

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

UNIVERSITE DE JIJEL
جامعة جيجل

MB09106

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
ET MICROBIOLOGIE



MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme d'études supérieures en Biologie
OPTION
Microbiologie

THEME

Caractérisation partielle de bactériocines
produites par quelques bactéries lactiques
et étude de l'effet de *L.plantarum* et
P.acidilactici sur les lipides sanguins de
lapin

Membres du Jury :

Président : M^{elle} BOUHAFS Laila
Examineur : M^{elle} LAGGOUNE Souheila
Encadreur : Mr. IDOUI Tayeb

Réalisé Par :

M^{elle} : BOUHENNA Assia
M^{eme} : BOUSSEDER Widad
M^{elle} : BECHANI Nacéra



Promotion 2006

REMERCIEMENT

❖ *Nous remercions Dieu qui nous éclairé le bon chemin .*

❖ *Nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin à élaborer ce travail en particulier notre encadreur .MER « IDOUI.T » pour toute son aide .*

❖ *Nous remercions également les membres du jury qui nous ont fait l'honneur de juger notre travail .*

❖ *Un grand merci à l'ensemble du personnel de laboratoire de l'hôpital central de JIJEL .*

A ceux un grand merci .

SOMMAIRE

Introduction générale	01
I.Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Les bactéries lactiques et les probiotiques.	
I.1. Les bactéries lactiques	02
I.1.1. Définition.....	02
I.1.2. Caractères généraux des bactéries lactiques.....	02
I.1.3. Origine.....	03
I.1.4.	
Classification.....	03
I.1.4.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	03
I.1.4.2. Le genre <i>Pediococcus</i>	04
I.1.5. Les caractéristiques métaboliques des bactéries lactiques.....	05
I.1.5.1. La production de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	05
I.1.5.2. L'effet protéinase (Trypsine, α -chymotrypsine).....	06
I.1.6. Importance et rôle des bactéries lactiques.....	06
I.2. Les probiotiques	07
I.2.1. Données générales.....	07
I.2.2. Définition.....	07
I.2.3. Caractéristiques des probiotiques.....	08
I.2.4. Mode d'action.....	08
I.2.5. Classification.....	09
I.2.5.1. Les bactéries lactiques.....	09
I.2.5.2. Les Bifidobactéries.....	09
I.2.5.3. Les levures.....	09
I.2.6. Rôle des probiotiques.....	10
I.2.6.1. Influence des probiotiques sur la cholestérolémie.....	11
Chapitre II : Les bactériocines.	
II.1. Définition et bactéries productrices.....	12
II.2. Caractères spécifiques aux bactériocines.....	12
II.3. Classification.....	13
II.3.1. Lantibiotiques.....	13
II.3.2. Peptides de faible poids moléculaires (non lantibiotiques).....	14
II.3.3. Peptides de haut poids moléculaire.....	14
II.3.4. Complexe Lipo ou Glyco-proteiques.....	15
II.4. Spectre et mode d'action des bactériocines.....	15
II.5. Aspect génétique.....	15
II.6. Bactériocines produites par <i>L.plantarum</i>	15
II.7. Bactériocines produites par <i>P.acidilactici</i>	16
II.8. Application des bactériocines.....	16
II.8.1. Application de la Nisine.....	16
II.8.2. Possibilité d'utilisation dans les produits laitiers.....	17

II.8.3.	Possibilité d'utilisation dans les produits carnés.....	17
II.8.4.	Possibilité d'utilisation dans le domaine thérapeutique.....	17
Chapitre III : Données sur les lipides plasmatiques et la glycémie.		
III.1.	Glycémie.....	18
III.1.1.	Définition et rôle	18
III.2.	Cholestérol total.....	18
III.2.1.	Définition et rôle du cholestérol.....	18
III.2.2.	sources de cholestérol.....	19
III.3.	Triglycéridémie.....	19
III.3.1.	Définition et rôle.....	19
* III.4.	Les lipoprotéines de faible densité (LDL).....	19
III.4.1.	Définition.....	19
III.4.2.	Origine et biosynthèse des LDL.....	19
III.4.3.	Le rôle des LDL.....	19
III.5.	Les lipoprotéines de haute densité (HDL).....	20
III.5.1.	Définition.....	20
III.5.2.	Origine et biosynthèse des HDL.....	20
III.5.3.	Rôle des HDL.....	20
III.6.	Normes des paramètres plasmatiques chez le lapin.....	20
II. Matériel et méthodes.		
II.1.	Matériel.....	21
II.1.1.	Souches bactériennes.....	21
II.1.2.	Lapin.....	21
II.1.3.	Le lait.....	21
II.1.4.	Le régime alimentaire.....	21
II.1.5.	milieux de culture.....	22
II.1.6.	Les enzymes,réactifs et autres produits.....	22
II.1.7.	Appareillages de laboratoire.....	23
II.1.8.	Matériel de l'élevage.....	24
II.2.	Méthodes.....	24
II.2.1.	Revivification des bactéries lactiques.....	24
II.2.2.	Caractérisation de la substance antibactérienne de <i>L.plantarum</i> et <i>P.acidilactici</i>	24
II.2.2.1.	Interaction bactérienne.....	24
II.2.2.2.	Effet des surnageants sur les souches indicatrices	25
II.2.2.3.	Effet du traitement thermique et du froid sur l'activité des surnageants... ..	26
II.2.2.4.	Effet de la digestion enzymatique sur l'activité des surnageants.....	26
II.2.2.5.	Recherche de phage dans les surnageants de culture.....	27

II.2.2.6. Détermination du mode d'action de la substance inhibitrice.....	27
II.2.2.7. Purification partielle de la substance inhibitrice.....	27
II.2.3. Effet de la <i>Lb. plantarum</i> et <i>Pc. acidilactici</i> sur les lipides plasmatiques et la glycémie chez le lapin.....	29
II.2.3.1. Préparation des animaux et des probiotiques.....	29
II.2.3.2. Dosage des lipides plasmatiques et glycémie.....	31
II.2.3.2.1. Dosage du glucose.....	31
II.2.3.2.2. Dosage du cholestérol.....	32
II.2.3.2.3. Dosage du T.G.....	34
II.2.3.2.4. Dosage du HDL-C.....	36
II.2.3.2.5. Dosage du LDL-C.....	38
II.3. Traitement statistique.....	39
III. Résultats et discussion	
III.1. Caractérisation de substance antibactérienne de <i>L. plantarum</i> et <i>P. acidilactici</i>	40
III.1.1. Interaction bactérienne.....	40
III.1.2. Recherche de bactéries bactériocinogènes et sensibles.....	41
III.1.3. Inhibiteurs des surnageants de <i>L. plantarum</i> et <i>P. acidilactici</i>	44
III.1.3.1. Effet des surnageants natifs.....	44
III.1.3.2. Effet des surnageants pH7.....	45
III.1.4. Effet de la digestion enzymatique sur l'activité des surnageants.....	47
III.1.4.1. Action de la catalase.....	47
III.1.4.2. Action des protéases (trypsine, α -chymotrypsine).....	49
III.1.5. Effet du traitement thermique et du froid sur l'activité des surnageants.....	50
III.1.6. Recherche de phage.....	52
III.1.7. Détermination de l'activité de la substance inhibitrice.....	52
III.2. Purification partielle de la substance inhibitrice.....	53
III.3. Caractéristiques des produits lactofermentés.....	55
III.4. Dosage des lipides plasmatiques et glycémie.....	56
III.4.1. La glycémie.....	56
III.4.2. Le cholestérol.....	58
III.4.3. La triglycéridémie.....	60
III.4.4. La HDLémie.....	62
III.4.5. La LDLémie.....	63
Conclusion Générale.....	66

Références Bibliographiques.

Annexes

Liste des abréviations

Apo : Apoprotéine .
ATp : Adénosine Triphosphate .
C : Cytosine .
°C : degrés Celsius .
CL : *Clostridium* .
Cm : Centimètre .
CM : Chylomicron .
CETP : Cholestérol Ester Transfer Protéine.
D.O : Densité Optique.
Ec : *Enterococcus* .
E. coli : *Escherichia coli* .
ECs : Extrait de cultures.
Fig : Figure .
G : Guanine.
g : gramme .
g/l : gramme par litre .
HDL: High Density Lipoproteins.
HDL -C: High Density Lipoproteins – Cholesterol.
h : heure .
IgG : Immunoglobuline de type G .
IgA : Immunoglobuline de type A .
L : *Lactobacillus*.
Lc : *Lactococcus* .
LDL: Low Density Lipoproteins.
LDL- C: Low Density Lipoproteins – Cholesterol.
LPL: Lipo Protéine Lipase.
MRS: Man Rogosa Sharpe.
ml : millilitre .
mn: minute .
mm : millimetre
mg : milligramme .
M : Mole.
µm: micrometer .
mg / dl : milligramme par décilitre .
nm: nanometer .
P : *Pediococcus*.
St : *Streptococcus*.
Tyr: Tyrosine.
Trp: Triptophane.
T.G: Tri Glyceride.
Tr : Tour.
VLDL: Very Low Density Lipoproteins.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les différentes caractéristiques de *L.plantarum*

Tableau 2 : Caractéristiques distinctives de *P. acidilactici*

Tableau 3 : Les principales bactériocines de *L plantarum*

Tableau 4 : Les différentes souches lactiques testées

Les principales bactériocines produites par quelques bactéries lactiques

Tableau 5 : Réactifs utilisés pour le dosage du glucose

Tableau 6 : Mode opératoire pour le dosage du glucose

Tableau 7 : Réactifs utilisés pour le dosage du cholestérol

Tableau 8 : Mode opératoire pour le dosage du cholestérol

Tableau 9 : Réactifs utilisés pour le dosage du triglycéride

Tableau 10 : Mode opératoire pour le dosage du triglycéride

Tableau 11 : composition des réactifs utilisés pour le dosage du HDL - cholestérol

Tableau 12 : Mode opératoire pour le dosage du HDL-C

Tableau 13 : Réactifs utilisés pour le dosage du LDL-C

Tableau 14 : Mode opératoire pour le dosage du LDL-C

Tableau 15 : Résultats des interactions

Tableau 16 : Résultats de la sélection des bactéries bactériocénogènes et sensibles.

Tableau 17: Résultats de l'effet inhibiteur des surnageants natifs

Tableau 18 : Résultats de l'effet inhibiteur des surnageants PH7

Tableau 19 : Résultats de l'effet inhibiteur des surnageants traités par la catalase

Tableau 20 : Résultats de l'effet inhibiteur des surnageants traités par les enzymes

Tableau 21 : Résultats de l'effet traitement thermique et froid sur l'activité des surnageants.

Tableau 22 : Résultats de l'effet des bactériocines purifiées.

Tableau 23 : Mesure d'acidité et de PH du lait fermenté.

Tableau 24 : Evolution de la glycémie en fonction de l'age du lapin (g/l)

Tableau 25 : Evolution de la cholestérolémie en fonction de l'age du lapin (g/l)

Tableau 26 : Evolution de la triglycéridémie en fonction de l'age du lapin (g/l)

Tableau 27 : Evolution de la HDL-émie en fonction de l'age du lapin (g/l)

Tableau 28 : Evolution de la LDL-émie en fonction de l'age du lapin (g/l)

Liste des Figures

- Figure 1 : Principaux mécanismes de génération des H_2O_2 par les bactéries lactiques
- Figure 2 : Purification partielle technique A désorption /désorption
- Figure 3: répartition des animaux. .
- Figure 4 : Préparation du probiotique *L. Planrarun* et *P. acidilactici*.
- Figure 5: voie d'administration de probiotique.
- Figure 6 : Illustration de l'activité antagoniste de *P. acidilactici*.
- Figure 7 : Illustration de l'effet inhibiteur des surnageants natifs et à pH 7 sur la
Souches *Lc. Lactis .ssp lactis B5*.
- Figure 8 : Illustre de l'effet inhibiteur du surnageant après traitement par la Catalase.
- Figure 9 : Illustration de l'effet inhibiteur des surnageants soumis aux traitements
Physique : chaleur et froid.
- Figure 10 : Illustration de l'effet de la substance inhibitrice après purification
Partielle sur les bactéries lactiques.
- Figure 11 : Évolution de la glycémie en fonction de l'âge du lapin (g/l).
- Figure 12 : Évolution de la cholestérolémie en fonction de l'âge du lapin (g/l).
- Figure 13 : Évolution de triglycérique en fonction de l'âge du lapin (g/l).
- Figure 14 : Évolution de HDL émie en fonction de l'âge du lapin (g/l).
- Figure 15 : Évolution de LDL émie en fonction de l'âge du lapin (g/l).



#

Introduction



Introduction

Pour maîtriser l'association de souches pures, il est nécessaire de mieux connaître les interactions de ces souches entre elles. Ces interactions peuvent être positives ou négatives. Ces dernières représentent des phénomènes d'inhibition et peuvent avoir pour origine la production de composés toxiques, la compétition vis à vis du substrat ou le rejet de catabolite [51].

Il est aujourd'hui admis que chez les bactéries lactiques, de nombreux phénomènes sont, pour partie responsable des antagonismes observés. D'une part, les acides organiques peuvent exercer une action inhibitrice spécifique, d'autre part la production de nombreux autres agents inhibiteurs, peroxyde d'hydrogène, diacetyl, CO₂ et bactériocine [12].

Dés lors, une recherche considérable a été effectuée dans le domaine de ce qui est venu pour être connu en tant que « probiotique », ce terme définit des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité adéquate ont des effets bénéfiques sur l'organisme hôte en améliorant les propriétés de sa flore intestinale. Les bienfaits santé des probiotiques ont été largement étudiés, ils ont un effet sur le système immunitaire, des activités anticancéreuses, hypocholestérolémiantes,... Il s'agit le plus souvent de bactéries ou de levures présentes dans des aliments, notamment les produits laitiers fermentés [57].

En effet, les effets bénéfiques de ces probiotiques pour la santé ont été et sont toujours et de plus en plus étudiés chez diverses espèces animales.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude qui porte sur « Etude les interactions des souches lactiques entre elles et l'effet des probiotiques *L.plantarum* et *P.acidilactici* sur les paramètres plasmatiques et la glycémie du lapin local. »

Notre étude est devisée en deux parties, l'une bibliographique qui va faire les points de connaissance sur les bactéries lactiques, les probiotiques et les lipides plasmatiques. L'autre pratique pour répondre à la problématique de notre sujet.


PARTIE I

Synthèse bibliographique

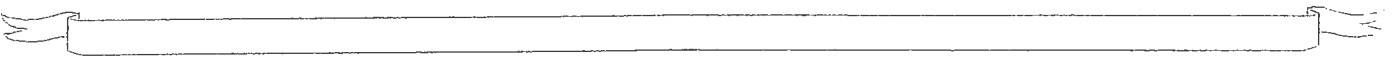
*Chapitre I : Les bactéries lactiques et
les probiotiques*

Chapitre II : Les bacteriocines

*Chapitre III : Données sur les lipides
plasmatiques et la
glycémie*



CHAPITRE I
LES BACTERIES
LACTIQUES ET LES
PROBIOTIQUES



CHAPITRE I : LES BACTERIES LACTIQUES ET LES PROBIOTIQUES.**I.1.LES BACTERIES LACTIQUES :**

De très nombreux produits alimentaires subissent une fermentation lactique avant leur consommation, ce qui leur assure des caractéristiques bien particulières d'arôme et de texture, mais aussi une bonne sécurité alimentaire grâce aux acides organiques produits des bactéries sous la même appellation de « bactéries lactiques » [24,60].

I.1.1.Définition :

Le groupe de bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique a été défini par ORLA-JENSEN (1919) et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique, la fermentation est dite :homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents : acide acétique, éthanol, CO₂ ...selon le mode de fermentation obligatoire ou préférentiel, certaines bactéries homo fermentaires sont aussi capables de fermentation hétérolactique dans des conditions de croissance non optimales ou selon la nature de sucre utilisé [60].

I.1.2.Caractères généraux des bactéries lactiques :

Les principaux caractères des bactéries lactiques sont :

- Ce sont des bactéries à gram positifs, immobiles, asporulées, catalase et oxydase négatives, nitrate réductase négative, anaérobies ou aérotolérantes, uniquement capables de fermentation en aérobiose comme en anaérobiose [58].
- leur capacité de biosynthèse est faible, ce qui explique leur polyauxotrophie pour divers acides aminés, des bases nucléiques, des vitamines et des acides gras mais aussi leur métabolisme fermentaire: incapable de synthétiser le noyau. Hème des porphyrines, elle sont normalement dépourvue de cytochromes et en conséquence inaptes à toute respiration anaérobie ou anaérobie : ce sont des bactéries anaérobies facultatives : Micro aérophiles, uniquement capables de fermentation en aérobiose comme en anaérobiose [60].

I.1.3. Origine :

Les bactéries lactiques ont été isolées de nombreux milieux naturels : végétaux (Plantes et fruits), animaux et humains (cavités Buccale et vaginale, fèces, lait...) [22].

Les bactéries lactique se trouvent généralement associées à d'autres micro-organismes dans de nombreux produits d'origine animale et végétale fermentés, viandes fermentées, légumes et fruits fermentés [56].

I.1.4 Classification

I.1.4.1 Le genre *Lactobacillus* :

Il regroupe de nombreuses espèces dont l'hétérogénéité est illustrée par la variation du % G+C : 32 à 53%. La classification remaniée par Kandler et Weiss, les subdivise en trois groupes selon leur type fermentaire : [58]

Groupe I : il comprend les espèces homo fermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir de glucose. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plus part thermophiles (croissance à 45 °C). La plus part des espèces sont présentes dans le lait et produits laitiers.

Groupe II : il comprend des espèces hétéro fermentaires facultatives, c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétéro fermentaire dans certaines conditions comme une concentration en glucose limitante. Il est constitué d'une vingtaine d'espèce dont *L. casai*, *L. curvatus*, *L. sake*, *L. plantarum* majoritairement mésophile, ils sont isolés dans les fourrages, les produits laitiers et les produits carnés.

Groupe III : il est constitué des espèces hétéro fermentaires obligatoires, c'est à dire utilisant la voie des pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses, c'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes surtout mésophiles comme *L. brevis*, *L. kefir* et *L. sanfransisco*.

a) Etude de l'espèce *L. plantarum* :

Elle se présente sous la forme de cellules en forme de bâtonnet isolées ou réunies en chaîne courtes. Elle transforme les sucres et le mannitol formé au cours de la phase précédente et conduit à une acidité de 1,5 à 1,9 % [12].

Elle se trouve dans les produits laitiers, olives, levains de panification, poisson sous vide [20].

Chez *L.plantarum* un pyruvate oxydase provoque la libération de pyroxyde d'hydrogène à partir du glucose en anaérobiose [27].

L.platarum peut libérer de pyroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à partir du lactate dans un milieu ou le glucose est épuisé [27]. Le tableau 1 rassemble quelque caractéristique de cette espèce.

Tableau 01 : Les différentes caractéristiques de *L.plantarum*[73].

Espèce	Culture à 45 C°	Groupe sérologique	Isomère de l'acide Lactique produit	Fermentation						
				Lactose	Saccharose	Milibiose	Raffinose	Avabinose	Xylose	Rhamnose
Lb.platarum	-	D	DL	+	+	+	+	+	+	-

I.1.4.2. Le genre *Pediococcus* :

Les *Pediococcus* sont des coques homo fermentaires dont la particularité est le groupement en tétrades, qui les différencie des autres précédents. Il sont mésophile, et le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, par contre, certaines espèces se distinguent par leur capacité de se développer à des teneurs en sel très élevées. Ils sont présents dans la bière, le vin, les produits végétaux (ensilages) et les saumures (anchois sale)[58].

a) Etude de l'espèce *P.acidilactici*

La *P.acidilactici* est formée de cellules groupées en paire ou en tétrades. Elle Fermente les sucres en produisant de l'acide lactique. Elle a une exigence nutritionnelle et une faible activité protéolytique, avec aussi une faible utilisation de lactose cette espèce se différencie par sa tolérance à la T°, au pH et au NaCl par son spectre fermentaire [12].

Des caractéristiques de cette espèce sont données dans le tableau suivant :

Tableau 2 : caractéristiques distinctives de *P. acidilactici*[12].

Caractéristique	Croissance à	Fermentation de :	lactose	Maltose	Melzirose	Ribose	Saccharose	Tréhalose	Dextrine	Amidon	ADH
	pH =4.5										
<i>P. acidilactici</i>	ND.	6.50%	±	-	-	+	-	±	-	-	+

(+) test positif, (-) test négatif, (±) variable

I.1.5. Les caractéristiques métaboliques des bactéries lactiques

I.1.5.1. La production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :

Les bactéries lactiques sont souvent appelées bactéries anaérobies facultatives, mais ce terme cache une grande variété de comportements de ces germes vis-à-vis de l'oxygène, certaines y sont très sensibles (*Bifidobacterium* spp.) d'autres beaucoup moins (*Lactobacillus plantarum*) [71].

En présence d'oxygène et sous l'action d'enzymes, de nombreuses bactéries lactiques produisent du H₂O₂, particulièrement :

- Les *Lactobacillus* : *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp *lactis*, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *L. sake*, *L. curvatus*.
- Les *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Streptococcus thermophilus* et des *Leuconostoc*.

Les principaux mécanismes de génération du H₂O₂ par les bactéries lactiques sont schématisés par la figure1. Le pyruvate est l'un des composants de la chaîne métabolique du lactose, le NAD (nicotinamide-adénine-dinucléotide) est le coenzyme de nombreuses déshydrogénases et un accepteur d'hydrogène

($\text{NAD}^+ + \text{XH}_2 \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{X}$) dans les réactions productrices d'énergie comme la glycolyse.

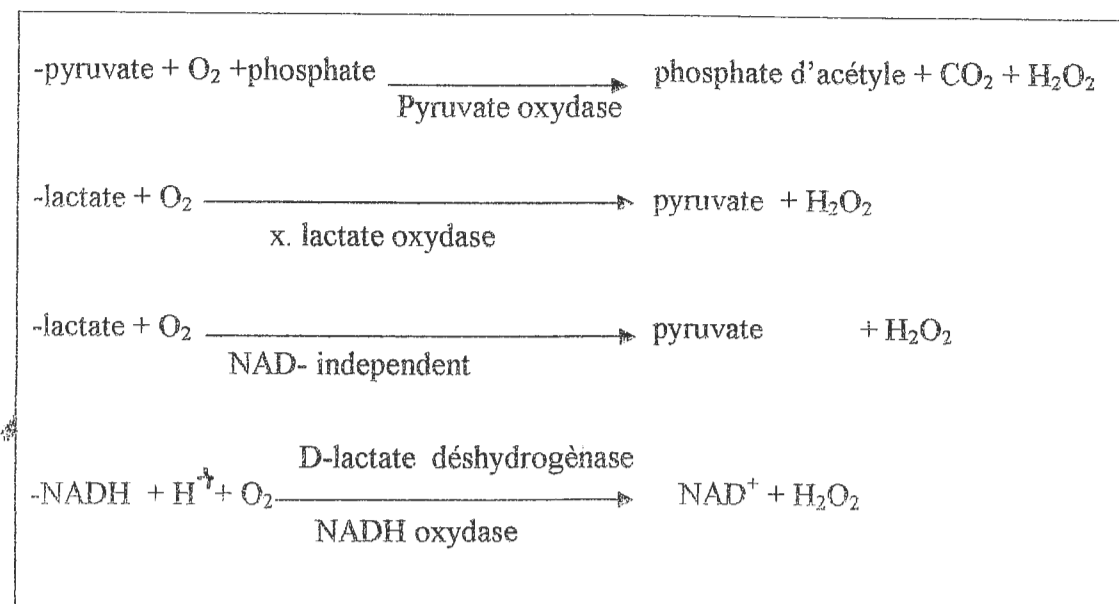


Figure 1 : principaux mécanismes de génération d' H₂O₂ par les bactéries lactiques (source : DAESCHEL, 1989) [21].

I.1.5.2. Effet des protéases (trypsine, α- chymotrypsine) :

La trypsine fait partie de la famille des protéase à sérine, ou toutes les enzymes ont des structure voisines et possèdent la même triade catalytique (exemple : chymotrypsine). Ces enzymes diffèrent par les amino-acides présents dans la poche de spécificité ce qui conditionne la nature des fonctions acyle hydrolysées. Dans la chymotrypsine, une sérine remplace l'aspartate 189 de la trypsine.

La chymotrypsine hydrolyse les liaisons peptidiques dont l'acyl est porté par des aminoacides hydrophobes (phe, tyr, trp) [65].

I.1.6. Importance et rôle des bactéries lactiques :

L'importance des bactéries lactiques est considérable pour plusieurs raisons :

- Production d'acide lactique et abaissement du pH.
- L'établissement de conditions physico-chimiques favorables à plusieurs transformations dans l'industrie laitière [2].

- Production de facteurs antimicrobiens tels que la «Diplococcine» produite par «*Lactococcus cremoris*», la «ni-sine» produite par *Lactococcus lactis* [69] et les autres bactériocines qui sont synthétisées par un très grand nombre de souches de bactéries lactiques [12].
- Production d'enzymes intervenant dans la dégradation des protéines notamment de la caséine [2].
- En présence d'oxygène, les bactéries lactiques peuvent produire du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est toxique pour différentes bactéries [26].

I.2. Les probiotiques.

‡ I.2.1. Données générales :

De nos jours, des préparations renfermant divers micro-organismes et contribuant au maintien de la bonne santé de l'individu (ou probiotique) font l'objet de recherches intensives [81]. Ces derniers contrôlent la flore intestinale en inhibant la croissance de nombreux pathogènes et bactéries indésirables, régulent le transit intestinal, améliorant l'intolérance au lactose, et les allergies aux protéines alimentaires. Les probiotiques possèdent aussi des propriétés anti-cancérigènes, anti-cholestérolémiques, antidiarrhéiques ainsi qu'une stimulation du système immunitaire [66, 74, 86].

Les bactéries lactiques comptent parmi les principaux probiotiques [81]. Depuis plusieurs années, les scientifiques ont montré que la consommation des produits fermentés par ces bactéries (yaourts, fromages) peut avoir un effet favorable sur la santé [63].

I.2.2. Définition : [47]

Le terme probiotique défini en 1974 par Parker dérive de deux mots grecs «pro» et «bios» et signifie littéralement en faveur de la vie par opposition au terme antibiotique signifiant contre la vie.

Les probiotiques sont des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additifs alimentaires et qui ont une action bénéfique sur l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale (FULLER [36])

- Modification des toxines ou de récepteurs toxiques.
- Stabilisation de la flore intestinale par compétition avec des bactéries pathogènes au niveau de la fixation aux récepteurs.

I.2.5. Classification des probiotiques:

Les probiotiques les plus traditionnellement utilisées sont les bactéries lactiques, les Bifidobactéries et légèrement les levures. [29]

I.2.5.1. Les bactéries lactiques : [22]

Les bactéries lactiques ont des propriétés fermentaires et antibactériennes qui associées à leur localisation digestive peuvent rendre compte de leurs actions digestives [91].

Les bactéries les plus traditionnellement utilisées comme probiotiques sont Les souches de genre *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* [57].

I.2.5.2. Les Bifidobactéries :

Dès la découverte des bifidobactéries par Tissier à l'institut Pasteur de Paris en 1900, elles suscitèrent l'intérêt des médecins nutritionnistes qui leur attribuèrent un rôle protecteur vis-à-vis des gastroentérites [60]. Ces bactéries sont des bâtonnets de morphologie variée, gram $^-$ non acido-alcool-résistante, non sporulées, immobiles, anaérobies, bien que quelques espèces tolèrent l' O_2 en présence de CO_2 [19].

Chez l'homme, les Bifidobactéries sont des commensaux de la bouche, de l'intestin et du vagin. Chez l'animal, ils sont surtout mis en évidence dans la flore intestinale [60].

Leur vocation et d'être incorporés comme probiotique, c'est-à-dire pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine, dans les produits laitiers fermentés [19].

I.2.5.3. Les levures :

Les levures et plus particulièrement *Saccharomyces cerevisiae* sont utilisées depuis des siècles par l'homme et représentent le groupe de microorganismes le plus exploité commercialement [57].

Les bactéries lactiques les plus fréquemment employées sont des Lactobacilles : *L. acidophilus*, *L. Casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, *S. thermophilus* et *Bifidobacterium bifidum* (FULLER [36]).

I.2.3. Caractéristiques des probiotiques :

Pour pouvoir être utilisés comme germes probiotiques dans les denrées alimentaires ; les microorganismes doivent répondre aux critères suivants : [28]

- Absence de nocivité (aucune réaction immunitaire de l'hôte contre le germe probiotique ; aucune réaction pathogène, toxique allergénique, mutagène ou cancérigène) [28].
- Avoir éventuellement la capacité d'adhérer aux cellules intestinales pour coloniser le tractus intestinal sans perturber la flore intestinale et posséder une capacité de croissance [60].
- Ils doivent améliorer les performances zootechniques des animaux [41]
- Produire des enzymes utiles ou d'autres substances utilisables par l'hôte [75].
- Résister à l'HCl de l'estomac et aux sels biliaires de l'intestin grêle de l'hôte [75].
- Contenir un nombre élevé de cellules viables et posséder une survie dans le tractus gastro-intestinal [32].
- Les interactions possibles entre bactéries lactiques et probiotiques devraient également être prises en compte pour sélectionner la meilleure combinaison de souche afin d'optimiser le procédé à la survie cellulaire dans les produits entreposés [41].

I.2.4. Mode d'action des probiotiques

Le mode d'action se résume en [55]:

- La production d'acide gras à courtes chaînes (par exemple butyrate).
- Augmentation de la solubilité des minéraux.
- Diminution de la résorption des acides biliaires.
- Stabilisation de la fonction barrière de la muqueuse intestinale.
- Production des substances anti-bactériennes.

Les levures sont également utilisées comme additifs alimentaires chez les animaux pour améliorer les performances zootechniques et comme régulatrices de la flore intestinale chez l'homme [57].

I.2.6. Rôle des probiotiques :

L'effet bénéfique dû à l'administration des probiotiques pourrait s'expliquer par plusieurs mécanismes : [47]

- Inhibition des bactéries indésirables : la production à partir des glucides de la ration alimentaire d'acides organiques tels que l'acide lactique ou l'acide acétique limite le développement des entérobactéries. Le peroxyde d'hydrogène produit par des lactobacilles, est inhibiteur, ce serait la raison du rôle inhibiteur de ces bactéries contre les salmonelles dans le jabot des volailles.
- Certaines souches probiotiques produisent des bactériocines capables d'inhiber les germes responsables d'infections dans les élevages.
- Certaines souches utilisées comme probiotiques possèdent la capacité de déconjuguer les sels biliaires : Les formes déconjugées ont un pouvoir inhibiteur plus important sur le développement des bactéries que les formes conjuguées.
- Les souches probiotiques pourraient aussi agir en inhibant l'implantation des germes pathogènes par compétition pour la colonisation : l'adhésion des bactéries probiotiques aux cellules intestinales permettrait une colonisation rapide et dirigée du tube digestif. Par exemple, chez le porc, l'adhésion de souches probiotiques de *Lactobacillus* aux villosités de l'intestin grêle inhiberait la fixation d'*E. coli* entéro-pathogène.
- Les probiotiques réduiraient l'absorption de substances toxiques (ammoniac, amine, indole...) et diminueraient les biotransformations des sels biliaires et des acides gras en produits toxiques.
- Les bactéries probiotiques produiraient également des métabolites susceptibles de neutraliser «in situ» certaines toxines bactériennes.
- Certaines bactéries probiotiques, notamment les lactobacilles, excrètent la galactosidase souvent déficiente dans le tractus digestif de l'hôte et facilitent donc la digestion du lactose (chez les poulets certaines souches de lactobacilles

augmentent la vitesse d'amylolyse). des bactéries probiotiques stimuleraient l'activité enzymatique des micro-organismes endogènes, permettant ainsi une meilleure assimilation des aliments. Elles stimuleraient également les activités lactase, ou invertase des cellules épithéliales du tractus digestif.

- les probiotiques stimuleraient l'activation des macrophages : l'administration orale ou intra péritonéale de souche de bactéries lactiques active les macrophages.
- Les micro-organismes probiotiques favoriseraient la production d'anticorps Notamment des Ig A secrétés dans la lumière intestinale. Les IgA inhibent l'adhésion des bactéries pathogènes à la surface des muqueuses en agglutinant les bactéries, en se fixant sur les adhésives et en interférant avec les interactions adhésives/récepteurs cellulaires.
- Certaines espèces sont utilisées à titre de probiotique car elles exercent un effet bénéfique sur la santé des animaux. L'industrialisation de l'élevage des animaux oblige à avoir recours à l'emploi d'additifs alimentaires pour augmenter la production tout en maintenant un bon état général de santé de ces animaux.

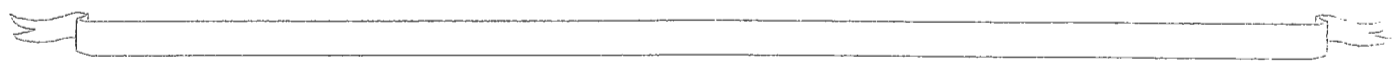
1.2.6.1. Influence des probiotiques sur la cholestérolémie :

Dans des travaux réalisés chez l'animal et chez l'homme ; on attribuait à certains probiotiques la capacité de diminuer le cholestérol plasmatique en inhibant la conversion de l'acétate en cholestérol [41].

L'équilibre de microflore et l'orientation de son activité métabolique, entraînant une meilleure préservation supérieure des nutriments et une moindre résorption de résidus toxiques et déjà mise à profit en alimentation, par la consommation régulière de yaourt qui abaissait notamment la cholestérolémie réduisant les risques des maladies cardiovasculaires [55].



Chapitre II
LES BACTÉRIOCINES



CHAPITRE II : LES BACTERIOCINES

II.1. Définition et bactéries productrices :

Le terme bactériocines a d'abord été utilisé pour les substances produites par des bactéries gram négatives. Les bactériocines des bactéries lactiques ne répondent pas à tous les critères définis dans ce cadre et peuvent plus simplement être définies comme des protéines ou complexes protéiques biologiquement actifs, inhibiteurs des bactéries Gram positives exclusivement et plus particulièrement de bactéries taxonomiquement proche de la souche productrice. Les souches productrices de bactériocines ont été mises en évidence, parmi les genres de bactéries lactiques : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et plus récemment *Leuconostoc* et *Carnobacterium* [12].

II.2. Caractères spécifiques aux bactériocines : [71]

Parmi les caractères spécifiques aux bactériocines, il y a :

- Avoir un spectre d'activité étendue, en étant active à la fois sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, car ces dernières doivent être éliminés des produits alimentaires non seulement *Listeria monocytogenes* ou certaines bactéries sporulés mais aussi les souches de *Escherichia. coli* pathogènes et les salmonelles.
- Avoir une action bactéricide et pas seulement bactériostatique. il s'agit, dans les produits alimentaires d'éliminer définitivement la contamination initiale, afin qu'aucun développement de bactéries nuisibles à ces germes réapparaissent.
- Présenter une bonne activité et une bonne stabilité dans les conditions technologiques régnant à tous les stades de la fabrication des produits, notamment dans toute la gamme de pH et des températures caractéristiques de ceux-ci :



- Ne pas perturber les cinétiques d'acidification des levains acidifiants, et ne pas inhiber les autres levains éventuellement utilisés notamment ceux conduisant à la production des arômes caractéristiques des produits

- Présenter une bonne innocuité pour les consommateurs, notamment ne pas entraîner des réactions d'allergie, même par les produits de leur dégradation, et ne pas perturber les équilibres de la flore intestinale.

II.3. Classification

La classification des bactériocines se résume ainsi :

II.3.1. Les Lantibiotiques : [12]

Le nom lantibiotique est donné à des petits peptides contenant des ponts soufrés intrachâînes. Ils sont synthétisés par plusieurs bactéries gram-positif (bactéries lactiques, *Staphylococcus*, *Bacillus*, ...). Leur structure met en œuvre des acides aminés inhabituels : déhydroalanine (Dha), déhydrobutyrine (Dhb), L'anthionine (Lan) qui entraînent la formation de cycles.

Dans le cas des bactéries lactiques, le plus connu des inhibiteurs de ce type est la nisine produite par environ un tiers des souches de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* et qui existe sous deux formes nisine A et nisine Z (Modlers et al.) [66]. Un autre lantibiotique non apparenté à la nisine est produit également par une souche de cette espèce.

La synthèse de ces inhibiteurs s'effectue par voie ribosomale, sous forme d'un pré peptide qui subit des modifications post traductionnelles. Les enzymes intervenant dans ces modifications sont encore peu connues [12].

Les lantibiotiques sont thermorésistants (30 minutes à 1 heure à 100°C) grâce à la stabilisation de leur structure par les cycles par contre, ils sont instables en milieu basique.

La sensibilité aux enzymes protéolytiques de ces composés est variable, elle est limitée à l' α -chymotrypsine dans le cas de la nisine, mais lacticine 481, lactocine S et carnocine U 149 sont sensibles également à d'autres protéases (Piard et al [72]). Le spectre d'action de lantibiotique est en général assez large [12].

II.3.2. Peptides de faible poids moléculaire (non lantibiotique) : [12]

La majorité des bactériocines de bactéries lactiques est constituée de peptides de faible poids moléculaire (<15 KDa), hydrophobes, ne contenant pas d'acide aminé inhabituel. Les bactéricines de cette deuxième classe sont également thermo résistantes et sensibles à diverses protéases.

Comme les Lantibiotiques, ces bactériocines sont issues d'un précurseur synthétisé au niveau ribosomale. La rupture d'une séquence leader du côté N-terminale permet l'obtention du peptide actif. Ces bactériocines présentent des similitudes de séquence, de structure et (ou) de spectre d'action.

Toutes ces bactériocines agissent au niveau de la membrane cytoplasmique des bactéries sensibles. Le mécanisme général est la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible ce mécanisme est contrairement à celui de la nisine, « énergie indépendante » (Bruno *et* Montville [13]). Des différences, expliquant le spectre d'action plus ou moins large de ces bactériocines, existent probablement en particulier au niveau de la nécessité et de la nature d'un récepteur sur lequel se fixe la bactériocine [72].

II.3.3. Peptides de haut poids moléculaire :

Ces peptides d'un poids moléculaire supérieur à 30 KDa se caractérisent par leur faible thermo résistance, ils sont en effet détruits par un chauffage de 10 à 15 min à 60°C, ils sont produits principalement par des souches de lactobacilles homofermentaires (avec une majorité de thermophiles). Ce sont des molécules complexes formant des agrégats d'un poids moléculaire supérieur à 300 KDa [72]. La majorité des peptides de faibles poids moléculaire ayant tendance à former des agrégats plus au moins aisés à dissocier, certains auteurs estiment qu'il peut être difficile de les classer avant purification complète [72].

Le spectre d'action de ce type de bactériocines est limité aux souches phylogénétiquement proches. A cause de leur caractère thermolabile, les changements de conformation et leur structure secondaire pourraient être importants pour leur activité (Klaenhammer [54]).

II.3.4. Complexes lipo-ou glyco-protéiques :

Certaines bactériocines de bactéries lactiques sont inactivées à la fois par les protéases et par d'autres types d'enzymes : Lipases, phospho-lipases, amylases, ce qui suppose l'existence d'une partie non protéique active dans les phénomènes d'inhibition [12].

Des souches de *Lactobacillus* et de *Leuconostoc* produisent des bactériocines de ce type. C'est probablement le cas également pour des souches de *Lactococcus* mais celles-ci ont été peu étudiées.

II.4. Spectre et mode d'action des bactériocines:

Toutes les bactériocines agissent au niveau de la membrane cytoplasmique des bactéries sensibles. Les pédiocines PA.1 et Ach, la lactococcine F et les lactococcines A et B ont été plus particulièrement étudiées. Le mécanisme général est la formation des pores (ou des canaux) dans la membrane de la bactérie cible. Ce mécanisme est contrairement à celui de la nisine, «énergie-indépendant» (Bruno et Montville [13]).

II.5. Aspects génétiques :

Lorsque sa localisation a pu être précisée, le gène codant pour la production de ces bactériocines est porté par des plasmides de taille variables. En générale, les portions responsables de la production de l'immunité sont situées sur le même plasmide, à proximité l'une de l'autre. Certains fragments de ces plasmides ont été caractérisés plus en détail [12].

L'étude de la portion proche du gène de la pédiocine PA-1 a mise en évidence un cadre de lecture couvert correspondant à une protéine de 724 acides aminés de la famille des translocateurs membranaire ATP-dépendants qui pourrait être impliquée dans la sécrétion de la bactériocine .

II.6. Bactériocines produites par *L. plantarum* :

L'ensemble des bactériocines produites par l'espèce *L. plantarum* sont résumés dans le tableau 03 :

Tableau 03 : Les principales bactériocines de *L. plantarum* [5].

Organismes producteurs	Bactériocines	Spectre d'activité	Caractéristiques
<i>L. plantarum</i>	Plantaricine A	<i>L. plantarum</i> . <i>Leuconostoc</i> <i>Pediococcus</i> <i>Lc. lactis</i> <i>E. faecalis</i>	8KDa Stable 30mn à 100°C Active à pH 6,4
<i>L. plantarum</i>	Plantaricine S.T	<i>C. l. tyrobutyricum</i> <i>E. faecalis</i>	2.5 KDa
<i>L. plantarum</i>	Plantaricine C19	<i>Listeria</i> <i>B. coagulans</i> <i>Enterococcus</i> <i>Pc. pentosaceus</i> <i>St. aureus.</i>	3.5KDa Thermo stable Stable aux pH acide.
<i>L. plantarum</i>	Plantacine B	<i>Ln. mesenteroides</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Pc. damnosus</i>	Sensible aux Protéases, lipases et amylases
<i>L. plantarum</i>	Bactériocine.	<i>Leuconostoc</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Streptococcus</i>	Sensible aux protéases lipases et amylases Stable 30min à 100°C.

II.7. Bactériocines produites par les *Pediococcus* : [50]

Deux souches de *P. pentasaceus* produisant une protéine appelée pédiocine a inhibé la croissance d'autres pédiocoques et *L. plantarum* (Fleming [31] ; Klaenhammer [54]). Gonzel et Kunka, 1987, décrivent une bactériocine produite par *P. Acidilactici* Pac 1,0 capable d'inhiber *Listeria monocytogenes*. Autre pédiocines ont été isolées de plusieurs souches de *P. acidilactici* et de *P. pentasaceus* (Pucci et al [76]).

II.8. Application des Bactériocines :

II.8.1. Application de la nisine :

La Nisine est employée comme agent de conservation dans l'industrie alimentaire et

son emploi en tant qu' additif a été accepté par le comité d'experts FAO/WHO. Elle est utilisée pour la conservation de fromage fondu, de fromage à pâte cuite pressée et de lait stérilisé (Hurt [45]).

II.8.2. Possibilités d'utilisation dans les produits laitiers :

L'application de cette propriété de *L lactis* de produire de la nisine a d'abord été envisagée pour l'inhibition de *Clostridium tyrobutyricum* dans le fromage et divers travaux déjà anciens ont confirmé cette possibilité [12].

La nisine est également utilisée dans les fromages fondus. Somers et Taylor, 1987, ont montré que la nisine était efficace contre les toxines de *Clostridium botulinum*. La nisine est également utilisée pour la conservation des yaourts pour éviter la forte acidification les faibles pH améliorent l'efficacité de la nisine .

II.8.3. Possibilité d'utilisation de la nisine dans les produits carnés : [12]

Les études sont nombreuses sur l'utilisation de la nisine comme alternative aux nitrites dans les produits carnés pour inhiber la croissance de *Clostridium botulinum*; elles ont montré que la nisine avait une faible capacité à inhiber la production de toxine par ces germes.

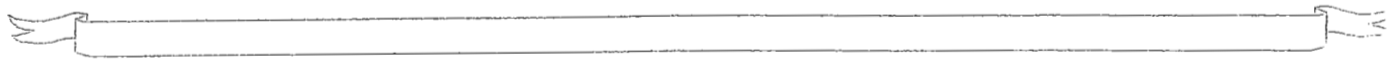
II.8.4. Possibilité d'utilisation dans le domaine thérapeutique : [51]

En 1990 Rekhif rapporte, que l'ambicine est un nouvel agent antibactérien, efficace contre un large spectre de bactéries Gram-positif et Gram-négatif, ainsi que contre des bactéries résistantes aux antibiotiques .

Utilisable en application locale, l'ambicine serait préconisée notamment lors d'affectations dermatologiques dans les cas d'infections à staphylocoques observées chez les brûlés ou encore dans les déodorants et les dentifrices. Les bactériocines ainsi proposées présentent deux intérêts majeurs : encore plus sélective que les antibiotiques dans leur action antibactériennes, elles sont du fait de leur structure protéiques dégradées et rendues inactives par l'acidité gastrique et les enzymes intestinales .



Chapitre III
DONNEES SUR LES
LIPIDES PLASMATIQUES
ET LA GLYCEMIE



CHAPITRE III : Données sur les lipides plasmatiques et la glycémie**III .1. Glycémie :****III.1.1.Définition et rôle :**

Le mot glycémie est du grec, glukos = sucre et haima=sang. Le glucose est un élément énergétique essentiel pour l'organisme [37] et son taux dans le sang détermine la glycémie [79]. Le taux normal de la glycémie doit demeurer fixe, grâce à un mécanisme glycorégulation assez complexe [37].

Ce mécanisme est assuré grâce à un liquide permanent entre les substance surtout hormonales qui diminue, la glycémie (insuline) et celles qui l'augmente, glucagon, adrénaline, hormone de croissance [67].

‡

Pour la grande majorité des animaux, les glucides constituent la principale source d'énergie fournissant non seulement l'énergie nécessaire au fonctionnement de l'organisme vivant, mais intervenant également dans la construction cellulaire [60].

III.2. Le cholestérol total**III.2.1. Définition et rôle du cholestérol :**

C'est un lipide complexe du groupe des stéroïdes, présent dans la plupart des graisses et des huiles animales (Anonyme [3]).

Le cholestérol est un solide blanc cristallin, insoluble dans l'eau et soluble dans les liquides organiques hydrocarbonés. La molécule du cholestérol existe dans les cellules ou les liquides biologiques sous forme libre ou sous forme combinée. Les fonctions physiologiques attachées à ces deux formes sont spécifiques (Abastado [1])

Le cholestérol est pour les animaux un nutriment fondamental. Il est indispensable à ces cellules ou chez les mammifères, il module leur fluidité, c'est ensuite un précurseur des acides biliaires et les sels biliaires, qui favorisent la digestion et l'absorption intestinale des lipides alimentaire (Pascal [70]).

Le cholestérol est aussi le précurseur d'hormones stéroïdes comme la progestérone, testostérone et le cortisol (Hames et al [42]).

III.2.2. Source du cholestérol :

Le cholestérol de l'organisme a une double origine ; exogène par l'apport alimentaire et endogène par biosynthèse, l'apport alimentaire étant généralement faible, moins de 1g/jour, l'activité de la biosynthèse est déterminante (Pascal [70]).

D'après Frement [35], le cholestérol absorbé par les athérocytes représente moins de 50% du cholestérol corporel.

III.3. Triglycéridémie**III.3.1. Définition et rôle :**

C'est le taux de triglycérides dans le sérum [67]. Les triglycérides sont des lipides simples, c'est la forme de réserve la plus abondante chez les animaux [61].

Les T.G représentent l'énergie de réserve principale et les lipides majeurs chez les humains, ils sont stockés dans les cellules adipeuses spécialisées [42].

Les TG ont deux origines, exogène synthétisés dans l'épithélium de l'intestin grêle à partir des corps gras alimentaires digérés et endogène hépatocytaire [23].

III.4. Les lipoprotéines de faible densité (LDL)**III.4.1. Définition :**

Les lipoprotéines de faible densité (LDL) souvent appelés «mauvais cholestérol» sont formées principalement par la décomposition des VLDL. Les LDL transportent le cholestérol dans le sang et le déposent dans les tissus de l'organisme et sur les parois de vaisseaux sanguins une condition connue athérosclérose [11].

III.4.2. Origine et biosynthèse de LDL :

Les LDL constituent une classe majeure de LP. Leur origine est essentiellement la dégradation des VLDL. Ces derniers perdent des molécules superficielles telles que les phospholipides et les APOC et E. Il ne résulte que les LDL et ne conservent que le cœur composé essentiellement d'esters de cholestérol entouré d'APO B100 et de phospholipides associés à du cholestérol (Clavy et al [17]).

III.4.3. Rôle des LDL :

Le rôle principal des LDL est de délivrer le cholestérol à toutes les cellules qui l'utilisent pour la synthèse des membranes cellulaires ou d'hormones. Environ 70 %

des LDL plasmatiques sont épuré par le foie (Benlian [7]). Elle joue un rôle important dans le transport des autres lipides.

III.5. Les lipoprotéines de haute densité (HDL)

III.5.1. Définition :

Les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont souvent appelés « bon cholestérol » les HDL enlèvent l'excès de cholestérol des tissus et des parois vasculaires et le transportent au foie. La quantité des HDL dans le sang est inversement liée aux risques de maladie cardiovasculaire [10].

III.5.2. Origine et biosynthèse des HDL :

Les HDL sont synthétisées sous forme de HDL natives, de forme discoïde, par le foie, l'intestin (produisent les apolipoprotéines AI et AII) et dans la circulation à partir de la lipolyse des particules riches en TG (CM et VLDL) (Turpin et *al*, [88]).

III.5.3. Le rôle des HDL :

Elles transportent environ 25% de cholestérol plasmatique, jouent un rôle de navette entre les tissus périphérique, le foie et entre les autres lipoprotéines et elles sont impliquées dans le transport inverse du cholestérol excédentaire des tissus vers le foie [10].

III.6. Normes des paramètres plasmatiques chez le lapin

Chez le lapin, les paramètres biochimiques sanguins rapportés par Jones [48] sont les suivants :

- Cholestérol 10 à 80 mg / dl
- Glucose 75 à 140 mg / dl
- Triglycérides 1.4 à 1.76 mmol / l
- Lipides du sérum 150 à 400 mg / dl

PARTIE II

Matériels et méthodes

II. Matériel et méthodes :

Notre étude s'inscrit dans le cadre d'une caractérisation des bactériocines produites par quelques bactéries lactiques locales et l'effet de deux probiotiques *L. plantarum* et *P. acidilactici* sur les paramètres plasmatiques et la glycémie du lapin local.

Les paramètres à évaluer sont les suivants :

- La glycémie.
- La cholestérolémie.
- La triglycéridémie.
- La HDL.émie.
- La LDL.émie.

II.1. Matériel :

II.1.1. souches bactériennes :

Pour la réalisation de notre étude, on a utilisé 27 espèces de bactéries lactiques, 26 ont été isolées à partir de six niches écologiques à savoir, le beurre, le raib, l'ensilage, le tube digestif du lapin, le tube digestif du poussin et les selles de bébé, l'identification de cette collection a été réalisée par des tests physiologiques et biochimiques complétée par une identification par un logiciel au niveau de laboratoire de biologie moléculaire et génétique (Oran).

La seule espèce figurant parmi notre collection est *Pediococcus acidilactici* (Bactocell), c'est un probiotique commercialisé par la firme française LALLEMAND

Les espèces utilisées sont résumées dans le tableau [5]

II.1.2. lapin :

L'essai a été conduit sur 15 lapereaux de populations locales, des deux sexes, issues de lapines différentes réparties en 03 lots, chaque lot est composé de 05 lapereaux.

II.1.3. Le lait :

Pour la préparation des laits fermentés, on a utilisé un lait écrémé fourni par la laiterie IGILAIT.

II.1.4. Le régime alimentaire :

Au cours de cette étude, on a utilisé un aliment granulé, les dimensions de ce dernier sont 4mm sur 10mm. La composition de l'aliment est la suivante :

- Tourteau de soja
- Mais
- Grignon d'olive
- Son de blé dur

- C.MV
- Sel
- Carbonate de calcium
- Mélasse.

II.1.5. Les milieux de culture :

Pour réaliser notre travail, on a utilisé les milieux suivants :

- Gélose et bouillon MRS (MAN ROGOSA et SHARPE) : pour la culture des *Lactobacilles* et le *Pédiocoque*
- Gélose et bouillon M₁₇ : pour la culture des streptocoques lactiques.

II.1.6. Les enzymes, réactifs et autres produits:

Les enzymes utilisées sont :

Au niveau de laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences:

- Catalase.
- Trypsine.
- α .Chymotrypsine.

Au niveau du laboratoire de l'hôpital de Jijel :

- Triglycéride enzymatique R₁.
- Réactif cholestérol SL.
- Réactif HDL cholestérol (réactif précis pétant).
- Solution du glucose PAP.
- Papier filtre.
- Coloration de gram :
 - Violet de gentiane.
 - Lugol.
 - Alcool.
 - Fushine.
- Détermination de l'acidité :
 - Phénophtaléine 1%
 - La soude dornic (N/9).
- Ajustement de pH :
 - HCl 1 N.
 - NaOH 5N.
 - NaOH 0.1 N.

Tableau 4 : Les différentes souches lactiques testées Utilisées.

Espèces	Observations
1- <i>Lb. plantarum</i> B ₂	B : Beurre
2- <i>Lb. plantarum</i> BJ0041	BJ : Beurre Jijelien
3- <i>Lb. plantarum</i> BJ0031	R : Raib
4- <i>Lb. curvatus</i> R ₂	P : Poussin
5- <i>Lb. brevis</i> P ₂₁	S : selle de bébé
6- <i>Lb. casei</i> ssp <i>tolerance</i> S ₄	E : Ensilage
7- <i>Lb. delbrueskii</i> .ssp. <i>bulgaricus</i> B ₈	L : Lapin
8-- <i>Lb. delbrueskii</i> ssp <i>delbrueskii</i> R ₁₁	
9- <i>Lb. casei</i> ssp <i>casei</i> S ₂	
10- <i>Lb. viridescences</i> E ₁₇	
11- <i>Lc. lactis</i> ssp <i>lactis</i> E ₀₈	
12- <i>Lc. lactis</i> ssp <i>lactis</i> B ₁	
13- <i>Lc. lactis</i> ssp <i>lactis</i> B ₅	
14- <i>Lc. lactis</i> ssp <i>cremoris</i> B ₉	
15- <i>Lc. lactis</i> ssp <i>cremoris</i> L ₅	
16- <i>Lc. lactis</i> ssp <i>cremoris</i> E ₇	
17- <i>Lc. lactis</i> ssp <i>cremois</i> B ₁₂	
18- <i>Lc. lactis</i> ssp <i>cremois</i> B ₁₃	
19- <i>Lc. lactis</i> ssp <i>cremois</i> E ₁₇	
20- <i>Lc. raffinolactis</i> E ₁₈	
21- <i>Lc. lactis</i> ssp <i>diacetylactis</i> R ₇	
22- <i>Streptococcus. thermophilus</i> B ₄	
23- <i>Streptococcus. thermophilus</i> E ₆	
24- <i>Streptococcus thermophilus</i> E ₃	
25- <i>St. thermophilus</i> E ₁	
26- <i>St. thermophilus</i> B ₃	
27- <i>Pediococcus acidilactici</i>	

II.1.7. Appareillage de laboratoire :

La partie pratique nécessite l'appareillage suivant :

- Spectrophotomètre.
- Centrifugeuse.
- Bain marie.
- Plaque chauffante.
- Bec bunsène.
- Micropipettes (1000µl, 500µl, 50µl, 10µl).
- Pipettes (5ml, 1ml).

- Pipettes pasteur.
- Etuve (37°C).
- Autoclave.
- Four pasteur.

II-1-8 : Matériel de l'élevage :

Nous avons utilisé :

- Des cages pour l'élevage, chaque cage porte les dimensions suivantes : 100 × 84 cm.
- Des abreuvoirs et mangeoires.

II.2. Méthodes :

II.2.1. Revivification des bactéries lactiques :

La revivification des bactéries lactiques utilisées au cours de cette étude consiste à un repiquage des *lactobacilles* et *pediocoque* sur le bouillon MRS, et des *Streptocoques* et *lactocoques* sur le bouillon M17. Après incubation à 37°C pendant 24 h, on réalise un ensemencement par stries sur les milieux gélosés MRS et M17. Chaque souche pure est soumise à une coloration de Gram.

II.2.2. Caractérisation de substance antibactérienne de *L.plantarum* et

P.acidilactici :

II.2.2.1. Interaction bactérienne :

La première étape de cette partie expérimentale consiste à sélectionner quelques souches lactiques sensibles (souches indicatrices) à l'activité de *L.plantarum* et *P.acidilactici*. Pour cela, cinq espèces à savoir *Streptococcus thermophilus E₃*, *Lc. lactis ssp lactis E₀₈*, *Lc. lactis ssp cremoris B₉*, *S. thermophilus B₄* et *Lc. lactis ssp cremoris L₅* ont été mise en contact avec les deux bactéries probiotiques, en utilisant la technique de (Fleming [31]) dont les étapes sont les suivants :

- La gélose MRS est coulée dans des boîtes de Pétri stériles et laissée prendre en masse.
- 50 µl du bouillon MRS contenant approximativement 10⁹ UFC / ml (Do = 7.050 pour *L.plantarum* et Do = 7.600 pour *P.acidilactici* à 660nm) de la bactérie lactique sont étalés et laissés sécher. Incuber à 37°C pendant 3 Heurs .

- Chaque disque de papier Whatman stérile (de 05 mm de diamètre) est imbibé par 20 µl d'une souche lactique indicatrice, et déposé sur la gélose déjàensemencée ;
- Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24h ;
- On mesure les diamètres des zones d'inhibitions .

Dans une deuxième étape, on a cherché à sélectionner d'autres bactéries lactiques bactériocinogènes, en soumettant la collection composée de 25 espèces au contact direct avec deux souches indicatrices *Lc. lactis ssp cremoris* B₉ et *S. thermophilus* B₄. La technique utilisée est celle de Fleming [31] décrite au dessus.

II. 2.2.2. Effet des surnageants sur les souches indicatrices :

a. Récupération du surnageant natif:

Des cultures jeunes âgées de 18 h de *L.plantarum* et *P.acidilactici* ont été préparées par ensemencement du bouillon MRS et M17 par des culture âgées de 24h (V/ 9V).

Par la suite, les cellules bactériennes étaient éliminées par centrifugation à froid (+ 4°C) à 4700 tr/minutes pendant 27 minutes. Le surnageant récupéré était filtré sur une membrane de porosité 0.22 µm (*Millipore Minis art. SM 16584. Sartorius*). Le filtrat stérile ainsi obtenu constituait l'extrait de culture natif (Tagg et al [85]).

b. Technique :

La méthode de diffusion par disque a été utilisée (Tagg et al [85]) Des disques stériles de 5 mm de diamètre imbibés de surnageant sont placés sur les géloses MRS et M₁₇ensemencées par les 6 souches indicatrices déjà sélectionnées, les boîtes de Pétri étaient incubées 16 à 18 heures à 37°C.

L'effet du surnageant est apprécié par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions.

Pour tester l'effet des surnageants pH7, le pH d'un volume du surnageant natif récupéré était ajusté à pH7 avec la soude 3M, puis filtrer sur un papier filtre de porosité 0.22 µm (*Millipore Minis art. SM. 165 84. Sartorius*). Le filtrat stérile obtenu constituait l'extrait de culture neutre.

L'effet du surnageant pH 7 sur les bactéries lactiques indicatrices a été réalisé par la même technique décrite par Tagg et al [85].

II.2.2.3. Effet du traitement thermique et du froid sur l'activité des surnageants.

(Tagg et al [85]) :

La nature physico-chimique de l'agent inhibiteur était recherchée dans l'extrait de culture bactérienne en testant l'effet du froid et de la chaleur. Les surnageants natifs et à pH7 des deux cultures bactériennes ont été traités comme suite :

a. Par la chaleur :

- A l'autoclave 121°C pendant 15 minutes.
- Au bain-Marie 100 °C pendant 60 minutes.
- Au bain-Marie 100 °C pendant 30 minutes.

b. Par le froid :

- - Congélation a -20 °C pendant 48 heures.

Après ces traitements physiques, chaque surnageant est testé en appliquant la technique de diffusion par disque.

II.2.2.4. Effet de la digestion enzymatique sur l'activité des surnageants :**a. Catalase : Elimination de l'effet du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂):**

A ce stade, pour éliminé l'activité inhibitrice due à l'action de peroxyde d'hydrogène, on

Ajoute à chaque surnageant de la catalase (1mg/ml de surnageant) Gieset al [38]:

- A 1 ml de la fraction active (surnageant des deux souches *L.plantarum* et *P. acidilactici*) était ajoutée 1ml de la solution enzymatique à la concentration de 1mg/ml, le mélange est incubé 1 heure à 37 °C.
- On implique la méthode de diffusion sur disque en utilisant les 06 souches indicatrices.
- On mesure les diamètres des zones d'inhibitions s'ils existent.

b. Action des protéases (trypsine, α- chymotrypsine) (Tagg et al [85]) :

Pour étudier l'action des protéases, les surnageants (2ml) de *L. plantarum* et *P.acidilactici* sont traités par la trypsine (Merck, art 24579) et l'α - chymotrypsine (Merck, art 2307) à une concentration finale de 1 mg/ml,

l'incubation est faite à 37 °C pendant 1 heure. Puis l'activité antibactérienne a été détectée par la méthode de diffusion sur disque comme décrit précédemment.

II.2.2.5. Recherche de phage dans les surnageants de culture:

Les phages étaient recherchés en ajoutant un volume de 0,2 ml de surnageant de culture à 0,1 ml de CaCl_2 0,1M et 0,3 ml de la culture bactérienne indicatrice. Ce mélange était additionné à 7 ml de milieu MRS (M17) solide puis coulé en boîtes de pétri. Après solidification du milieu à température ambiante, les boîtes sont incubées pendant 18 heures à 37 °C.

La présence de plages de lyse indique la présence de phages (Terzaghi et Sandine, [87]).

II.2.2.6. Détermination du mode d'action de la substance inhibitrice :

Le mode d'action de l'agent antibactérien était déterminé en prélevant des fragments de gélose au niveau des zones d'inhibitions (l'endroit où on n'observe aucune croissance bactérienne). Ces fragments étaient broyés dans 0,5 ml de bouillon MRS puis filtrée (Millipore Minis art SM 16584. sartorius).

Le filtrat est ensemencé en stries à la surface d'un milieu solide MRS ou M17 puis incubé à 37 °C pendant 18 heures.

S'il y a une croissance, la substance est bactériostatique, dans le cas inverse, elle est bactéricide (Retter et al [78], Barefoot [4]).

II.2.2.7. Purification partielle de la substance inhibitrice :

L'isolement de la substance inhibitrice de leur milieu de culture est reliée à la méthode du précipitation par le Sulfate d'ammonium [18], et la relation pH adsorption/désorption (Yang et al [92]).

II.2.3. Effet de *L.plantarum* et *P. acidilactici* sur les lipides plasmatique et la glycémie chez le lapin :

II.2.3.1. préparation des animaux et des probiotiques :

L'étude a été conduite sur 15 lapins de population locale, pesant entre 400g et 1400g. Les animaux sont stabilisés dans des cages, dans une animalerie bien aérée.

Les animaux sont répartis en 3 lots chaque lot contient des lapins de sexe différent. L'aliment est distribué deux fois par jours à 10 heure du matin et à 14 heure de l'après midi. Le nettoyage est assuré tous les jours au matin, l'hygiène est obligatoire, la désinfection des cages est réalisée par l'eau de javel.



Figure [3]: Préparation des animaux.

Les probiotiques ont été préparés sous forme de lait fermenté : après reconstitution du lait et stérilisation, on ensemence chaque échantillon avec la souche correspondante, on incube à 37°C pendant 4h.

La figure ci-dessous, illustre la technique de préparation des probiotiques .

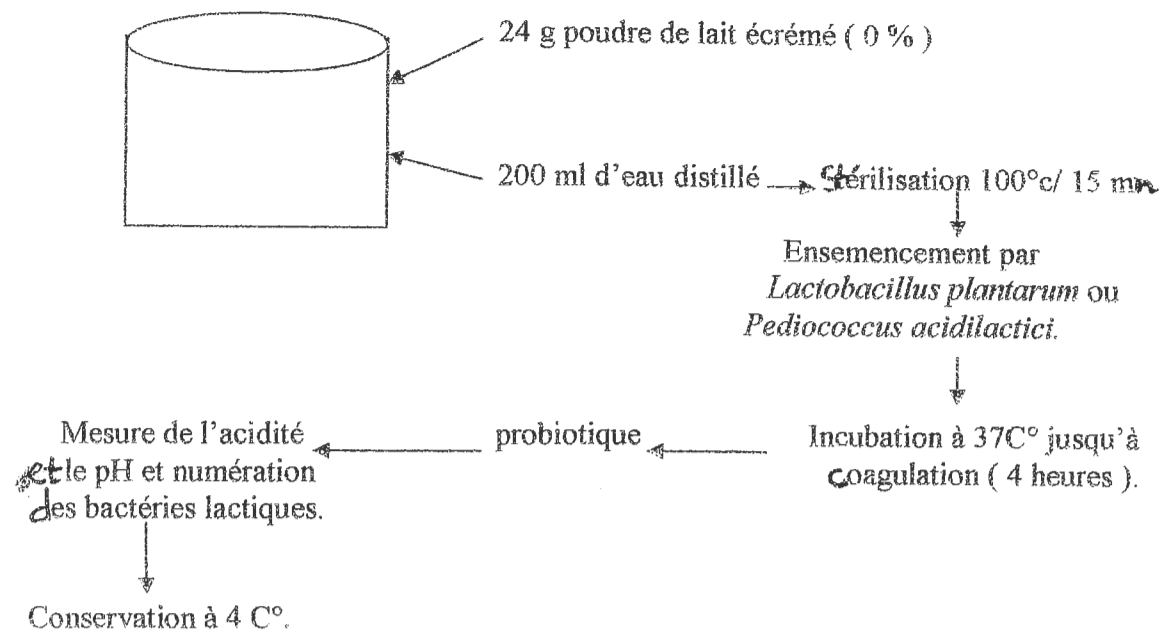


Figure [4]: Préparation du probiotique *L plantarum* et *P acidilactici*.

a. Dosage acide lactique/ estimation du pH :

Une prise d'essai de 10 cm³ de lait fermenté est neutralisée par une solution d'hydroxyde de sodium de normalité N/9 en présence de phénol-phtaléine [16]

Le volume d'hydroxyde de sodium utilisé permet d'estimer l'acidité selon la formule :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \cdot 10$$

V : volume de NaOH utilisé.

Pour la mesure du pH, on plonge l'électrode du pH mètre dans le volume du lait prélevé et on lit la valeur enregistrée sur écran.

b. Numération des bactéries lactiques :

A partir de chaque lait fermenté, on réalise des dilutions décimales jusqu'à 10⁻⁸. Un ml de la dernière dilution est étalé sur la gélose MRS.

Après une incubation à 37°C pendant 24h, on fait la numération de la flore lactique.

d. Administration de probiotique :

L'administration de probiotiques *L. plantarum* et *P. acidilactici* aux lapins est effectuée par voie orale à raison de 2. 10 ml / tête/ jour à 10h et 14h. La figure ci après illustre la voie d'administration.

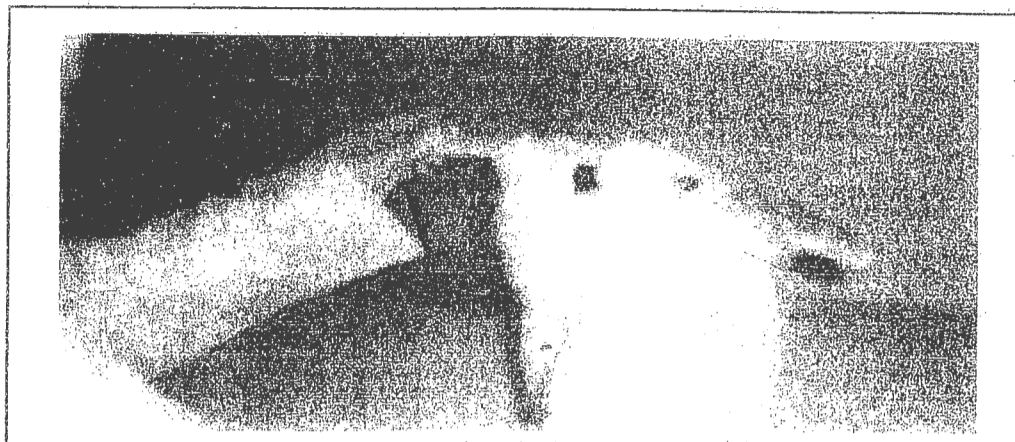


Figure [5]: Voie d'administration de probiotique .

II.2.3.2. Dosages des lipides plasmatiques et glycémie.

Ces paramètres ont été évalués après abattage des lapereaux.

II.2.3.2.1. Dosage du glucose [80] :

Ce dosage a été fait par méthode enzymatique colorimétrique. Les réactifs utilisés sont mentionnés dans le tableau suivant.

Tableau 5: Réactif utilisé pour le dosage du glucose.

Réactif 1 :	Phosphate pH7, 40	100 m mol / l
Solution tampon	Phénol	01 m mol / l
Réactif 2 :	Glucose oxydase	$\geq 10000 \mu / l$
Enzyme	Peroxydase	$\geq 600 \mu / l$
	Amino -4- antipyrine	270 μ mol / l
Réactif 3 :	Standard glucose	100 mg / dl
Étalon		1g / l
		5,56 m mol / l

Pour préparer la solution de travail, il faut dissoudre le contenu d'un flacon de Réactif 2 dans un flacon de la solution tampon et la protéger de la lumière.

Pour le dosage il faut se mettre aux conditions suivantes :

- Longueur d'onde : 505nm.
- Température : 37°C.
- Cuve : 1cm d'épaisseur.

On ajuste le zéro du spectrophotomètre avec le blanc réactif

Tableau 6 : Mode opératoire pour le dosage du glucose.

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	-	10 µl	-
Echantillon	-	-	10 µl
Réactif de Travail	1ml	1ml	1ml

On a mélangé le tout, la lecture de la densité optique est faite après une incubation de 10mn à 37 °C ou 30mn à 20-25 °C. Le calcul est donné par la formule suivante :

$$\text{Glucose} = \frac{\text{D.O echantillon}}{\text{D.O standard}} \cdot n / n = 1\text{g} / 1$$

II.2.3.2.2. Dosage du cholestérol [2] :

Le cholestérol total est dosé par une méthode colorimétrique enzymatique. Le cholestérol présent dans l'échantillon est donné selon la réaction couplée décrite ci-dessous, le complexe coloré ainsi formé est quantifiable par spectrophotométrie.

Cholestérol estérase



Cholestérol oxydase



Peroxydase



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans le dosage. [64,68].

Tableau 7 : Réactifs utilisés pour le dosage du cholestérol.

Réactif 1 : Solution tampon	Pipes pH=6,9 phénol	90 m mol/l 26 m mol/l
Réactif 2 : enzymes	Cholestérol estérase (CHE) Cholestérol oxydase (CHOD) Peroxydase (POD) -4-aminophenazone (4-AP)	300 µ /l 300 µ /l 1250 µ /l 0.4 m mol/l
Réactif 3 : Etalon	Cholestérol	200 mg/dl 2 g/l 517 m mol/l

La solution de travail est obtenue en mélangeant les deux réactifs 1 et 2 par retournement successif.

Mode opératoire :

On a mélangé le tout et incubé à 37 °C pendant 5 au 10 mn, la densité optique est faite après l'incubation. La couleur est stable durant les 60 mn.

Tableau 8 : Mode opératoire pour le dosage du cholestérol.

	Blanc	Étalon	Dosage
Réactif de travail	1 ml	1 ml	1 ml
Eau distillée	10 µ l	-	10 µ l
Étalon 2	-	10 µ l	-
Echantillon	-	-	10 µ l

Le calcul se fait par la relation suivante :

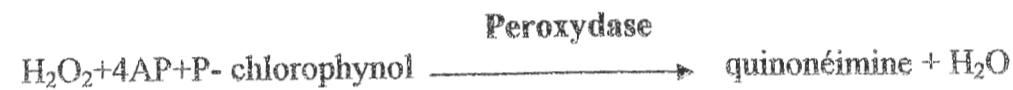
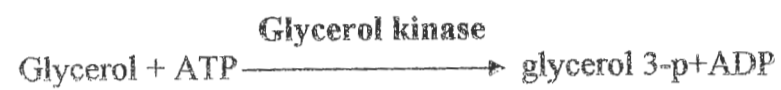
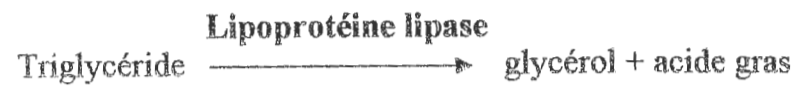
$$\frac{(A)_{dosage}}{(A)_{etalon}} \cdot 200 = \text{mg/dl Cholestérol de dosage}$$

Le facteur de conversion = mg/dl : 0.0258 = m mol/l

II.2.3.2.3. Dosage du triglycéride :

Principe : le triglycéride dosé et incubé avec lipoprotéine lipase, libère le glycérol et des acides gras libres, le glycérol est converti au glycérol 3- phosphate (G3p) et adenosine-5- diphosphate (DAP) par le glycérol kinase et ATP.

Le Glycérol 3- phosphate (G3p) est ensuite converti glycérol phosphate dehydrogénase (Gpo) au dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) réactif avec 4 – aminophenazone (4 – AP) et p-chlorphenal en présence de peroxydase (POD) selon les réactions :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de triglycéride de dosage [14, 33,52].

Tableau 11: Composition des réactifs utilisés pour le dosage du HDL-C. (Réf : 61531)

Réactif 1 :	Acide	40 g / l
Réactif précipitant	phosphotungstique Mg ₁₂ H ₁₂ O ₁₂ P ^H 6.0	100 g / l
Réactif 2 :	Cholestérol libre +	1.30 m mol / l
Calibration HDL.cholestérol	estérifié	Ou 0.1g / l
Réactif 3 :		1 m mol / l
Calibration HDL Phospholipide	choline	Correspondant à 0.774 g / l Phospholipides.

Mode opératoire de la précipitation de HDL :

Dans les tubes secs, on distribue 250ml de sérum et on ajoute 25ml de réactif 1, on mélange et on attend 10mn. Après avoir centrifugé pendant 15mn à 3000-5000 tours /mn, on obtient un précipitant dont on récupère le surnageant afin de doser le HDL - C.

Solution de travail :

La préparation de cette solution ainsi que sa composition sont décrites dans la technique de dosage de cholestérol.

Mode opératoire :

Dans des tubes secs on distribue successivement les réactifs selon les conditions opératoires du tableau ci-dessous. Mélanger, incubé pendant 10 minutes à 20 – 25 °C ou 5 mn à 37 °C.

Mesurer l'absence de l'échantillon et l'étalon contre le blanc réactif dans les 60 mn qui suivent :

Calcul :

$$\text{HDL-C} = \frac{D_{\text{dosage}}}{D_{\text{etalon}}} \cdot n. \quad \text{M mol / l : } n = 1.42 \quad \text{g / l : } n = 0.55$$

Tableau 12: Réactifs du travail pour le dosage du HDL-C.

	Blanc réactif	étalon	dosage
-Eau distillée	250 μ l	-	-
-Réactif de calibration HDL-C)	-	250 μ l	-
-surnageant	1 ml	1 ml	250 μ l
-solution du travail cholestérol Enzymatique.			1 ml

II.2.3.2.5. Dosage du LDL - cholestérol :

Les lipoprotéines de basse densité (LDL) sont précipitées par l'héparine à leur point isoélectrique (pHi 5,04). Après la centrifugation, les lipoprotéines de haute densité (HDL) et de très basse densité (VLDL) se retrouvent dans le surnageant. Elles peuvent être déterminées par méthodes enzymatiques.

$$\text{LDL - Cholestérol} = \text{Cholestérol total} - \text{Cholestérol dans le surnageant.}$$

Echantillon : Sérum.

Tableau 13: Réactif utilisés pour le dosage du LDL-C.

Contenu solutions	concentrations initiales des
1- Réactif précipitant :	
Héparine citrate	50 000 μ / l
De sodium	0.064 mol / l, P ^H
5.04	

Préparation des solutions :

1- Réactif précipitant :

Contenu prêt à emploi. Stable jusqu'à la date de péremption conservé + 2 + 8°C.

2- Réactif pour la détermination du cholestérol :

CF fiche technique des coffrets CH 200 ou CH 201.

Protocoles :

Longueur d'onde :	500 nm, Hg 546 nm.
Cuve :	1 cm de trajet optique.
Température :	20 à 25 °C, 37 °C.
Mesure :	Contre le blanc réactif.

Pipeter dans le tube à centrifugation : 100 μ l de Sérum et 1000 μ l de Réactif de précipitation

Mélanger, laisser reposer pendant 10 min à +15, +25 °C et centrifuger pendant 15 minutes à environ 4000 trs /mn.

Déterminer la concentration en cholestérol dans le surnageant dans l'heure qui suit la centrifugation.

* Pipeter dans les tubes à essai :

Tableau 14 : Mode opératoire pour le dosage du LDL-C.

	Blanc réactif	Etalon	Echantillon
Eau distillée	50 μ l	-	-
Etalon	-	50 μ l	-
Surnageant	-	-	50 μ l
Réactif (2)	1000 μ l	1000 μ l	1000 μ l

Mélanger, incuber pendant 10 minutes entre + 20 et 25 °C ou pendant 5 minutes à 37 °C puis mesurer l'absorbance de l'échantillon (A échantillon) contre le blanc réactif.

Calcule:

LDL - Cholesterol: Cholesterol total – HDL – Cholesterol – (TG/2.2) (m mol / L)

LDL - Cholesterol: Cholesterol total – HDL – Cholesterol – (TG/ 5) (mg / dL)

II.3. Traitement statistique:

L'analyse statistique de nos résultats a été réalisée par une analyse de variance par le biais du dispositif mono factoriel en randomisation totale.

L'analyse de variance est suivie d'une comparaison des moyennes par le test de Newman-Keuls aux seuils de 1% et 5%.

PARTIE III

Résultats et discussion

III. Résultats et Discussion

Les résultats obtenus après la coloration de Gram montrent que les bactéries lactiques utilisées pour se travail sont des souches pures de forme cocci et bacilles à Gram positif.

III.1. Caractérisation de substance antibactérienne de *L. plantarum* et *P.acidilactici*

III.1.1. Interactions bactériennes :

Les résultats relatifs à la recherche et la sélection de souches sensibles (indicatrices) sont mentionnés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Résultats des interactions.

Souches testées	<i>L.plantarum</i>	<i>P.acidilactici</i>
	Diamètre d'inhibition :mm	Diamètre d'inhibition :mm
<i>Streptococcus thermophilus</i> E ₃	2	2
<i>Lc. lactis ssp lactis</i> E ₀₈	2	4
<i>Lc. lactis ssp cremoris</i> B ₉	1,5	5
<i>St. thermophilus</i> B ₄	3	10
<i>Lc. lactis ssp cremoris</i> L ₅	0.0	4

E : Ensilage B : Beurre L : tube digestif du lapin

L'application des interactions interbactériennes, a montré que *L.plantarum* inhibe la croissance de quatre espèces E₃, E₀₈, B₉ et B₄. En revanche l'espèce *Lc. lactis ssp cremoris* L₅ est résistante. De ces résultats, on retient l'espèce la plus sensible *St. thermophilus* B₄.

L'espèce *P.acidilactici* a montré un hétéro-antagonisme très marqué envers les souches testées, elle inhibe la croissance de toutes les souches de cette petite collection mise à l'épreuve avec des diamètres d'inhibitions allant de 2 mm à 10 mm. De ce fait, la souche sensible est *St. thermophilus* B₄. La figure ci dessous, caractérise l'activité antagoniste de *P.acidilactici* envers les souches B₉ et B₄.

D'après ces résultats on va retenir deux souches sensibles ; *Lc lactis ssp cremoris* B₉ et *St. thermophilus* B₄ pour la recherche d'autres espèce bactériocinogènes mais sensible à *L.plantarum* et *P.acidilactici*.

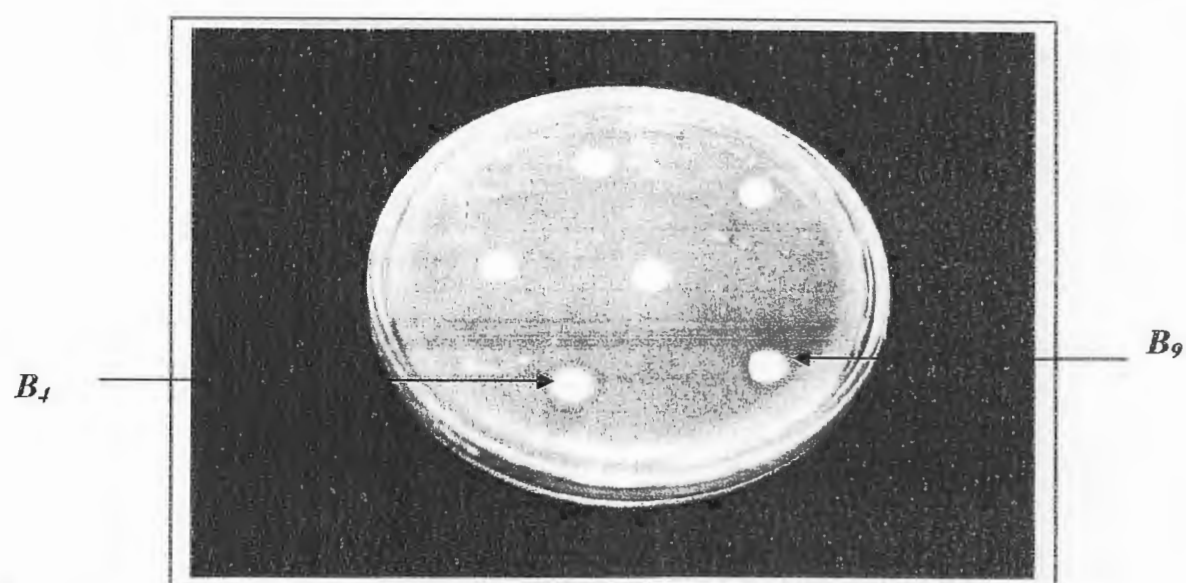


Figure [6]: Illustration de l'activité antagoniste de *P.acidilactici*

III.1.2. Recherche de bactéries bactériocinogènes et sensibles.

Cette deuxième partie avait pour objectif, sélectionner des bactéries lactiques bactériocinogènes et sensibles aux deux probiotiques *L.plantarum* et *P.acidilactici*. Les résultats du test sont mentionnés dans le tableau 16.

Les inhibitions inter bactériennes nous ont permis la sélection des couples de souches *Inhibitrice- Indicatrice*. Ces inhibitions renseignent sur le pouvoir antagoniste des bactéries lactiques.

Sur les 25 souches testées, 17 souches ont montré un antagonisme vis à vis de *Lc. lactis ssp.cremoris* B₉, alors que *St. thermophilus* B₄ est inhibée uniquement par 11 espèces de la collection.

L'analyse de ces résultats montre que la souche *Lc. lactis ssp.cremoris* B₉ est très sensible aux souches *L. plantarum* B₂, *Lc. lactis ssp lactis* B₅, *Lc. lactis ssp lactis* B₁, *Lc. lactis ssp cremoris* E₁₇ et *P.acidilactici* car les diamètres d'inhibitions étaient de 12 et 11mm. En revanche, il apparaît que *St.thermophilus* B₄ est mieux résistante, les diamètres d'inhibitionsles plus large sont obtenus avec *L. plantarum* BJ0041, *L. curvatus* R₂, *Lc. lactis ssp cremoris* B₉ et *Lc. lactis ssp lactis* B₅ avec des diamètres

d'inhibitions respectifs de 11, 10, 10 et 10mm. Les résultats montrent également des auto-inhibitions reproductibles pour certaines souches mais non reproductibles pour d'autres.

Tableau 16 : Résultats de la sélection de bactéries bactériocinogènes et sensibles.

Souches testées	<i>Lc. lactis ssp cremoris</i> B ₉ Diamètre : mm	<i>St. thermophilus</i> B ₄ Diamètre : mm
<i>L. plantarum</i> B ₂	12	0,0
<i>L. plantarum</i> BJ0041	9	11
<i>L. plantarum</i> BJ0031	0,0	0,0
<i>L. curvatus</i> R ₂	8	10
<i>L. delbrueckii ssp bulgaricus</i> B ₈	0,0	0,0
<i>L. casei ssp tolerance</i> S ₄	8	0,0
<i>L. viridescens</i> E ₁₇	9	0,0
<i>L. brevis</i> P ₂₇	9	4
<i>Lc. lactis ssp lactis</i> E ₀₈	0,0	0,0
<i>Lc. lactis ssp cremoris</i> B ₉	0,0	10
<i>Lc. lactis ssp cremoris</i> L ₅	9	4
<i>Lc. lactis ssp lactis</i> B ₁	11	7
<i>Lc. lactis ssp pac</i> B ₇	10	0,0
<i>Lc. lactis ssp lactis</i> B ₅	12	10
<i>Lc. lactis ssp cremoris</i> B ₁₂	0,0	0,0
<i>Lc. lactis ssp cremoris</i> B ₁₃	0,0	0,0
<i>Lc. lactis ssp cremoris</i> E ₁₇	11	0,0
<i>Lc. lactis ssp diacetylactis</i> R ₁	9	8
<i>St. thermophilus</i> B ₄	7	0,0
<i>St. thermophilus</i> E ₆	8	0,0
<i>Lc. raffinolactis</i> E ₁₈	0,0	0,0
<i>St. thermophilus</i> E ₃	8	0,0
<i>St. thermophilus</i> E ₁	8	0,0
<i>St. thermophilus</i> B ₃	0,0	0,0
<i>P. acidilactici</i>	11	0,0

Ces résultats mettent en évidence la présence de deux types d'interactions:

- Une symbiose qui est le résultat d'une interaction positif quand une lactique n'exerce aucun effet sur une autre lactique, cette interaction s'exprime par la

stimulation de la croissance des souches mis en contacte c'est le cas de *St.thermophilus B₃* et *Lc. lactis ssp.cremoris B₉*,

- Une inhibition qui est le résultat d'une interaction négatif indirecte entre deux souches cultivées ensembles. Dans ce cas, on a constaté la présence des phénomènes suivants :

Des auto-Inhibitions, c'est le cas de plusieurs couples de souches de même espèce (exemple de *St.thermophilus*) cela définit l'iso antagonisme .

Des inter-inhibitions, ou deux souches d'espèces différentes exerce un pouvoir antagoniste l'une envers l'autre c'est le cas de *L. plantarum BJ0041* et

• *St.thermophilus B₄*.

Toutes les observations notées à l'égard du pouvoir antagoniste entre les espèces de la collection lactique est lié aux métabolites excrétés dans les milieux de culture. Ainsi d'après Frederickson [34], l'action bactéricide ou bactériostatique des bactéries lactiques, autrement dit leur pouvoir inhibiteur provient de différentes causes principales et annexes¹:

- Principales tels que production d'acides organiques essentiellement de l'acide lactique, production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et production de bactériocines.

- Annexes tels que production de gaz carbonique CO₂, production de diacétyl et d'acétaldéhyde et production de substances antagonistes divers.

Le pouvoir antimicrobien de ces acides organiques reposent sur :

- L'abaissement du pH.
- La pénétration de l'acide indissocié dans le cytoplasme des autres cellules.

A ce stade, l'effet antagonique des bactéries peut être attribué à n'importe quel facteur antimicrobien : acide organique, bactériophage, bactériocine [14,33, 53]

D'autre part Desmazeaud [26] rapporte que la stimulation de croissance observer été en relation à l'absence d'enzyme protéolytique extra cellulaire par rapport à d'autre acide aminé ou de peptides.

Enfin, les résultats obtenus ont permis de sélectionner six espèces productrices de substances antimicrobiennes, c'est :

- *Lc. lactis ssp cremoris* B₉
- *St. thermophilus* B₄
- *L. plantarum* B₁
- *L. curvatus* R₂
- *Lc. lactis ssp diacetylactis* R₁
- *Lc. lactis ssp lactis* B₅

Ces souches utilisées comme des souches indicatrices productrices de substance inhibitrice pour le reste du travail.

III.1.3. Effet inhibiteurs des surnageants de *L.plantarum* et *P.acidilactici*

III.1.3.1. Effet des Surnageants natifs :

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Résultats de l'effet inhibiteur des surnageants natifs.

Souches	<i>cremoris</i>	<i>thermophilus</i>	<i>plantarum</i>	<i>curvatus</i>	<i>diacetylactis</i>	<i>lactis</i>
Tests	B ₉	B ₄	B ₁	R ₂	R ₁	B ₅
Surnageants	Diamètres des zones d'inhibitions: mm					
<i>L.plantarum</i>	12	0.0	00	13	0.0	08
<i>P.acidilactici</i>	12	12	07	07	11	13

Ces résultats illustrent la sensibilité des souches indicatrices vis-à-vis des surnageants de culture des deux souches lactiques *L.plantarum* et *P.acidilactici* qui ont une activité très importante due à la présence de substance à activité inhibitrice à savoir les acides notamment l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène ou les bactériocines.

Nous constatons que les surnageants issus des deux souches *L.plantarum* et *P.acidilactici* ont le plus large spectre d'inhibition contre les souches *Lc.lactis* ssp *cremoris* B₉, *L. curvatus* R₂ et *Lc.lactis* ssp *lactis* B₅.

Le diamètre d'inhibition étant de 8 mm à 13 mm lorsque les six souches sont soumises à l'effet du surnageant de *L.plantarum*. La souche la plus sensible est *L.curvatus* R₂ avec un diamètre de 13mm. Par ailleurs, il apparaît clairement que le surnageant de *P.acidilactici* est plus efficace, il exerce un effet très marqué envers *Lc.lactis* ssp *lactis* B₅, *Lc.lactis* ssp *cremoris* B₉ et *St. thermophilus* B₄ dont les diamètres d'inhibitions respectifs sont 13, 12 et 12mm.

✦

Tous ces phénomènes observés, notamment ceux liés aux inhibitions peuvent s'expliquer par :

- La production de substances qui confèrent à nos souches des aptitudes antagonistes, il s'agit probablement de bactériocine [46].
- La modification des conditions et certainement le gradient de protons dû à la production d'acide lactique.
- Si le pH n'est pas maintenu constant, c'est l'ion H₃O⁺ qui est inhibiteur [8,59].

En outre Daeschel [21] rapporte que les bactéries lactiques sont connues et utilisées pour les influences antagonistes qu'elles développent.

A ce stade l'effet antagonique des bactéries ou de leurs ECs peut être attribué à n'importe quel facteur antibactérien produit par une bactérie : acide organique, peroxyde d'hydrogène, bactériophage, bactériocine...etc. [4,84]

III.1.3.2. Effet des Surnageants pH7 :

Pour mettre en évidence la substance inhibitrice qui peut avoir une activité plus importante sur les bactéries lactiques, et pour cibler les substances actives parmi les quatre substances citées précédemment, on a ajusté le pH du surnageant à pH 7 pour éliminer l'effet acide lactique et autres acides organiques.

Tableau 18: Résultats de l'effet inhibiteur des surnageants pH7.

Souches	<i>cremoris</i>	<i>thermophilus</i>	<i>plantarum</i>	<i>curvatus</i>	<i>diacetylactis</i>	<i>lactis</i>
Tests	B_9	B_4	B_1	R_2	R_1	B_5
Surnageants	Diamètres des zones d'inhibitions: mm					
<i>L.plantarum</i>	00	00	00	12	12	15
<i>P.acidilactici</i>	10	00	13	11	12	16

Les résultats obtenus sont notés dans le tableau 18. Nous constatons que les surnageants de culture ajustés à pH 7 ont le plus large spectre d'inhibition vis-à-vis des souches *L.curvatus* R_2 , *Lc.lactis* ssp *diacetylactis* R_1 et *Lc.lactis* ssp *lactis* B_5 avec un diamètre d'inhibition étant allant de 10 mm à 16 mm.

Par ailleurs, la neutralisation des acides du contenu du surnageant, l'ajustement du pH à pH7 et l'application de la même technique relative à l'étude des interactions, a montré que l'effet inhibiteur persiste encore ce qui laisse croire que nos souches produisent des substances inhibitrices probablement des bactériocines, ainsi la lecture des résultats obtenus confirme que l'acide lactique n'est pas seul à agir.

Ce qui est important à signaler, est l'augmentation des diamètres des zones d'inhibitions après ajustement du pH. Ainsi, la croissance de *Lc.lactis* ssp *lactis* B_5 est nettement affectée par les surnageants de *P.acidilactici* et *L.plantarum* dont le diamètre des zones d'inhibitions est de 16mm et 15 mm respectivement.

Leveau et al [60] rapportent que les bactéries lactiques sont connues et utilisées par les influences antagonistes qu'elles développent. Elles sont dues aux métabolites excrétés, l'acide lactique n'est pas seul à agir mais les bactériocines dotées d'un spectre d'action le sont aussi.

Kacem et al [52] trouvent que le surnageant natif de la culture de *L.plantarum* exerce un grand effet inhibiteur sur *Lc.lactis*, *Lactobacillus* et *Enterococcus*.

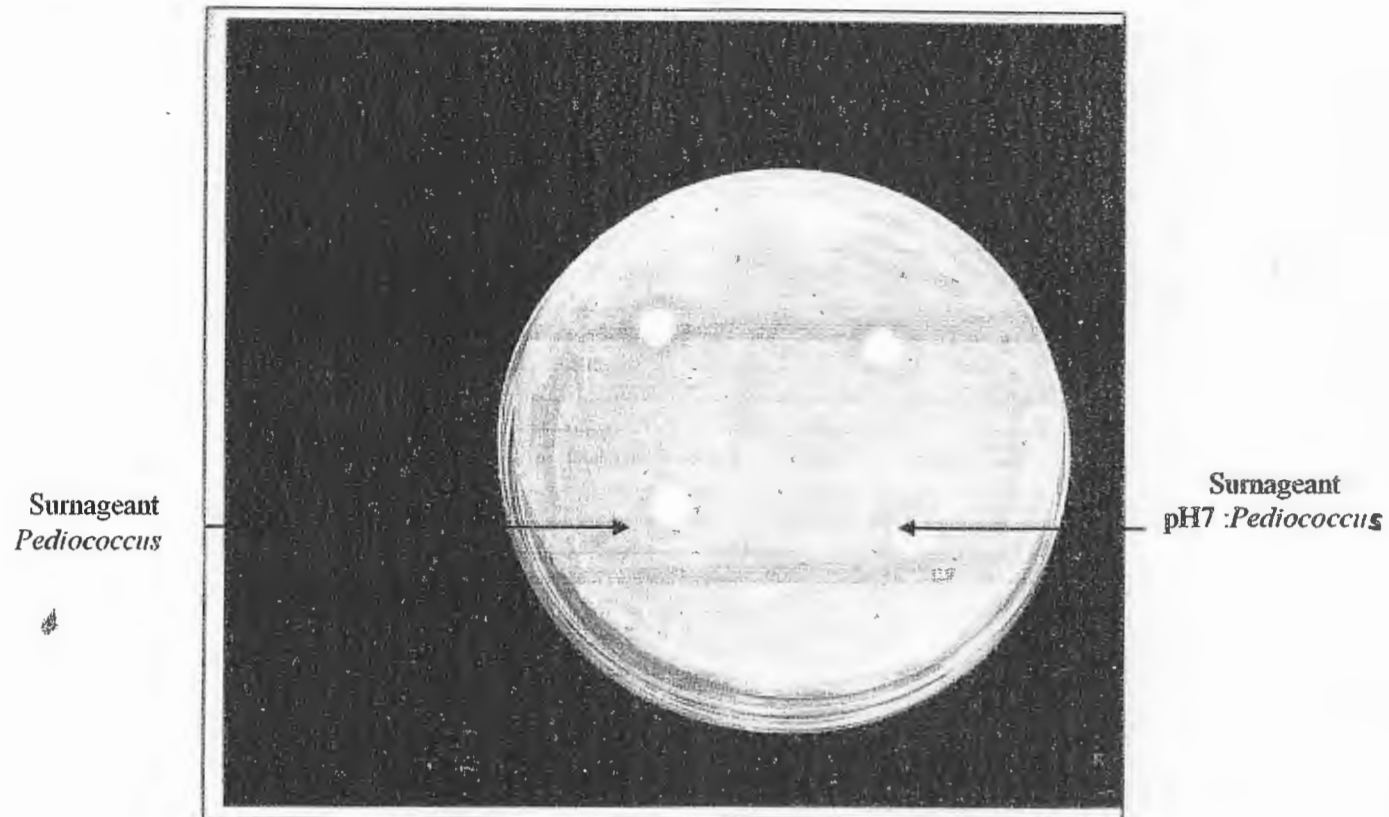


Figure [7]: Illustration de l'effet inhibiteur des surnageants natifs et à pH7 sur la souche *Lc.lactis ssp lactis B₅*

III.1.4. Effet de La digestion enzymatique sur l'activité des surnageants.

III.1.4.1. Action de la catalase.

Après avoir éliminer l'activité de l'acide lactique et des autres acides organiques par leur neutralisation par la soude, on a éliminé le deuxième facteur inhibiteur, le peroxyde d'hydrogène par addition de l'enzyme catalase. Les résultats issus de ce test sont portés sur le tableau 19.

Les résultats obtenus après le traitement enzymatique des surnageants montrent qu'il y a toujours un effet d'inhibition contre les souches indicatrices avec des zones d'inhibitions comprises entre 4 mm et 7mm de diamètre. Par comparaison aux résultats précédents, il y a une diminution de la taille des zones d'inhibitions .

Tableau 19 : Résultats de l'effet inhibiteur des surnageants traités par la catalase.

Souches	<i>cremoris</i>	<i>thermophilus</i>	<i>plantarum</i>	<i>curvatus</i>	<i>diacetylactis</i>	<i>lactis</i>
Tests	B_9	B_4	B_1	R_2	R_1	B_5
Surnageants	Diamètres des zones d'inhibitions: mm					
<i>L.plantarum</i>	06	05	04	05	06	07
<i>P.acidilactici</i>	05	04	07	07	06	05

✦ Nous constatons donc que le peroxyde d'hydrogène fait parti des substances à activité inhibitrice sur les bactéries lactiques. Retter [78] a montré que l'addition d'agent réducteur annule le pouvoir inhibiteur de peroxyde d'hydrogène.

La catalase ajouté a réduit l' H_2O_2 mais d'après les résultats l'effet inhibiteur persiste encore, ce qui traduit que l'inhibition n'est pas due à l'action d' H_2O_2 mais à une autre substance inhibitrice. Les résultats des travaux de Geis et al. [38]; Retter [78]; Daba et al. [18] montrent que l'activité inhibitrice de peroxyde d'hydrogène est éliminée par l'addition de la catalase (C-100 bovine liver, sigma).

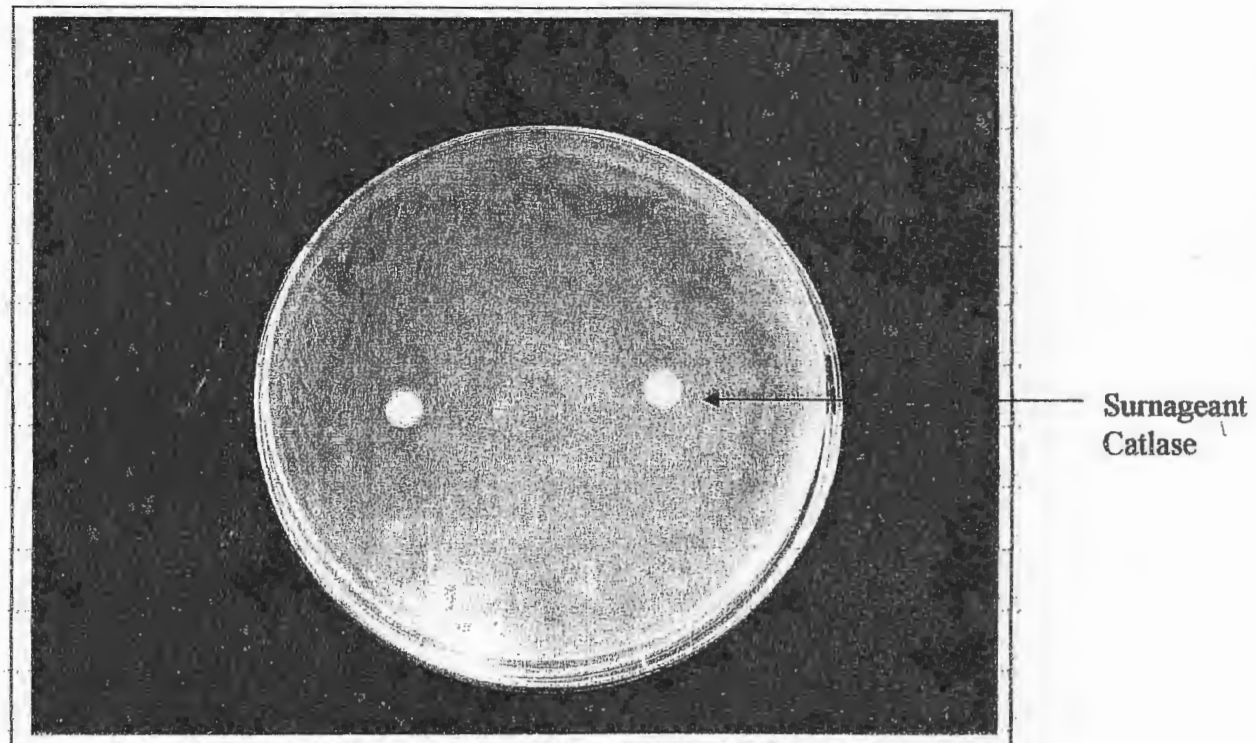


Figure [8]: Illustration de l'effet inhibiteur du surnageant après traitement par la catalase.

La figure ci-dessus, illustre une présence des zones d'inhibitions témoignant la persistance du surnageant traité par la catalase à inhiber les bactéries indicatrices

III.1.4.2. Action des protéases (trypsine, α -chymotrypsine) :

Les résultats obtenus sont portés sur le tableau suivant. Ces résultats montre l'absence d'un effet inhibiteur caractérisé par l'absence totale des zones d'inhibitions ,

Tableau 20 : Résultats de l'effet inhibiteur des surnageants traités par les enzymes.

Souches	<i>cremoris</i> <i>B₉</i>	<i>thermophilus</i> <i>B₄</i>	<i>plantarum</i> <i>B₁</i>	<i>curvatus</i> <i>R₂</i>	<i>diacetylactis</i> <i>R₁</i>	<i>lactis</i> <i>B₅</i>
Surnageant de :	Diamètres des zones d'inhibition : mm					
<i>L.plantarum</i> trypsine	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>P.acidilactici</i> trypsine	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>L.plantarum</i> α -chymotrypsine	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>P.acidilactici</i> α -chymotrypsine	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Ces résultats confirment que l'activité antibactérienne a été complètement éliminée par les enzymes protéolytiques utilisés (trypsine, α -chymotrypsine), ce qui témoigne la nature protéinique des substances inhibitrices et qui ne doivent être dans ce cas que des bactériocines [53, 62, 83,90]

Des résultats similaires ont été rapportés par Tagg et al [85] et Klaenhammer[54]. De même, les épreuves de Ratnam et al [77] montrent que les zones inhibitrices sont devenues plus grand sans traitement des surnageants par les protéases.

Jimenez-Diaz et al [49] montrent que l'activité antibactérienne de surnageant de *L.plantarum* LP co10 n'est pas toujours éliminée par l'action des protéases mais elle peut l'être sous l'effet des enzymes glycolytiques et lipolytiques.

III.1.5. Effet du traitement thermique et du froid sur l'activité des surnageants:

Les résultats des études précédentes nous ont permis de mettre en évidence des substances à activité antibactérienne de nature complexe à large spectre d'activité, il serait maintenant intéressant de définir leur stabilité en étudiant l'effet des traitements physiques sur leur activité.

Les résultats obtenus sont portés sur le tableau 21. La figure 9 illustre l'efficacité des surnageants à inhiber les souches lactiques même après un traitement par la chaleur et par le froid.

Tableau 21 : Résultats de l'effet traitement thermique et froid sur l'activité des surnageants.

Souches	<i>cremoris</i> <i>B₉</i>	<i>thermophilus</i> <i>B₄</i>	<i>plantarum</i> <i>B₁</i>	<i>curvatus</i> <i>R₂</i>	<i>diacetylactis</i> <i>R₁</i>	<i>lactis</i> <i>B₅</i>
Surnageant de :	Diamètres des zones d'inhibition : mm					
<i>L.plantarum</i> 121°C / 15mm	7,5	8,5	7,5	0,0	9,5	7,5
<i>P.acidilactici</i> 121°C / 15mm	0,0	10	15	0,0	10	15
<i>L.plantarum</i> 100°C / 1h	12,5	10,5	0,0	0,0	12	08
<i>P.acidilactici</i> 100°C / 1h	11,5	7,5	0,0	0,0	15	10,5
<i>L.plantarum</i> /100°C/ 30mm	08	10,5	0,0	0,0	7,5	9,5
<i>P.acidilactici</i> 100°C/ 30mm	10,5	7,5	0,0	0,0	11	11,5
<i>L.plantarum</i> -20°C/ 48h	8,5	08	0,5	7,5	8,5	06
<i>P..acidilactici</i> -20°C / 48h	7,5	7,5	8,5	12	10,5	10

Les résultats montrent que les surnageants de culture de *L. plantarum* et *P.acidilactici* traités à la chaleur à 100 °C pendant 30mm et 60mm, ou encore 121°C pendant 15 minute possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis de souches codées *B₉*, *B₄*, *R₁* et *B₅* avec des zones d'inhibition de 7,5mm à 15mm de diamètre.

De même, le traitement des même surnageants au froid à -20°C pendant 02 jours et plus, montre une persistance de l'activité inhibitrice sur les 06 souches indicatrices avec des zones d'inhibition de 0,5mm à 12mm de diamètre.

D'après ces résultats on constate que l'activité inhibitrice de la substance anti-bactérienne est stable même si elle est exposée aux différents traitements thermiques (autoclavage,...), ainsi qu'au traitement par le froid (-20 °C).

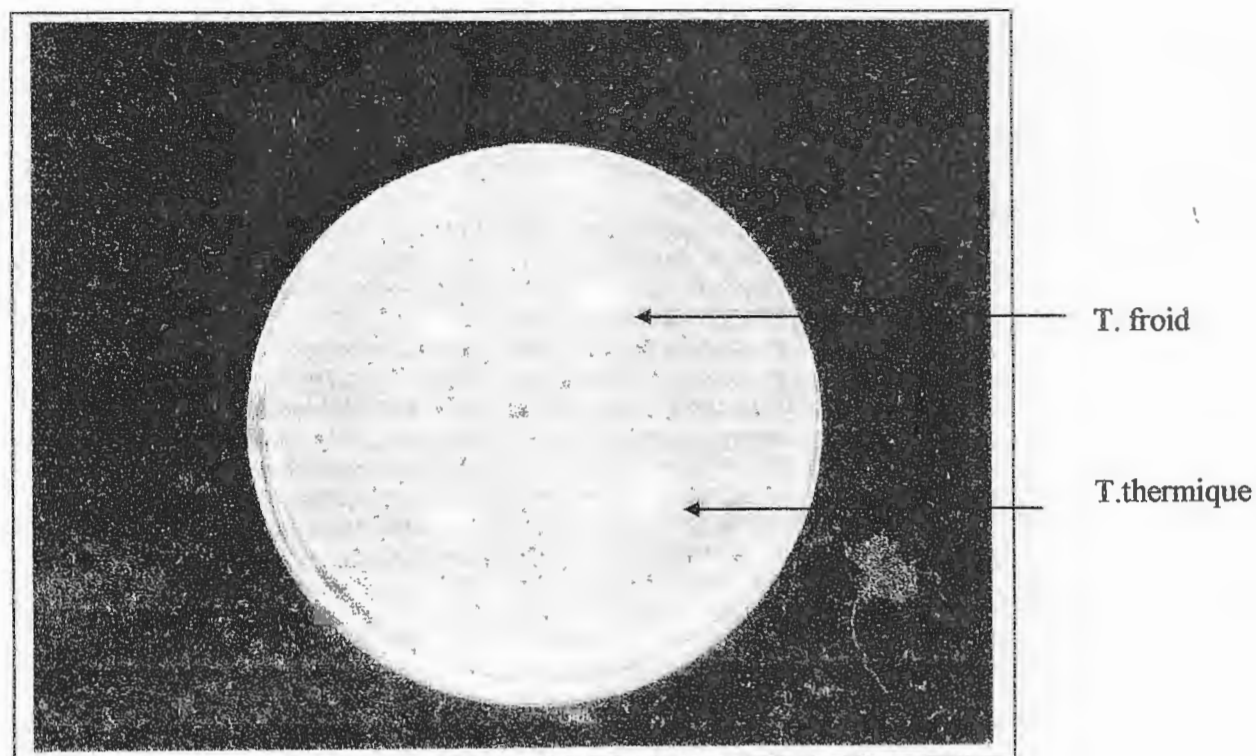


Figure [9]: Illustration de l'effet inhibiteur des surnageants soumis aux traitements physiques : chaleur et froid.

III.1.6. Recherche de phage :

Les résultats de l'application de la technique de recherche de phages ont montré l'absence totale de plages de lyse sur les milieux contenant les cultures sensibles, cela témoigne que les zones d'inhibitions trouvées sont dues à des substances inhibitrices et non pas à la présence de phages que se soit lytiques ou tempérés.

III.1.7. Détermination de l'activité de la substance inhibitrice :

D'après Retter [78], la croissance ou non des bactéries sur les milieux contenant un broyat des zones d'inhibition, fait la différence entre l'activité bactériostatique et bactéricide de la substance testée.

La lecture de nos résultats l'application de la techniques a montré une croissance bactérienne sur la gélose MRS de ce fait le surnageant est doté d'une activité bactériostatique.

III.2. Purification partielle de la substance inhibitrice :

L'application de la technique d'adsorption- désorption des protéines nous a permis de purifier partiellement les substances à activité inhibitrice. Les résultats de la mise en contact de ces substances avec les souches indicatrices sont portés sur le tableau suivant :

*Tableau 22 : Résultats de l'effet inhibiteur des bactériocines purifiées.

Souches	<i>cremoris</i> <i>B₉</i>	<i>thermophilus</i> <i>B₄</i>	<i>plantarum</i> <i>B₁</i>	<i>curvatus</i> <i>R₂</i>	<i>diacetylactis</i> <i>R₁</i>	<i>lactis</i> <i>B₅</i>
Surnageants :	Diamètres des zones d'inhibition : mm					
<i>L.plantarum</i> pH 1,5	4	3	5	5	5	6
<i>P.acidilactici</i> pH 1,5	5	4	0.0	4	4	6
<i>L.plantarum</i> pH 3	5	6	4	0.0	4	5
<i>P.acidilactici</i> pH 3	5	3	0.0	3	3	4
<i>L.plantarum</i> pH 6	0.0	3	5	0.0	4	3
<i>P.acidilactici</i> pH 6	4	4	5	4	5	3
<i>L.plantarum</i> pH 8	5	4	0,0	5	0,0	0,0
<i>P..acidilactici</i> pH 8	6	5	6	0,0	4	10

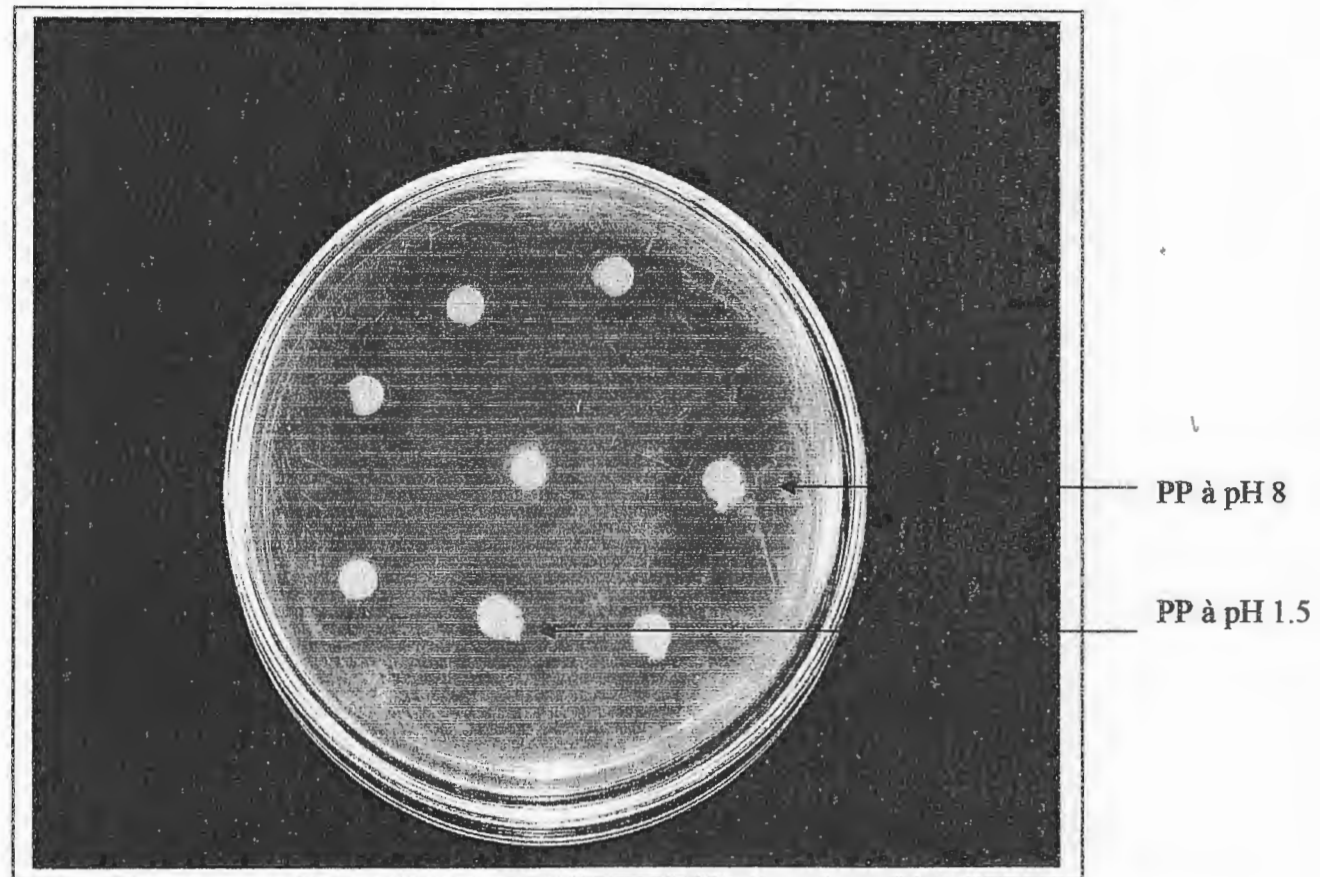
La lecture de ces résultats montre que le facteur pH n'a pas d'effet sur l'activité biologique des substances protéiniques purifiées, elles exercent toujours une activité inhibitrice via les souches indicatrices dont les diamètres d'inhibitions vont de 3mm à 10mm.

Cependant, il apparaît clairement que la souche indicatrice au sens propre du terme est *Lc.lactis ssp.lactis B₅*, elle est inhibée par sept substances purifiées et qui donnent des diamètres des zones d'inhibitions compris entre 3 mm et 10 mm, en revanche cette espèce est résistante à la protéine pH8 issue de la culture de *L.plantarum*.

Ces résultats montrent que les protéines purifiées doivent avoir un faible poids moléculaire étant donné que leur activité n'est pas influencée par les pH de la solution de désorption. La figure ci-dessous montre l'activité inhibitrice des substances purifiées.

Des résultats similaires ont été trouvés par Kacem et al [52] une bactériocine issue d'une culture de *L.plantarum* OL15 a été purifiée par la même technique que nous avons utilisé, cette substance exerce une activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries lactiques et des bactéries à Gram négatif. D'autre part Tagg et al [84] rapportent que les inhibiteurs produits par les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, généralement de nature protéiques dont le poids moléculaire, les propriétés biochimiques, le spectre d'activité et le mode d'action peuvent être très différents.

Vandenbergh[89]rapporte que les substances inhibitrices produites par les bactéries lactiques sont généralement de nature protéique. De même, les travaux de Bhuging et al [9]trouvent que la pediocine produite par *P.acidilactici* interagit avec les acides lipotéchoïques absent chez les Gram négatifs, ces molécules jouent le rôle de site de fixation non spécifique et de ce fait les bactériocines deviennent bactéricides.



PP: Proteine purifiée

Figure[10]: illustration de l'effet de la substance inhibitrice après purification partielle sur les bactéries lactiques.

III.3. Caractéristiques des produits lactofermentés.

Les caractéristiques des laits fermentés sont données dans le tableau 23. Il apparaît que les deux produits finis ont une acidité assez proche estimée à 5.5g d'acide lactique par litre de lait fermenté par l'espèce *plantarum* et 5.3g /l dans celui fermenté par *P.acidilactici*.

La numération de la flore lactique des deux produits a montré que dans le produit à *L.plantarum*, il y a $7,04 \cdot 10^{10}$ cellules/ml. Celui fermenté par *P. acidilactici* contient $248 \cdot 10^{13}$ cellules/ml. De ce fait ces produits sont dits vivants.

Tableau 23 : mesure d'acidité et de pH du lait fermenté

	Mesure d'acidité	Mesure du pH
<i>L.plantarum</i>	55°D	5.3
<i>P.acidilactici</i>	53°D	5.1

III.4. Dosage des lipides plasmatiques et glycémie :

III.4.1. La Glycémie :

Les résultats de dosage de la glycémie sont présentés dans le tableau 24 dont la variation est illustrée par la figure [11].

Tableau 24 : Évolution de la glycémie en fonction de l'âge du lapin (g/l).

Périodes	Témoin	<i>L. plantarum</i>	<i>P. acidilactici</i>	SS
1 ^{ère} S	0,79	0,77	1,25	**
2 ^{ème} S	1,15	1,31	1,58	
3 ^{ème} S	1,63	1,27	1,29	
4 ^{ème} S	1,26	1,31	1,33	
SS	NS			Norme : 75 à 140 g/l

S: semaine

SS: signification statistique

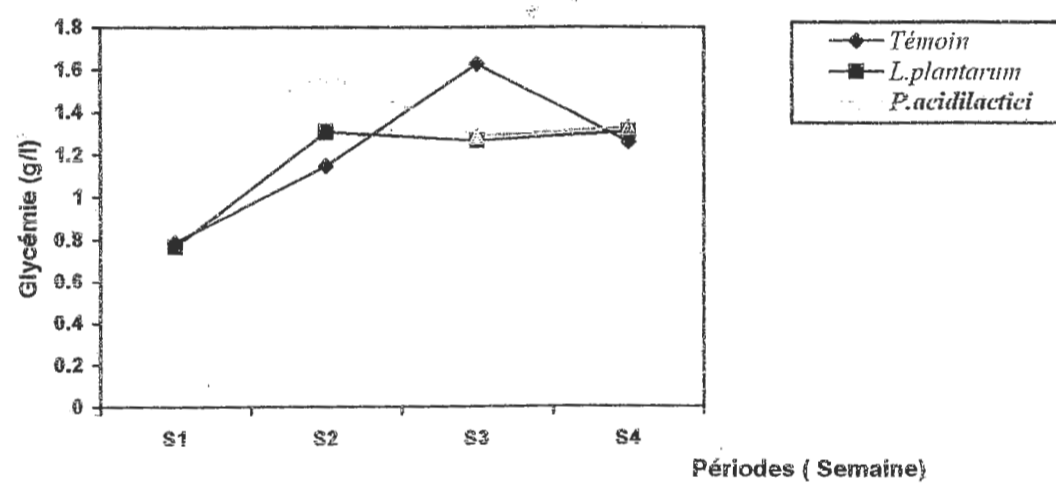


Figure [11]: Évolution de la glycémie en fonction de l'âge du lapin (g/l)

Nous constatons que la valeur de la glycémie des animaux des 03 lots a connu une variation hautement significative ($P < 0,01$) durant les deux première semaine de l'expérimentation atteignant les valeurs les plus élevée estimé à 1,58 g/l chez les sujets recevant le probiotique *P. acidilactici*, 1,31 g/l chez les sujets recevant le probiotique *L. plantarum* et 1,15 g/l de sang chez les sujets témoins.

La 3^{ème} semaine est caractérisée par une augmentation significative de ce paramètre chez les sujets témoins atteignant la valeur la plus élevée estimé à 1,63 g/l, en revanche une diminution significative chez les sujets recevant les deux probiotiques a été notée. Cependant, la 4^{ème} semaine est caractérisée par une augmentation de la glycémie chez les lapins recevant les 02 probiotiques accompagnée d'une diminution remarquable chez les sujets témoins avec une valeur estimée à 1,26 g/l de sang.

D'après ces résultats nous constatons qu'il y'a des fluctuations de la glycémie d'une semaine à une autre mais les valeurs obtenues restent dans la norme (Jones, [48]).

. Il est fort probable que cette augmentation est liée au stress des animaux avant et pendant l'abattage, faute de quoi la glycogénolyse prend place. D'autre part, il est fort probable que l'augmentation rencontrée pendant cette période expérimentale est en relation avec l'augmentation de la température ambiante demandant ainsi un taux plus élevé en glucose sanguin nécessaire à la thermorégulation.(mois de mars).

D'autre part, ces fluctuations peuvent être liées à l'hétérogénéité des échantillons du fait que les lapins n'ont pas le même age.

On conclu que la glycémie des animaux recevant les probiotiques aussi bien que du témoin reste conforme aux normes durant toute la période expérimentale, ce ci montre que l'utilisation des deux probiotiques n'affecte pas les valeurs de la glycémie mais l'age des animaux avait un effet hautement significatif sur les variations de la glycémie entre les trois lots.

III.4.2. Le cholestérol :

Les résultats consignés dans le tableau 25 et illustrés par la figure [12] montrent que la cholestérolémie des sujets témoins a connu une diminution significative et graduelle tout au long de la période expérimentale. Elle débute par une valeur de 1,25 g/l, diminue pendant la 2^{ème} et la 3^{ème} semaine pour atteindre sa valeur la plus basse à la fin de l'expérimentation estimée à 0,25 g/l. En revanche ces résultats montrent une fluctuation de ce paramètre biologique tout au long de la période d'étude chez les animaux recevant le probiotique *L.plantarum* dont la cholestérolémie était de 1,30 g/l au cours de la première semaine, décroît pendant la deuxième semaine, puis augmente à la troisième semaine pour atteindre sa valeur la plus basse durant la 4^{ème} semaine estimée à 0,44 g/l.

Tableau 25 : Évolution de la cholestérolémie en fonction de l'âge du lapin (g/l)

Régime Périodes	Témoin	<i>L.plantarum</i>	<i>P.acidilactici.</i>	SS
1 ^{er} Semaine	1,25	1,30	0,49	**
2 ^{ème} Semaine	0,65	0,54	0,38	
3 ^{ème} Semaine	0,51	0,55	0,30	
4 ^{ème} Semaine	0,25	0,44	0,66	
SS	NS			Norme : 1 à 8 g/l

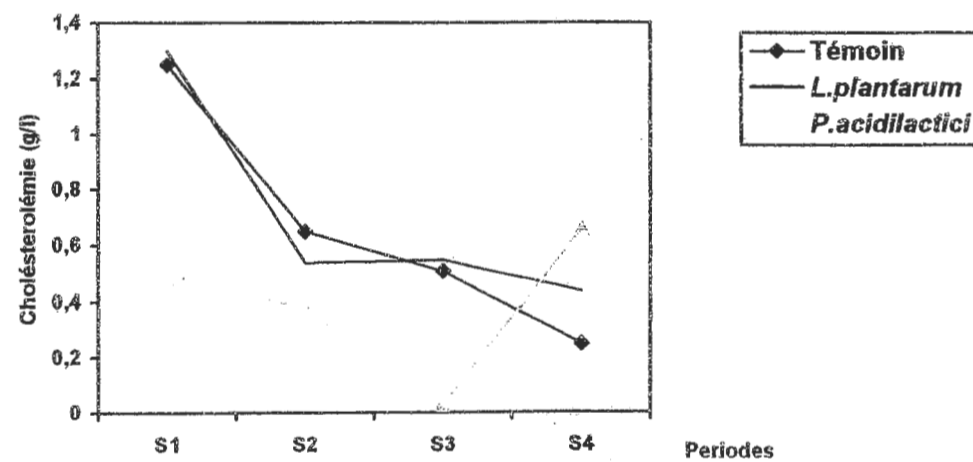


Figure [12]: Évolution de la cholestérolémie en fonction de l'âge du lapin (g/l).

Les résultats obtenus montrent que le sang des sujets à *P.acidilactici* est le moins riche en cholestérol pendant les trois premières semaines. La valeur la plus élevée est obtenue durant la 4^{ème} semaine, estimée à 0,66 g de cholestérol/l de sang. L'analyse statistique des résultats montre que seul le facteur âge des animaux influence significativement la cholestérolémie et que d'autres facteurs non contrôlés (Sexe,...) avaient une grande influence sur les résultats (SCE résiduelle était importante).

De ces résultats, il en ressort qu'il y a une diminution du cholestérol plasmatique durant la période d'étude, la diminution du cholestérol en présence des bactéries lactiques peut être expliquée par cinq mécanismes (Hashimoto et al [43] Beena et Prasad [6] Chiu et al [15]).

- Les produits issus de la fermentation des bactéries lactiques peuvent inhiber l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol et de ce fait réduisent la production du cholestérol.
- Inhibition de la conversion de l'acétate qui est le précurseur initial dans la biosynthèse de cholestérol. ceci est confirmé par (Rao et al, 1981) qui attribuent cette action à certaines bactéries lactiques.
- Les bactéries lactiques facilitent l'élimination du cholestérol dans les fèces.
- Les bactéries lactiques inhibe l'absorption du cholestérol au niveau intestinal en le fixant
- Les bactéries lactiques interfèrent et le recyclage des sels biliaires (issus du métabolisme du cholestérol), donc facilite son élimination et de ce fait la synthèse des sels biliaires reste cholestérol dépendant.
- Le cholestérol est incorporé dans les parois cellulaires des bactéries lactiques, cela permettra aux parois cellulaires de mieux résister aux agressions des facteurs de l'environnement

Plusieurs données bibliographiques rapportent l'effet positif des probiotiques sur le cholestérol, d'autres rapportent qu'il n'y a pas d'effet. Jin et al [50] ont montré que l'apport des cultures de *Lactobacillus* dans la ration du poulet avait un effet sur la

réduction du cholestérol sanguin. Par ailleurs, Gilliland et al [40] expliquent la diminution du taux de cholestérol chez les animaux consommant des *Lactobacilli* par l'assimilation de ce dernier par ces bactéries ou à la co-précipitation du cholestérol avec les sels biliaires déconjugués.

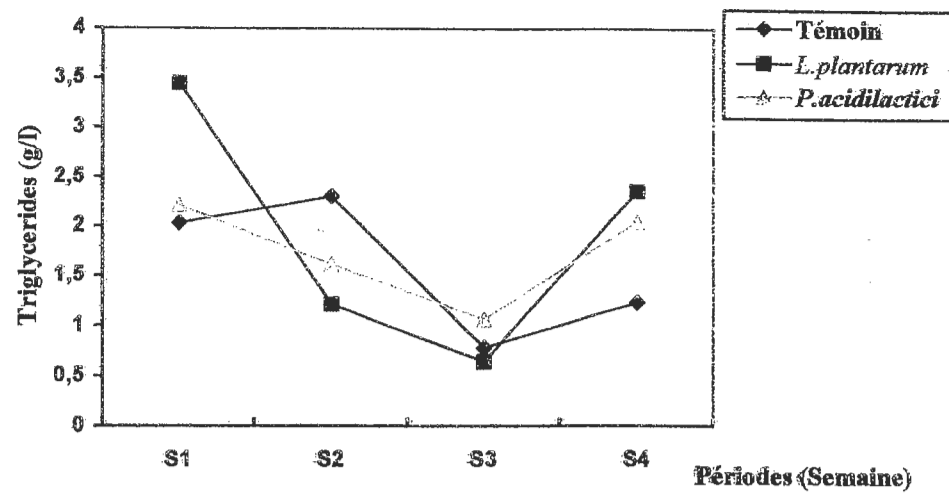
III.4.3. La triglycéridémie :

Les résultats portés sur le tableau 26 et illustrés par la figure [13] montrent que la triglycéridémie chez les sujets témoins prend la valeur maximale au cours de la 2^{ème} semaine, la valeur la plus basse estimée à 0.78g/l est enregistrée durant la 3^{ème} semaine.

Le dosage des triglycérides dans le sang des sujets recevant le probiotique *L.plantarum*, a montré une nette diminution durant la période d'étude dont la valeur la plus faible est obtenue en S3 estimée à 0.64 g/l de sang. De même, il apparaît que l'apport de *P.acidilactici* avait une influence sur le taux de triglycérides sanguin, ainsi il y a eu une diminution graduelle en période S2 et S3 puis une remonté en fin de l'expérimentation. La valeur de ce paramètre prend le maximum durant la 1^{ère} semaine puis une diminution significative et graduelle durant la 2^{ème} semaine estimée à 0.64 g/l enfin une augmentation durant la 4^{ème} semaine.

Tableau 26 : Evolution de la triglycéridémie en fonction de l'âge du lapin (g/l)

Période	Témoin	<i>L.plantarum</i>	<i>P.acidilactici</i>	S. S
1 ^{er} Semaine	2.03	3.45	2.21	**
2 ^{ème} Semaine	2.30	1.21	1.61	
3 ^{ème} Semaine	0.78	0.64	1.06	
4 ^{ème} Semaine	1.23	2.35	2.04	
S. S	**			Norme : 1.4 à 1.76 mmol/ l



Figure[13]: évolution de la triglycéridémie en fonction de l'âge du lapin (g/l).

Par ailleurs, contrairement aux sujets recevant le probiotique *P. acidilactici* les valeurs de ce paramètre ont connu une diminution graduelle et significative durant les trois premières semaines et prennent la valeur la plus basse durant la 3^{ème} semaine estimée à 1.06 g/l suivis d'une augmentation pendant la 4^{ème} semaine estimée à 2.04 g/l.

Les résultats sont dues probablement à :

- L'ingestion des probiotiques a probablement provoqué une suppression de la synthèse des T.G hépatiques et du VLDL cholestérol aboutissant à une diminution marquée du taux de T.G sérique.
- La hausse de triglycéridémie chez les sujets recevant les deux probiotiques peut être expliquée par : une défaillance dans le métabolisme des sucres ou les sucres seraient convertis en lipides (Turpin et al [88]).
- Un dysfonctionnement du métabolisme des lipoprotéines surtout les VLDL, fait augmenter la concentration des T.G dans le sang (Ziegler, [93]).
- La forte augmentation hautement significative ($P < 0.01$) marquée au cours de la 4^{ème} semaine semble due à une activation de LPL qui contribue à la dégradation massive des lipides de réserve afin de compenser les pertes

énergétique provoqués par l'augmentation de la T° en cette période Turpin et al [88] et Sebaoum [82].

III.4.4 .La HDL émie :

Les résultats obtenus sont portés sur le tableau 27 et illustrés par la figure 14.

Tableau 27 : Evolution de la HDL émié en fonction de l'âge du lapin (g/l)

Période	Témoin	<i>L. plantarum</i>	<i>P. acidilactici</i>	SS
1 ^{ère} semaine	0.25	0.23	0.18	**
2 ^{ième} semaine	0.18	0.30	0.16	
3 ^{ième} semaine	0.13	0.06	0.10	
4 ^{ème} semaine	0.06	0.18	0.13	
SS	**			

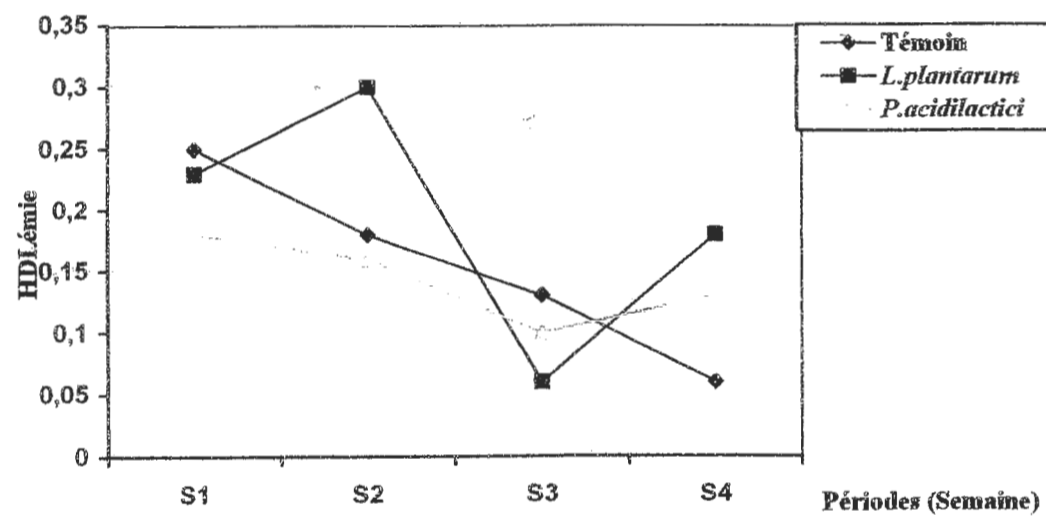


Figure [14]: Evolution de la HDL émie en fonction de l'âge du lapin (g/l).

Les résultats du tableau 27 et la figure [14] décrivent une diminution graduelle de ce paramètre tout au long de la période expérimentale chez les sujets témoins, elle débute par une valeur maximale pendant la première semaine estimée à 0.25 g/l et atteint une valeur plus bas durant la 4^{ème} semaine estimée à 0.06 g/l de sang.

La même observation a été notée à l'égard de la HDLémie des sujets recevant le probiotique *P.acidilactici*, dont les meilleurs taux ont été obtenus en périodes S1 et S2 pour lesquelles on obtient des taux respectifs de 0.18g/l et 0.16 g/l de sang.

Par ailleurs, l'HDLémie des sujets recevant le probiotique *L.plantarum* a connu une fluctuation tout au long de la période expérimentale, elle prend une valeur maximale pendant la 2^{ème} semaine estimée à 0,30 g / l puis diminue durant la 3^{ème} semaine ou elle prend la valeur la plus basse estimée à 0, 06 g/l de sang.

Il apparaît que les meilleurs résultats sont obtenus avec les sujets recevant le probiotique *L.plantarum* dont l'apport de ce dernier dans la ration avait un effet hautement significatif ($P < 0.01$) sur le paramètre épurateur du cholestérol de l'organisme. Cependant, chez les sujets témoins, on constate qu'il y a une perturbation du métabolisme lipidique soit par le biais et sous l'influence des conditions que nous ne contrôlons pas (Age des animaux, stress, sexe, température, régime,...) soit au caractéristiques physiologique individuelle de chaque animal.

La diminution des taux des HDL-C peut s'expliquer par :

- Un hyper catabolisme des HDL - C couplé à augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase.
- Une augmentation de l'activité de la lipase hépatique.

Nos résultats vont et ceux de Hashimoto et al [44] ils trouvent que l'utilisation de *L.casei* TMC 0409 diminue les valeurs des HDL - C dans le sang.

III.4.5. La LDLémie :

Les résultats de l'évolution de la LDLémie en fonction de l'âge du lapin et des probiotiques sont portés sur le tableau 19 et illustrés par la figure 15.

On note que le dosage direct de cette fraction est trop compliqué ; il est beaucoup plus simple de le calculer par la formule de Friedwald et Frederickson, valable à condition que les triglycérides soit inférieur à 4 g/l : $LDL-C = CT - HDL-C - (TG / 5)$ en g/l.

Tableau 28 : Evolution de la LDL l'émie en fonction de l'age du lapin (g/l)

Période	Témoin	<i>L. plantarum</i>	<i>P. acidilactici</i>	S S
1 ^{ère} semaine	0.59	0.38	0.132	**
2 ^{ème} semaine	0.03	0.002	0.102	
3 ^{ème} semaine	0.22	0.362	0.988	
4 ^{ème} semaine	0.056	0.21	0.122	
S.S	NS			

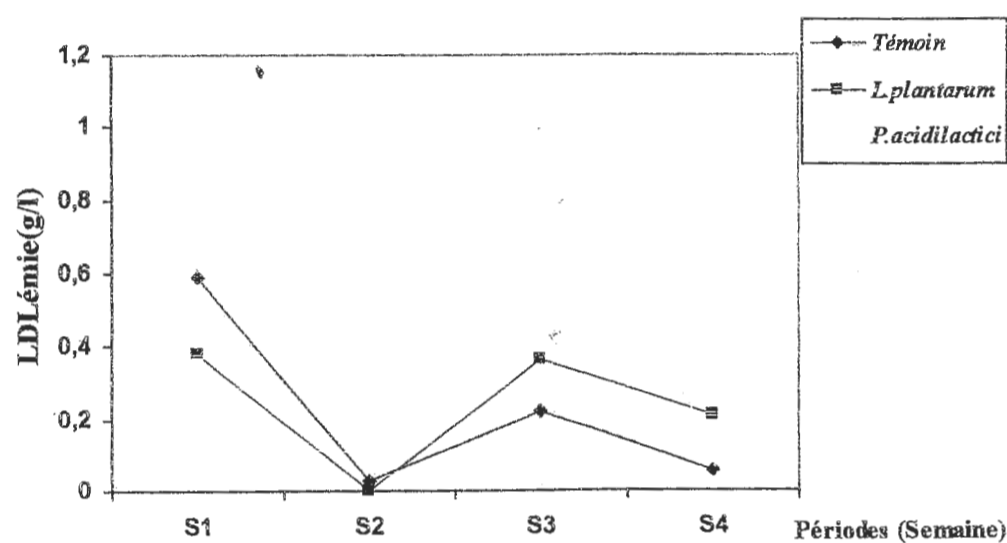


Figure [15]: Évolution de la LDLémie en fonction de l'age du lapin (g/l).

Les résultats consignés dans le tableau 28 et la figure [15] montrent que la LDLémie de tous les sujets a connu une fluctuation tout au long de la période expérimentale. Celle des sujets témoins, débute par une valeur maximale estimée à 0.59 g/l pendant la 1^{ère} semaine, diminue pendant la 2^{ème} semaine puis augmente durant la 3^{ème} semaine pour atteindre une valeur très faible 0.056 g/l.

Par ailleurs, chez les sujets à *L.plantarum* la LDLémie a connu également des fluctuations mais avec une diminution très remarquable comparativement à la première semaine. Elle prend la valeur la plus basse durant la 2^{ième} semaine estimée à 0.002 g/l et une valeur maximale pendant la 3^{ième} semaine puis diminution pendant la 4^{ième} semaine mai pour les sujets recevant le probiotique *P.acidilactici*, ce paramètre prend une valeur 0.102 g/l pendant la 2^{ième} semaine et une valeur maximale durant la 3^{ième} semaine estimée à 0.988 g/l.

Les résultats trouvés montrent que l'apport des probiotiques n'a pas d'effet significatif sur le métabolisme des LDL ($P>0.05$) mais la diminution des taux des LDL peut être liée à une activité assez importante des LPL surtout que les lapins sont en phase de croissance donc les besoins énergétiques sont importantes pour la protéogenese.

Les résultats obtenus par Chiu et al [15] sont en accord avec ceux que nous avons trouvé, ces auteurs rapportent que l'apport de trois espèces de *Lactobacillus* dans la ration des rats a diminué le Cholestérol et les LDL- C mais avec une différence non significative comparativement au témoin.

Conclusion

Conclusion Générale

Le premier objectif de cette étude était de sélectionner des souches lactiques à activité bactériocinogènes et celles sensibles aux métabolites excrétés par les espèces *L.plantarum* et *P.acidilactici*.

Les résultats obtenus montrent que six espèces appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* sont sensibles aux métabolites des deux espèces tests. Par ailleurs, les surnageant de cultures ont montré un pouvoir antagoniste très appréciable envers la collection lactique mise à l'épreuve.

De même, il apparaît clairement que l'élimination des effets acide lactique, peroxyde d'hydrogène et protéases n'affecte en aucun cas l'activité inhibitrice des surnageant de cultures.

Cependant, les traitements physiques appliqués sur les surnageant n'avaient aucun effet sur l'activité biologique des composantes du surnageant dont ces derniers ont manifesté une activité bactériostatique vis à vis des souches sélectionnées comme sensibles.

La purification partielle des substances inhibitrices a montré qu'elles sont de nature protéinique, thermorésistants et qu'elles ont probablement un faible poids moléculaire.

Les résultats de la deuxième partie expérimentale relative à l'évaluation de l'effet de l'apport de deux probiotiques *L.plantarum* et *P. acidilactici* dans la ration sur la glycémie et les lipides sanguins ont montré ce qui suit :

- Les probiotiques n'affectent pas la glycémie du lapin ;
- L'apport des bactéries lactiques dans la ration avait un effet significatif sur les HDL- C uniquement mais sur le plan biologique, il apparaît que ces bactéries possèdent une nette influence sur le Cholestérol, les triglycerides et les LDL- C.

Enfin pour l'ensemble de cette étude, nous proposons :

- La détermination de la composition et du poids moléculaire de la substance inhibitrice : SDS-Page, HPLC,...
- Refaire la partie *in-vivo* en prenant en considération l'âge du lapin, le sexe et la composition de la ration alimentaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abastado P**,1999. La Saga du Cholestérol in science et vie. N°208,61-65.
2. **Alias. C**, 1960 . Science du lait, Principe des techniques laitiers,1-150 .
3. **Anonyme**, 1987. Le yaourt et ces ferments vivants .Qualités nutritionnelles. *Cah Nuti. Science*, 485-486.
4. **Barefoot S.F et Klanhammer T.R**, 1983 .Detection and activity of lactacin B, a bactériocin produced by *Lactobacillus acidophilus*.*Appl environ microbiol*, **45**,1808-1815.
5. **Beliard E et Thuant T**,1989 . Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. Tome II. les fermentations alimentaires,140-155 .
6. **Beena A et Prasad V**, 1997. Effect of yogurt and bifidus yogurt fortified with skin milk powder,condensed whey on serum cholesterol and triacylglycerol levels in rats. *J Dairy Res* **64**, 453-457.
7. **Benlian P**, 1996.Genetique et dyslipidemie .Ed.INSERM ,114-120 .
8. **Bergere J** ,1968 . Production massive de cellule de streptocoque lactique. *Lait*, **48**,13-139.
9. **Bhuging A.K., Johnson M.C., Ray B et Kalchayanand N**, 1991. Mode of action of pediocin Ac H from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacterial*, **70**, 25-30.
10. **Boulangier P., Polonvski J., Tayeau F., Mandel P et Biserte G**, 1973. Biochimie médicale.2^{ème} édition.Tec et Doc, Lavoisier, 101-102.
11. **Boulangier P.,et Biserte**, 1971. Biochimie médicale. FASCICULE III sang, Humeurs, Tissus, organes . Biochimie physiologique et séméiologique. 8^{ème} édition (2^{ème} tirage) *Tech.Doc.Lavoisier* ,441-442.
12. **Bourgeois C.M et Larpent J.P**,1996 . Microbiologie alimentaire. Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome II, 2^{ème} édition.Tec et Doc, Lavoisier , 437-447 .
13. **Bruno-Barcena J.M ., Sinerig F., Gonzalez de Liano ., Rodrriguez A et Suarez J.E** ,1988. Chemostat production of plantaricin C by *Lactobacillus plantarum* LL 441. *Appl . Environ . Microbiol*,**64**, 3512-3514.
14. **Buccolo G.P** ,1973 . Quantitative determination of serum triglyceride by use of enzymes. *Clin chem* ,**19** , 476-482.
15. **Chiu C.H ., Lu T.Y ., Tseng Y.Y et Pan T.M**,2005. The effects of Lactobacillus fermented milk on lipid metabolism in hamsters fed on high- cholesterol diet . *Appl. Microbiol . Biotechnol* , **10**,5-13.

16. **Christiane Joffin et Jean Noel Joffin**, 1993 ..Microbiologie alimentaire . 5^{ème} édition .Saint-Denis,174-175.
17. **Clavey V.,Fruchart j.C**,1992.Transport des lipides par les lipoproteines.Ed .Paris, 37-39.
18. **Daba. H., Lacroix C., Huang J et Simard R.E** ,1994 . Simple methods of purification and sequencing of bactériocin produced by *Pediococcus. acidilactici* .UL S.J *Appl bacterial*, 77,682-688.
19. **Dacosta.Y**, 2002 . La bio-protection des aliments.YVES DACOSTA . Paris, 1-2-18.
20. **Dacosta Yves** ,2000 .La bio-protection des aliments .L'antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologiques . Editions yves dacosta .paris ,5-13-18 .
21. **Daeschel M.A et Klaenhammer T.R**,1985 . Association of a 13.6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacterocin acidity. *Appl .Environ. Microbiol* ,50, 1538-1541.
22. Danone nutrutopics , 2004 . Le bénéfiques santés des probiotiques. N°29 , 1-2 .
23. **Delmare S.J**,1999. Dictionnaire des termes de médecine malouine,14-20 .
24. **Deroissart et Luquet F.M**, 1994 . Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Uriage : Lorica ,605- 614 .
25. **Deroisart H.B**,1986 . Lait et produit laitier par Luquet F.M.. TomeIII. ED. Technique et Documentation Lavoisier , Paris, 515-520.
26. **Desmazaud M**, 1992 . Les bactéries lactiques. I.N.R.A .120-150 .
27. **Desmazaud M**, 1996 . Alimentation et santé . Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine. *Unité de recherches laitières 78352, Paris* , 338-340.
28. **Dubach A**, 1999 . Leiter analytik. Microbiologie. *Emmi Schweiz. AG, 6032 emmen*,3-4.
29. **Duflotuv**, 2004 .Danone vitapole, 2.
30. **Elaine N et Marie B**,2000. Biologie humaine . Anatomie et physiologie. Traduction de la 6^{ème} édition américaine,439-440.
31. **Fleming H.P., Etechells J.L et Costilow R.N** , 1975. Microbial inhibition of isolates of *Pediococcus* from cucumber brine. *Appl .E nviron. Microbiol.* 30,1040-1042.
32. **Florent J.M et Roerton**,1997 .Action bénéfique des probiotiques en poulet de chair. *Filière aviculture*.
33. **Fossati P** , 1982 .*Clin chem* ;28(10),2077-2080.

34. Frederickson A.G., 1977. Behaviour of mixed cultures of microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol*, **31**, 63-87.
35. Frement L, 1986. Cholestérol. Acides gras essentiels et athérosclérose. *Revue française des corps gras*, 369-371.
36. Fuller R, 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol*, **66**, 365-378.
37. Galtier B, 1974. Larousse médical. *Librairie Larousse. Paris*, 203-494-1152.
38. Geis A., Singh J et Tuber M, 1983. Potential of lactic acid *Streptococci* to produce bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol*, **45**, 205 - 211.
39. Gibsor G.R et Rober Faroid M.B, 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota. *Introducing the concept of probiotics. J NUTR* **125**, 1401-1412.
40. Gilliland S.E., Nelson C.R et Maxwele C, 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol*, **49**, 377 - 381.
41. Gournier N., Chateau., Larpent J.P., Castellanos M et Larpent J.L, 1994. Les probiotiques en alimentation animale et humaine. *F758384 Paris cedex 08*, 40-41-108.
42. Hames B.D., Hooper N.M et Houghton, 2000. L'essentiel en biochimie. *Ed. Bert*, 320-328.
43. Hashimoto H., Yamazaki K., Avai Y., Kawase M., He F., Hosoda M et Hosono A, 1998. Effet of lactic acid bacteria on serum cholesterol level in rats fed. Cholesterol diet. *Amin Sci Technol*, **69**, 702 - 707.
44. Hashimoto H., Yamazaki K., He F., Avai Y., kawase M., Hosoda M et Hosono A, 1999. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus casei subsp. casei* TMC 0409 Strain observed in rats fed cholesterol contained diets. *Anim Scib J*, **72**, 90 - 97.
45. Hurst A, 1983. Nisine its preservative effect and function in the growth cycle of the producer organism in SKINER and QUESNEL. *Streptococci*, *Accademic Press (London)*, 297 - 314.
46. Idoui T, 1999. Les bactéries lactiques indigènes. Intérêts technologiques et nutritionnels, 71-72.
47. Jean-Paul. Larpent, 1997. Mémento-technique de microbiologie. Micro-organismes eucaryotes et procaryotes. Structure. Métabolisme. Systématique. Application industrielles. Milieux de culture et réactifs. *Technique et documentation. 3^{ème} édition*, 551- 555.
48. Jones R. T, 1975. Normal values for some biochemical constituents in rabbits. *Lab Anim, Apr*, **9(2)**, 7- 143.

49. **Jimenez-Diaz R., Rios-Sanchez R.M., Desmazeaud M., Ruiz-Barba J.L et Piard J.C**, 1993. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1416-1424.
50. **Jin L.Z , Ho Y . W , Abdullah N et Jalaludin S** , 1998 . Growth performance , intestinal microbial population and serum cholesterol of broiler fed diets containing *lactobacillus* culture . *Poult . Sci* , **77** , 1259 – 1265 .
51. **Juillard V., Spinnerh.E., Desmazeaud M.J et Boquien. G.Y**, 1987. Phénomènes de coopération et inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière . *Le lait* **67(2)**, 149-172.
52. **Kacen M ., Zadi – Karam H et Karon N .E** , 2005 . Detection and activity of plantaricin OL15 a bacteriocin produces by *lactobacillus palantarum* OL15 isolated from Algerian fermented olives . *Grasas Y Aceites* , **56 (3)** , 192 – 197 .
53. **Kaplan**, 1984 . Triglycérides and lipids. *Clin chem the Mosbyco. CV., Louis. ST. Toronto Princeton* , **437**, 1194-1206.
54. **Klanhammer T.R**, 1988 . Bactériocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* , **70**, 337-349.
55. **Kozara S**, 1986. Le probiotiques pour demain. *Revue de l'alimentation animal N°397*, 38-39.
56. **Larpent J.P**, 1987. Biotechnologie et industrie laitière. *Apria Annales colloque* . 1-150.
57. **Larpent J.L**, 1995. Les probiotiques en alimentation animal et humaine, *Tech et doc*, 114-120.
58. **Laurent Sutra., Michel Federighis et Jean- Louis Jouve** , 1998 . Manuel de bactériologie alimentaire. *Pyotechnica*, 15, rue lacépède – 75005, paris, ISBN , 2-84054-056-8 , 236-239.
59. **Lenoir J., Hermier J et Webert F**, 1992. Les groupes microbiens d'intérêts laitier. *CIPI2*, 5-50.
60. **Leveau J.Y et Bouix. M**, 1993 . Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intéret industrielle. *Tech et Doc. Lavoisier*, 170-248-513-557.
61. **Louisot P**, 1983. Biochimie générale et médicale.
62. **Marciset O., Jeronymus-Stratingh M.C., Mollet B et Poolman B**, 1997. *thermophilin St-13*, a montypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor . *J.Biol.chem*, **272**, 14277-14284.

63. **Matilla-Sandholm T., Myllarinen P., Grittenden R., Mogensen G., Fonden. R et Saorela M** ,2002.Technological challenges for future probiotic foods.*Int .Dairy.J*,12, 173-182.
64. **Meittini F** , 1978 . The 4-hydroxybenzoate/4 aminophenazone chromogenic system .*Clin chem*;24(12), 2161-2165.
65. **Michel Guilloton et Bernnadette Quintard** ,1996. *Biochimie.Tech. Doc.Lavoisier paris . ISBN 2 10 0048287 ,60-67.*
66. **Modler H.W., Keller R.C et Yaguchi M** , 1990 . Bifidobactéria and bifidogenic factors .*can.inst.foodsc.technol.J*,23, 29-41.
67. **Morir**,2002.La petite rousse de médecine14-30.
68. **Naito H.K et Kaplan A** ,1984.Cholesterol. *Clin chem the C.V.MOSBY.CO.ST Louis.Toronto* ,437-1194-11206 .
69. **Oxford A.E** , 1994 . *Biochemical Journal* .38,178.
70. **Pascal M.**,2000 .cholesterol in encyclopedie universalis.160-166.
71. **Piard J.C et Desmazeaud M** , 1991. Inhibiting factor produced by lactic acid bacteria.oxygène metabolites and catabolism and products .*Le lait*,71, 41-525.
72. **Piard J.C.,Delorme F .,Giraffa .,Commissaire J, et Dasmazeaus M** , 1990. Evidence for a bacterain produced by *Lactococcus Lactis* CNRZ 481.*Neth.Milk Dairy J*.44,143-158.
73. **Pilet C.H., Bourdon J.L., Toma B., Marchal N et Balbastre C** , 1979. Bactériologie médicale et vétérinaire . Systémique bactérienne. 2^{ème} édition. *Doin. Paris*, 243.245.
74. **Plummer S., Wever M.A., Dee P et Hunter J**,2004 . Clostridium difficile pilot study. Effects of probiotic supplementation on the incidence of *C.difficile* diarrhea.*Int.microbial*,7, 59-62.
75. **Prescott L.M., Harley J.P et Klein D.A**,2003. Microbiologie.2^{ème} édition française, *de boeck* , 550-703.
76. **Pucci M.J., Vedamuthu E.r ., Kinka B. S et Vanderbergh P.A** , 1998 . Inhibition of *listeria. monocytogens* by using bacteriocin PA -1 produced by *pediococcus acidilactici* . *Appl .Environ .Microbiol* , 4 , 2349 – 2353 .
77. **Ratnam P** , 1999. Purification partielle du bactériocine produit par *Propionibacterium Jensenii* B 1264.*Lait* ,79, 125-136.
78. **Retter B et Harnvuld G** , 1984. Lactoperoxidase antibacterial system, natural occurrence, biological functions , and practical applications . *J. Food Prot* , 47, 724-732.

79. **Richard D., Anselm B., Bueher J.C., Chaffard J., Mereaux J., Perilleux et Val**, 1998. Physiologie des animaux. Construction des organismes homéostasie et fonction des relation. TomeII. édition *NATHAN*. Paris, 273-274.
80. **Rodier D**, 2004. l'intestin. Prodige d'adaptation de coopération gastroentérologi, D^R Joun, 1-6.
81. **Salminen S., Ouwehand A.C., Benno Y et Lee Y.K**, 1999. Probiotics : how should they be defined ?. *Trends food sci. techno*, 1, 107-110.
82. **Sebaoun A**, 1998. le cardiologue. N°8-10, 21-24, 26-34.
83. **Serott et Torcatissn**, 1990. Mise en évidence et purification partielle de substance antibactérienne produites par *Leuconostoc. Mesenteroide* et *Lb. plantarum* isolés de grains de kefir, 177-184.
84. **Tagg J.R., Dajani A.S et Wannamaker L.W**, 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacterial. rev*, 40, 722-756.
85. **Tagg J.R et Mc Given A.R**, 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl Microbial*, 29, 1576-1582.
86. **Tannock G.W**, 1997. Probiotic properties of lactic acid bacteria plenty of scope for fundamental R & D. *trend biotechnol*, 15, 270-274.
87. **Terzaghi B.E et Sandine W.E**, 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. microbial*, 29, 807-810.
88. **Turpin G., Bruckert E., Fossati P et paillard F**. 1998. A thenosclérose Physiopathologie. etude de prevention par les traitemants hypolipidimiants *Ed. Paris* N°283-285.
89. **Vandenbergh P.A**, 1993. lactic acid bacteria. their metabolic product and interference with microbial growth *F.E.M.S Microbiol. Rev*, 12-221-238
90. **Villani. F., Pepe O., Mauriello G., Sazano G., Moschetti G et Coppola S**, 1995. antilisterial activity of *thermophilin 347*, a bacteriocin produced by *streptococcus thermophilins*. *Int. J. Food microbial*, 25, 179-190.
91. **Wolter R et Henry N**, 1982. Les probiotiques en alimentation animal. *Eds. Colex*, 283-284.
92. **Yang R., Johnsn M.C et Bay B**, 1992. Novel method to extract large amounts of bactériocins from lactic acid bacteria. *Appl environ microbial*, 10, 3355-3359.
93. **Ziegler O**, 2001. Hypertriglycémie et risque vasculaire .2-20.

ANNEXE

MRS :

- Peptone10g .
- Extrait de viande10g .
- Extrait de levure5g .
- Glucose20 g.
- Tween 80 (polyforbate 80).....1ml.
- Phosphate dipotassique.....2g
- Acétate de sodium.....5g
- Citrate d'ammonium2g
- Sulfate de magnésium200mg
- Sulfate de manganèse.....50mg
- P^H 6.5
- Autoclave 15 mn a 120 C° pour MRS gélose on ajoute 12g d'agar- agar

M₁₇

- Peptone de soja.....5g.
- Peptone de viande.....2.5g.
- Peptone de caseine.....2.5g.
- Extrait de levure.....2.5g.
- Extrait de viande.....5g.
- Lactose5g.
- Acide ascorbique.....0.5g.
- Glycérophosphate de sodium.....0.5g.
- Sulfate de magnésium.....19g.
- Agar-agar.....0.25g.
- P^H 7.1 → 7.2.
- Autoclave 20 min a 120 C° .

Résumé

Les résultats relatifs à la caractérisation de bactériocines produites par quelques souches lactiques sélectionnées ont montré que l'acide lactique et l' H_2O_2 ne sont pas les seules à agir sur les bactéries testées mais d'autres substances de nature protéique le sont aussi.

La purification partielle des bactériocines a montré qu'elles sont de nature protéique, thermorésistantes et qu'elles ont probablement un faible poids moléculaire.

L'étude de l'évaluation de l'effet de *L. plantarum* et *P. acidilactici* sur la glycémie et les lipides sanguins ont montré ce que les probiotiques n'affectent pas la glycémie mais ils ont un effet significatif sur les HDL-C uniquement. Et une nette influence sur le cholestérol, T.G et les LDL-C.

Mots clefs :

Bactériocines, probiotique, paramètres plasmatiques.

Abstract

The relative results to the characterization of bacteriocins produced by selected some lactic stumps showed that the lactic acid and H_2O_2 are not the alone to act on bacteria test but other substances of nature protéic are it also.

The partial purification of bacteriocineses showed that they are nature protéic, thermorésistantes and that they probably have a weak molecular weight.

The survey of the assessment of the *L. plantarum* effect and *P. acidilactici* on the glycémie and the blood lipids showed what probiotic don't affect the glycémie but a meaningful effect on the HDL-C solely. And a clean influence on cholesterol, T.G and the LDL-C.

Keys word:

Bacteriocins, probiotic, plasmatic parameters.

الملخص

النتائج المتعلقة بتخصيص ميثقات البكتيريا المنتجة من طرف بعض سلالات بكتيريا اللاكتيك المنتجة تظهر بان حمض اللاكتيك و ال H_2O_2 ليست لوحدها المتفاعلة على البكتيريا المختبرة ، و لكن أيضا مواد أخرى ذات طبيعة بروتينية .
الإنتقاء الجزئي لميثقات البكتيريا يظهر أنها ذات طبيعة بروتينية ، مقاومة للحرارة و محتمل أنها ذات وزن جزيئي ضئيل.

دراسة تطور تأثير بكتيريا *L. plantarum* و *P. acidilactici* على معدل السكر في الدم و الدهون الدموية ، تظهر بان البروبيوتيك لا تؤثر على معدل السكر في الدم و لكن لها تأثير معتبر على HDL-C لوجوده ، و تأثير ضعيف على الكوليسترول ، ثلاثي الغليسريد و ال LDL-C .

المصطلحات :

ميثقات البكتيريا ، البروبيوتيك ، العوامل البلازمية .