que l'activité antimicrobienne de nos souches provient d'un ou plus de ces facteurs combinés.

II-2- Détermination de l'activité bactériocinogène :

Les résultats de l'activité antimicrobienne des surnageants neutralisés et traités par catalase (SNTC) vis-à-vis des germes indicateurs Gram positifs : Listeria monocytogenes , Bacillus cereus et Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline et les germes indicateurs Gram négatifs : Klebsiella , E.coli ATCC, E.coli pathogène et Salmonella sont résumés dans le tableau (7) et la figure (9). Le test est significatif, il a été répété indépendamment 03 fois avec une p<0,05.

Tableau (7): l'activité antimicrobienne des surnageants neutralisés et traités par catalase vis-à-vis de Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline, Klebsiella, E.coli ATCC, E.coli pathogène et Salmonella.

SI ST	Bacillus cereus	Listeria monocytogene	SARM*	Klebsiella	E.coli ATCC	E. coli pathogène	Salmonella
L.paracasei subsp paracasei (A20)	27,67±4,33	18,67±1,33	29,67±0,33	00	00	00	00
L.fermentum (H7)	00	13,67±2,33	18,33±1,33	00	00	00	00
L.paracasei subsp paracasei (A9)	30,33±0,33	13,67±1,33	30,00±1,00	00	00	00	00
L.acidophilus (I2)	29,00±1,00	21,33±1,33	33,33±2,33	00	00	00	00
L.gasserii (D8)	19,00±1,00	22,67±0,33	24,00±1,00	00	00	00	00

Les zones d'inhibition ont été mesurées en mm. Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'erreur standard de la moyenne. Chaque donnée est la moyenne de trois mesures répétées issues de trois expérimentations reproduites indépendamment (n= 3) avec un p < 0,05.

SARM* Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline.

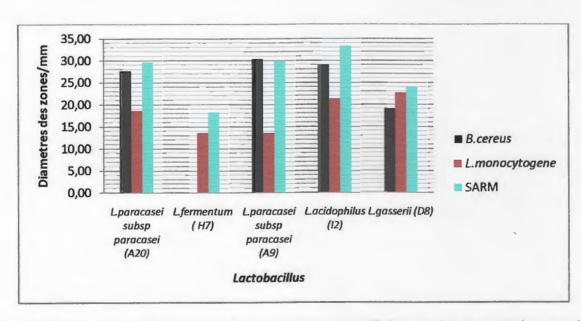


Figure (9): l'activité antimicrobienne des surnageant neutralisés et traités par catalase vis-à-vis des germes indicateurs Gram positifs.

D'après le tableau(7) et la figure(9), on remarque que tous les SNTC de nos souches de Lactobacillus manifestent une activité vis-à-vis des germes indicateurs Gram positifs Listeria monocytogenes, Bacillus cereus et Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline sauf (H7).

Dans notre travail, nous avons remarqué que le meilleur profil d'inhibition a été observé chez la souche *L.acidophilus* (I2) qui présente les zones d'inhibition les plus importantes contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus* avec des moyenes des diamètres de 33,33 mm, 29,00 mm et 21,33 mm respectivement. Les souches *L.gasserii* (D8), *L.paracasi subsp paracasei* (A9) et *L.paracasi subsp paracasei* (A20) présentent également des zones d'inhibitions intéressantes *vis-à-vis* de tous les germes tests Gram positifs.

La souche *L. fermentum* (H7) n'a pas d'effet inhibiteur contre *Bacillus cereus* et montre l'activité inhibitrice la plus faible contre *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline par rapport aux autres souches de *Lactobacillus*.

Toutes nos souches de *Lactobacillus* ne présentent aucun effet inhibiteur contre les germes indicateurs Gram négatifs. Les bactériocines ont une activité contre les bactéries à Gram positif à cause de leur paroi ; aucune bactériocine agissant sur les Gram négatifs a été décrite (**Dortu et Thonart, 2009**).

L'inhibition par l'acide lactique et H₂O₂ est exclue par la neutralisation du pH du surnageant et l'ajout de la catalase, par conséquent, l'activité antimicrobiennes des surnageants des souches de Lactobacillus: Lacidophilus (I2), L.gasserii (D8), L.paracasi subsp paracasei (A9) et L.paracasi subsp paracasei (A20), L.fermentum (H7) est due probablement à des substances de nature peptidique tels que les bactériocines (Yang et al. 1992).

II-3- Evaluation des aptitudes probiotiques in vitro

II-3-1-Croissance sur milieu acide:

Les résultats des valeurs moyennes de la résistance des souches de *Lactobacillus* en milieu acide, à pH 2 au temps 0 et après 3 heures d'incubation sont représentés dans le tableau (8) et la figure (10). Le test est significatif, il a été répété indépendamment 03 fois avec une p<0,05.

Tableau(8) :L'effet de l'acidité (pH=2) sur la viabilité des souches de Lactobacillus.

	I	H:2	
Souches	Log UFC/ml au T=0 h	Log UFC/ml au T=3h	Log de réduction
L.paracasei subsp paracasei (A20)	8 ,91 ± 0,59	8,41 ± 0,24	0,5 ± 0,35
L.paracasei subsp paracasei (A9)	10,01 ± 0,01	8,67 ± 0,14	1.37 ±0,13
L.acidophilus (I2)	9,17 ± 0,22	8,98 ± 0,09	0.19 ±0,13
L.gasserii (D8)	9,52 ± 0,11	9,44 ± 0,14	0.08 ±0,03
L fermentum (H7)	8,71 ± 0,10	00	8,71 ±0,10

Les valeurs sont en log UFC/ml. Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'erreur standard de la moyenne. Chaque donnée est la moyenne de trois mesures répétées issues de trois expérimentations reproduites indépendamment (n= 3) avec un p < 0,05.

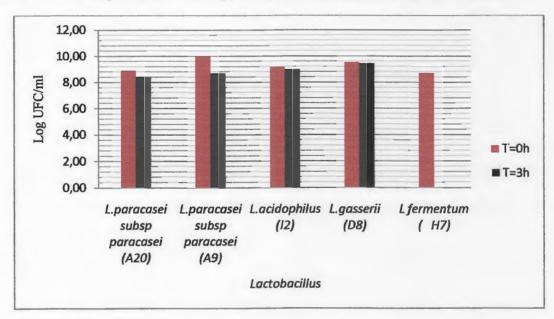


Figure (10): Effet du pH 2 sur la viabilité des souches de Lactobacillus en temps T=0h et T=3h

D'après les résultats obtenus, on observe que le nombre des cellules diminue variablement selon les souches à pH=2 après 3 heures d'incubation. La souche *L.gasserii* (D8) et la souche *L.acidophilus* (I2) représentent les plus grandes résistances à l'acidité, suivi par la souche *L.paracasei subsp paracasei* (A20) et *L.paracasei subsp paracasei* (A9) avec des taux de réduction faibles de 0.08, 0.19, 0.5, 1.37 respectivement.

Par contre la souche L. fermentum (H7) n'a pas toléré l'acidité, elle a été totalement inhibée.

Les différentes régions du tractus gastro-intestinal présentent différents niveaux d'acidité. L'estomac et les régions après l'estomac ont la plus forte acidité et le pH de ces zones peut diminuer très bas. L'acidité est le facteur le plus nuisible qui affecte la croissance et la viabilité de *Lactobacillus*, par ce que leur croissance diminue au-dessous de pH 4.5(Dunne et al. 2010).

Une des caractéristiques importantes des *Lactobacillus* retenus comme probiotiques en santé ou en alimentation humaine, est leur capacité à survivre au passage dans l'estomac. Selon **Desai** (2001) la survie de souches bactériennes dans le suc gastrique humain est une indication précise de leur capacité à survivre au passage dans l'estomac, pour atteindre leur site d'action et exercer leurs effets bénéfiques en tant que probiotiques. Nos souches D8, I2, A20 et A9 présentent ce critère probiotique et peuvent résister aux conditions hostiles de l'estomac.

II-3-2- Croissance en présence de la bile :

Les résultats des valeurs moyennes de la résistance des souches de *Lactobacillus* en présence des sels biliaires à 0.3% à pH 2 au temps 0 et après 3 heures d'incubation sont représentés dans le tableau (9) et la figure (11). Le test est significatif, il a été répété indépendamment 03 fois avec une p<0,05.

Tableau (9) :L'effet des sels biliaires à 0.3% sur la viabilité des souches de Lactobacillus.

	pH : 2 + sels biliaires 0.3 %							
Souches	Log UFC/ml au T=0 h	Log UFC/ml au T=3h	Log de réduction					
L.paracasei subsp paracasei (A20)	8 ,22± 0,06	7,56± 0,40	0,66±0,34					
L.paracasei subsp paracasei (A9)	9 ,14± 0,22	7,99±0,02	1,15±0,2					
L.acidophilus (I2)	8,48± 0,16	7,42±0,03	1,06±0,13					
L.gasserii (D8)	7,50± 0,01	7,25± 0,06	0.25±0,05					
L fermentum (H7)	8,76±0,11	0,37±0,03	7,39±0,08					

Les valeurs sont en log UFC/ml. Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'erreur standard de la moyenne. Chaque donnée est la moyenne de trois mesures répétées issues de trois expérimentations reproduites indépendamment (n= 3) avec un p < 0,05.

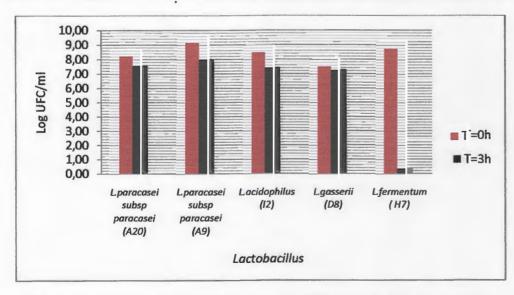


Figure (11): Effet des sels biliaires à 0.3% sur la viabilité des souches de *Lactobacillus* en temps T=0 h et T=3 h.

Selon les résultats obtenus, on observe que la souche *L.gasserii* (D8) représente la meilleure résistance à la bile avec un taux de réduction le plus bas 0.25 ,suivi par la souche *L.paracasei subsp paracasei* (A20), *L.acidophilus* (I2), puis *L.paracasei subsp paracasei* (A9) avec des taux de réduction respectivement de 0.66, 1.06, 1.15.

La souche *L fermentum* (H7) présente une grande sensibilité à la bile révélée par une grande variabilité entre la valeur moyenne de sa croissance en t=0h et après 3 heure d'incubation.

La présence de la bile provoque un stress des cellules ce qui modifie leur capacité de survie et élimine une partie plus ou moins importante de la population initiale selon les souches testées (Izquierdo, 2009).

En général, on peut conclure que les souches *L.gasserii* (D8), *L.paracasei subsp paracasei* (A20), *L.paracasei subsp paracasei* (A9) et *L.acidophilus* (I2) résistent bien à l'action combinée de l'acidité et la bile .Selon **Hamon** *et al.* (2011) la résistance à ces deux conditions combinées augmente la durée de survie des souches bactériennes dans l'estomac et le jus intestinal ce qui leur permet d'exercer leur effet bénéfique sur la santé de l'hôte.

La sensibilité de la souche *L. fermentum* (H7) *vis-à-vis* de la bile et à l'acidité séparément et combinés montre qu'il n'y a pas de corrélation entre le caractère bactériocinogène et la résistance aux conditions hostiles de l'estomac et de suc gastrique et qu'une souche bactériocinogène ne présenterait pas forcément les autres traits probiotiques.

II-3-3- Test d'adhésion des Lactobacillus aux cellules épithéliales :

Les résultats de l'adhésion des souches de *Lactobacillus* aux cellules de l'iléon prélevés chez le rat sont présentés dans le tableau (10). Le test est significatif, il a été répété indépendamment 03 fois avec une p<0,05.

Tableau (10): Adhésion des différentes souches de Lactobacillus aux cellules épithéliales de rat

Souches	Le nombre des cellules de Lactobacillus adhérées/ cellule de l'épithélium
L.paracasei subsp paracasei (A20)	$77,33 \pm 6,33$
L.paracasei subsp paracasei (A9)	30.67 ± 14.33
L.acidophilus (I2)	55.33 ± 16.33
L.gasserii (D8)	73,00 ± 9,00
L fermentum (H7)	18.33 ± 6.33

Les valeurs sont en nombre des cellules de *Lactobacillus* adhérées/ml. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne. Chaque donnée est la moyenne de trois mesures répétées issues de trois expérimentations reproduites indépendamment (n= 3) avec un p <0 ,05

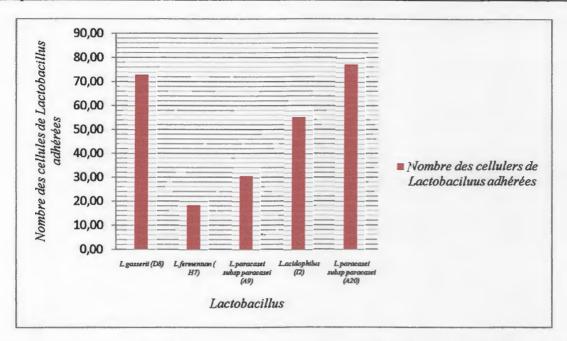


Figure (12): Adhésion des différentes souches de Lactobacillus aux cellules épithéliales de rat.

La capacité d'adhésion a été déterminée par microscopie optique à caméra (grossissement x100) après une coloration au cristal violet additionné d'alcool.

Le test d'adhésion est considéré comme positif si le nombre de cellules adhérées est égal ou supérieur à 15.

Toutes les souches de Lactobacillus étudiées représentent une excellente adhésion aux cellules épithéliales de l'iléon de rat. C'est les souches L.paracasei subsp paracasei (A20) et L.gasserii (D8) qui montrent les meilleurs profils d'adhésion aux cellules épithéliales de rat avec une moyenne de 77.33et 73.00 respectivement, suivi par L.acidophilus (I2) 55,33, L.paracasei subsp paracasei (A9) 30,67et L.fermentum (H7)18,33.

La microflore intestinale est essentiellement située dans les parties terminales de l'intestin grêle (l'iléon) et surtout dans le colon, alors que l'estomac et les parties hautes de l'intestin grêle sont très faiblement colonisés par les bactéries commensales. C'est dans la partie ascendante du colon et dans l'iléon ou certains bactéries comme lactobacillus, pourraient être plus abondantes (Morteau, 2005).

Les bactéries probiotiques peuvent posséder divers mécanismes d'adhésion, comme les adhésines qui aident à l'adhérence et la colonisation de l'intestin. L'évaluation in vitro de l'adhésion fournit un modèle approprié pour l'estimation de la capacité des probiotiques à adhérer aux surfaces intestinales. Il a été suggéré que l'adhésion des lactobacilles au mucus intestinal de l'homme a une fonction probiotique dans la prévention de l'adhérence et de la colonisation de celui-ci par les agents pathogènes envahisseurs (Juntunen, 2001).

Conclusion

Conclusion

L'objectif de notre travail, était d'essayer de savoir si des souches de Lactobacillus bactériocinogènes d'origine humaine : L. paracasei subsp paracasei (A20), L. paracasei subsp paracasei (A9), L. acidophilus (I2), L. gasserii (D8), L. fermentum (H7) présenteraient ou non les autres traits probiotiques, par l'étude de :

- La tolérance des souches vis-à-vis à l'acidité;
- La tolérance des souches vis-à-vis aux sels biliaires ;
- Pouvoir d'adhésion sur les cellules épithéliales du rat ;
- ➤ La présence d'une corrélation entre l'activité bactériocinogène et les autres critères probiotiques.

L'évaluation de caractères probiotiques des souches de Lactobacillus a fait ressortir que :

Le test de la tolérance à l'acidité et aux sels biliaires montre que les souches *L. gasserii* (D8), *L. acidophilus* (I2), *L. paracasei subsp paracasei* (A20) et *L. paracasei subsp paracasei* (A9) représentent une bonne résistance à l'acidité et aux sels biliaires avec des taux de réduction faibles donc elles peuvent résister aux conditions hostiles de l'estomac.

Par contre la souche *L. fermentum* (H7) n'a pas toléré ni l'acidité, ni la bile, elle a été totalement inhibée par les deux. Les résultats du test d'adhésion montrent que toutes les souches de *Lactobacillus* étudiées présentent une bonne adhésion aux cellules épithéliales de l'iléon de rat avec un meilleur profil pour la souche *L. gasserii* (D8).

L'étude statistique par le test de l'ANOVA a montré que tous les tests sont significatifs avec une p<0,05

La sensibilité de la souche *L. fermentum* (H7) vis-à-vis de la bile et à l'acidité séparément et combinés montre qu'il n'y a pas de corrélation entre le caractère bactériocinogène et la résistance aux conditions hostiles de l'estomac et de suc gastrique et qu'une souche bactériocinogène ne présenterait pas forcément les autres traits probiotique.

Ces souches bactériocinogènes trouveront peut-être une application dans l'industrie alimentaire en tant que cultures protectrices pour la conservation des aliments contre les contaminants alimentaires comme *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*.

Enfin, de notre travail, il en ressort qu'il n'y'a pas de rapport entre l'activité bactériocinogène et les autres traits probiotiques. D'autres travaux, avec un nombre d'échantillon plus élargi et des études statistiques plus complètes sont nécessaires pour confirmer ou non nos résultats.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Ait belgnaoui A. (2006). Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse.France.

Baruzzi F, Poltronieri P, Quero G, Morea M et Morelli L.(2011). An in vitro protocol for direct isolation of potential probiotic lactobacilli from raw bovine milk and traditional fermented milks. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90:331–342.

Bekhouche F. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et identification biochimique 2. Evaluation et optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat. Université de Mentouri, Constantine.

Bazo M. (2011). Recherche des effets de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques sur le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). Thèse de doctorat. Université du Québec Montréal.

Bousseboua H. (2002). Elément de microbiologie générale. Edition de l'Université Mentouri. Constantine, pp 73.

Celestine S, Khiang P, Rajeev B, Liong M. (2011). Probiotic properties of bifidobacteria and lactobacilli isolated from local dairy products. Ann. Microbiol:349-357.

Chukeatirote, E.(2003). Potential use of probiotics. Songklanakarin J. Sci. Technol. 25(2): 275-282.

Desai A .(2008). Strain identification, viability and probiotics proprieties of *Lactobacillus casei*. Ph D. Victoria University . Australia.

Diop M, Dauphin R, Tin E, Ngom A, Destain J and Thonart P, (2007). Bacteriocin producers from traditional food products. Biotechnol . Agron . Soc. Environ. 11(4): 275-281.

Dortu C. (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse de doctorat. Faculté de Gembloux . Belgique.

Dortu C et Thonart P (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol. Agron.Soc. Environn. 13(1): 143-154.

Dunne C, Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, Sullivan G, Shanahan F and Collins J. (2010). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am. Soc. for Cli. Nut. 73: 386–392.

FAO/OMS Rappert d'expert.(2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

Federeghi M. (2005). Les bacteries lactiques in « *Bactériologie Alimentaire* ». 2^{éme} édition. ECONOMICA.Paris, pp 101,230

Garry P, Christieans S et Cartier P.(2008). Procèdes de bio-préservation. 12^e Journées des « Sciences du Muscle et technologie des viandes ». Clemont-Ferrand. France. pp 203-207.

Gilda K. (2010). Aspects physicochimique de l'encapsulation et le des encapsulations des probiotiques. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg. France.

Grattepanche F.(2005). Etude d'un système de prefermentation en continu du lait par une culture mixte immobilisee fonctionnelle. Thèse de doctorat. Université Laval.

Hamon E, Horvatovich P, Izquierdo E, Bringel F, Marchioui E, Aoudé-Werner D and Ennahar S. (2011). Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. BMC Microbiology. 11(63): 1471-2180.

Hyronimus B, Marrec C, Hadj Sassi A and Dechampps A .(2000). Acid and bile tolerance of spore/forming lactic acid bacteria. Int. J. of food microbiol.61:193-197.

Izquierdo E. (2009). Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg .France.

James W, Roberto M, Ragione L, Martin J, Woodward .(2009). 30 Application of Prebiotics and Probiotics in Livestock. Springer Science, LLC:1126-1181.

Juntunen M, Kirjavainen P, Ouwehand A, Salimen S and Isolauri E .(2001). Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. Clin. & Diag. Labo. Immu: 293-296.

Makhloufi K .(2012). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique Leuconostoc pseudomesenteroides isolée du boza .Thèse de doctorat. Universite Pierre et Marie Curie, France.

Mélanie G. (2007). Rôle des probiotiques lors d'infections entériques d'origine bactérienne et virale : analyses *in vitro* et études *in vivo* chez des modèles murins .Thèse de doctorat. Université Laval Québec.Canada.

Metlef S et Dimili-Bouras A . (2009). Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. Natu & technol: 33-44.

Morteau P et Seksik P .(2005). Probiotique et alcaliments in « Bactéries lactiques probiotiques ». Edition, Tec& Doc .Lavoisier .Paris , pp 256-289.

Naghmouchi K. (2007). Divergicine M35, une nouvelle bactériocine produite par *Carnobacterium divergens* M35: caractérisation moléculaire du mécanisme d'action antimicrobien et du phénomène de resistance. Thèse de doctorats. Université Laval .Canada.

Penaud S. (2006). Analyse de la séquence génomique et l'étude de l'adaptation à l'acidité de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC11842. Thèse de doctorat. Institut National Agronomique De Paris-Grignon.France.

Prioult G. (2003). Effet des probiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la β -lactoglobuline chez la souris et étude de leurs mécanismes d'action. Thèse de doctorats. Universite Laval Canada.

Robin J M & Rouchy A. (2001). Les probiotiques. Centre d'Etude et de Développement de la Nutrithérapie.

Rousseau V.(2004). Evaluation d'oligosaccharides a effet prebiotiquevis-a-vis de la microflore vaginale. Thèse de doctorat. Université Toulouse.France.

Saad N. (2010). Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum 299v* avec l'hôte : approche *in vitro* .Thèse de doctorat. Université de Limoge, France.

Slover C & Danziger L .(2008). Lactobacillus. Clin. Microbiol.New. 30.4:23-27.

Tabak S & Bensoltane A .(2012). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium bifidum et Lactobacillus bulgaricus) vis-à-vis de la souche Helicobacter pylori responsable des maladies Gastroduodénales. Natu & Technol.06: 71-79.

Tailliez P. (2004). Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine in «Les *Antibiotiques* ». Masson, Paris, pp 35-41.

Varsalovic J & Wilson M. (2008). Lactobacilli in «Therapeutic Microbiology: Probiotics And Related Strategies». ASM Press, Washington, pp 19.

Watterlot L. (2010). Analyse des effets des souches probiotiques anti-inflammatoires. Thèse de doctorats. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement. Paris .France.

Yang R, Monty C, and Ray B. (1992). Novel method to extract large amounts of bactériocins from lactic acid bacteria. Appl & environ. microbiol.58(10): 3355-3359.

Annexes

Annexe I

Milieux de culture :

-	MRS (Man,	Rogosa	et Sharp	e) (bo	uillon	et	gélose)
---	-------	------	--------	----------	--------	--------	----	---------

	Peptone. 10g Extrait de viande. 8g Extrait de levure. 4g Acétate de sodium. 5g Phosphate dipotassique. 2g Citrate d'ammonium. 2g Sulfate de magnésium. 2g Sulfate de manganèse. 0.05g Glucose. 20g Tween 80. 1ml Agar (dans le cas de gélose). 15g Cystéine. 1g Eau distillée qsp. 1000ml
- Gélo	ose Muller Hinton
•	Infusion de viande de bœuf
	pH =7,4
- Gélos	Se nutritive Peptone
•	Chlorure de sodium
	pH =7,5
- Bou	illon nutritif
•	Peptone

- Gélose M17

•	Tryptone	2,50g
•	Peptone pepsique de viande	2,50 g
•	Peptone papaïnique de soja	5,00 g
•	Extrait autolytique de levure	2,50 g
•	Extrait de viande	
•	Lactose	5,00 g
•	Glycérophosphate de sodium	19,00 g
•	Sulfate de magnésium	0,2 g
•	Acide ascorbique	0,50 g
•	Agar bactériologique	
•	Eau distillée	_

 $pH = 7,1 \pm 0,2.$

Annexe II

Réactifs et tampon pour les aptitudes probiotiques

Réactifs

_ 7	Vio	let	de	gen	tian	e
-----	-----	-----	----	-----	------	---

•	Violet de gentiane	1g
	Ethanol à 90%	_
•	Phénol	29
	Eau distillée	-

Tampon pour les aptitudes probiotiques

- Milieu PBS

•	Na_2HPO_4 10).9g
	$Na_2H_2PO_4$	
•	NaCl	.90g
•	Eau distillée	00ml

Annexe III

Tableau 1 : Diamétres des zones d'inhibition de test de pouvoir antagoniste des souches de *Lactobacillus* contre les germes Gram positifs.

ST				Listeria monocytogenes			Staphylococcus aureus resistant à la méthicilline		
	Exp 1	Exp2	Exp3	Exp1	Exp2	Exp3	Exp1	Exp2	Exp3
L.paracasei subsp paracasei (A20)	26	27	25	24	23	25	17	15	15
L.fermentum (H7)	15	16	14	21	23	23	26	25	25
L.paracasei subsp paracasei (A9)	25	27	26	23	23	22	23	23	25
L.acidophilus (I2)	30	31	29	15	14	16	23	23	22
L.gasserii (D8)	37	36	36	36	37	36	20	19	20

 $\label{thm:controller} \begin{table} Tableau 2: Diamétres des zones d'inhibition de test de pouvoir antagoniste des souches de \\ \textit{Lactobacillus} \ contre les germes \ Gram \ négatifs \end{table}$

ST	Esch	herichia ATTC	coli	I	herichia oathogèn		S	almonell	'a	Klebsiella			
	Exp1	Exp2	Exp3	Exp1	Exp2	Exp3	Exp1	Exp2	Exp3	Exp1	Exp2	Exp3	
L.paracasei subsp paracasei (A20)	12	11	13	21	21	20	13	15	15	15	13	14	
L.fermentum (H7)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
L.paracasei subsp paracasei (A9)	17	17	18	12	12	13	14	14	14	14	16	14	
L.acidophilus (I2)	19	20	20	23	22	24	16	14	15	14	15	14	
L.gasserii (D8)	13	15	13	16	16	16	29	28	28	24	25	25	

Tableau 3 : Log UFC/ml de l'effet du pH 2 sur la survie des Lactobacillus

Temps		T 0h	T3h				
ST	Exp1	Exp2	Exp3	Exp1	Exp2	Exp3	
L.paracasei subsp paracasei (A20)	9,68	8,15	8,89	8,82	7,86	8,54	
L.fermentum (H7)	8,35	8,96	8,82	0	0	0	
L.paracasei subsp paracasei (A9)	10,07	10,05	9,92	9,05	8,3	8,67	
L.acidophilus (I2)	9,16	8,71	9,65	9,18	8,63	9,12	
L.gasserii (D8)	9,73	9,14	9,68	9,69	9,62	9,01	

Tableau 4 : Log UFC/ml de effet des sels biliaires à pH 2 sur la survie des Lactobacillus

Temps		T 0h	T 3h						
ST	Exp1	Exp2	Exp3	Exp 1	Exp 2	Exp 3			
L.paracasei subsp paracasei (A20)	8,3	8,43	7,94	7,22	8,29	7,17			
L.paracasei subsp paracasei (A9)	9,68	8,94	8,81	8,16	7,89	7,93			
L.acidophilus (I2)	8,93	8,16	8,34	7,61	7,4	7,25			
L.gasserii (D8)	7,55	7,38	7,56	7,51	7,22	7,02			
L.fermentum (H7)	8,43	9,08	8,78	0,22	0,56	0,32			

Tableau 5 : Résultats d'adhésion des bactéries lactiques aux cellules épithéliales.

Le nombre des cellules de <i>Lactobacillus</i> / cellule épithéliale								
Exp1	Exp2	Exp3						
76	70	73						
16	21	18						
35	29	28						
56	59	51						
75	77	80						
	Exp1 76 16 35 56	Exp1 Exp2 76 70 16 21 35 29 56 59						

Tableau6 : l'activité antimicrobienne des surnageant neutralisés et traités par catalase *vis-à-vis* de *Listeria monocytogenes* , *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline , *Klebsiella* , *E.coli* ATCC , *E.coli* pathogène et *Salmonella*.

SI	E. coli ATTC			E. coli pathogène		Salmonella		SRM		Klebsiella		Listeria monocytogenes			Bacillus cereus						
	ex 1	ex 2	ex 3	ex 1	ex 2	ex 3	ex 1	ex 2	ex 3	ex 1	ex 2	ex 3	ex 1	ex 2	ex 3	ex 1	ex 2	ex 3	ex 1	ex 2	ex 3
L.paracasei subsp paracasei (A20)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	30	30	0	0	0	18	18	20	27	30	26
L.fermentum (H7)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	17	19	0	0	0	15	14	12	0	0	0
L.paracasei subsp paracasei (A9)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31	29	30	0	0	0	13	15	13	30	30	31
L.acidophilus (I2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35	33	32	0	0	0	20	22	22	29	28	30
L.gasserii (D8)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	25	23	0	0	0	22	23	23	20	19	18
			·				Di	amè	tres	des 2	zone	s en	mm								

	,	
		,

Membres du Jury:

Président: Dr. Boudiarda. J Encadreur: Mme. Bahri. F

Examinatrice: Dr. Ouled Haddar. H

Réalisé par : **Boussandel Hadda** Zaabat Fatima

Thème

L'étude du pouvoir probiotique de différentes souches bactériocinogenes de Lactobacillus isolées chez l'homme

Résumé

Le but de notre travail, était d'essayer de savoir si des souches de Lactobacillus bactériocinogènes d'origine humaine :L. paracasei subsp paracasei (A20), L. paracasei subsp paracasei (A9), L. acidophilus (I2), L. gasserii (D8), L. fermentum (H7) présenteraient ou non les autres traits probiotiques.

L'évaluation des caractères probiotiques des souches de Lactobacillus a fait ressortir que les souches: L. gasserii (D8), L. acidophilus (I2), L. paracasei subsp paracasei (A20) et L.paracasei subsp paracasei (A9) présentent tous les caractères probiotiques testés avec un meilleur profil pour la souche L. gasserii(D8). L'inhibition complète de la souche L. fermentum (H7) vis-à-vis de la bile et à l'acidité, séparément et combinés, montre qu'il n'y a pas de corrélation entre le caractère bactériocinogène et la résistance aux conditions hostiles de l'estomac et de suc gastrique et qu'une souche bactériocinogène ne présenterait pas forcément les autres traits probiotique. D'autres travaux, avec un nombre d'échantillon plus élargi et des études statistiques plus complètes sont nécessaires pour confirmer ou non nos résultats.

Mots clefs: Lactobacillus, bactériocinogène, caractères probiotiques, corrélation.

Abstract

The aim of our work was to try to find if bacteriocinogenic Lactobacillus strains of human origin: L. paracasei subsp paracasei (A20), L. paracasei subsp paracasei (A9), L. Acidophilus (12), L. gasserii (D8), L. fermentum (H7), would present or not other probiotic traits. Evaluation of probiotic characters of Lactobacillus strains have shown that strains: L. gasserii (D8), L. acidophilus (12), L. paracasei subsp paracasei (A20) and L. paracaseisubsp paracasei (A9) presented all the probiotic proprieties with a better profile for the strain L. gasserii (D8). The total inhibition of the strain L. fermentum (H7) in the presence of propréities bile and acid, separately and combined, shows that there is no correlation between the bacteriocinic character and resistance to hostile conditions of the stomach and gastric juice and that a baceriocinogenic strain does not necessarily present other probiotic traits. Further work with a number of broader sample and more complete statistical studies are needed to confirmed or not our results.

Key words: Lactobacillus, bacteriocinogenic, probiotic character, correlation

كان الهدف من هده الدراسة هو محاولة معرفة إذا كانت سلالات Lactobacillus البكتريوسنية التي عزلت عند الإنسان: L.paracasei subsp paracasei (A20), L.paracasei subsp paracasei (A9), L. Acidophilus (I2) L. gasserii (D8), L. fermentum (H7) لديها أولا خصائص بروبيوتكية أخرى.

L. gasserii (D8), L. acidophilus (I2), تُقييم الخصائص البروبيوتكية السلالات Lactobacillus كشفت أن السلالات L.paracasei subsp paracasei (A20) و L.paracasei subsp paracasei (A20) لديها جميع الخصائص البروبيوتكية مع أفضل النتائج للسلالة L. gasserii (D8) التثبيط الكامل للسلالة (H7) في اختبار الحموضة و مقاومة الأملاح الصفراوية كل على حدة أو مجتمعة يبين أنه ليست هناك علاقة بين الخاصية البكتريوسنية و مقاومة الظروف المعدية و عصارة الجهاز الهضمي وأن أي سلالة بكتريوسنية ليس لديها بالضرورة الخصائص البروبيوتكية الأخرى. أعمال أخرى، مع عدد أكبر من الدراسات الإحصائية وعينات أوسع نطاقا وأكثر شمولا مطلوبة من

أجل تأكيد أو لا النتائج التي توصلنا إليها.

الكلمات المفتاحية: Lactobacillus ، خاصية البروبيوتيك ، البكتريوسنية الارتباط.