



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET  
POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE  
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ HASSIBA BENBOUALI CHLEF  
FACULTÉ DES SCIENCES AGRONOMIQUES ET DES SCIENCES  
BIOLOGIQUES

## *Mémoire*

*En vue de l'obtention du **diplôme de magister** en biologie  
Option : **Sciences Alimentaires***

*Effet antagoniste de **Lactococcus lactis**, souches  
extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale  
résidente*

*Présenté par : Metlef Sarra*

*Devant le jury d'examen :*

<i>M<sup>me</sup> : Allem R.</i>	<i>Présidente</i>	<i>M. C., UHB Chlef</i>
<i>M<sup>r</sup> : Dilmi-Bouras A.</i>	<i>Promoteur</i>	<i>Pr., UHB chlef</i>
<i>M<sup>r</sup> : Riazi A.</i>	<i>Examineur</i>	<i>M. C., Université de Mostaganem</i>
<i>M<sup>r</sup> : Bensaid A.</i>	<i>Examineur</i>	<i>M. C., UHB Chlef</i>

*Année universitaire : 2007-2008*

# Dédicaces

*Je dédie le fruit de mes 21 bougies d'études aux plus précieux des trésors :  
Mes parents : mon cher papa et ma tendre maman*

*Qui m'ont appris tout ce que je sais  
Qui m'ont guidé vers le tunnel éclairé du savoir  
Qui m'ont nourri d'amour, enveloppé de confort*

*Mon cher frère : Farouk que dieu le garde.  
Mes très chères soeurs : Assia et son fiancé Abdellah, Imen, et la petite  
Ikram.*

*Mon plus profond respect va tout droit à mon professeur et promoteur  
Mr Dilmi Bouras A. et sa famille.*

*A mes très chères amies : Fatima, Nabila, Ahlem et Faiza.  
A mes amies de la post graduation : promotion 2005/2006.  
A mes étudiants (es) de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> année LMD.*

*A tous mes professeurs dans tous les cycles de  
ma scolarité qui m'ont éclairé la voie du  
savoir.*

*Sarah*

# Remerciements

*Avant tout, je tiens à remercier DIEU, tout puissant, qui m'a donné la force, la santé, la patience et la volonté pour la réalisation de ce travail ;*

*Puis je tiens à adresser, mes profondes gratitude et mes vifs remerciements à toutes les personnes qui m'ont apporté leurs aides et leur soutien :*

*En particulier, Mr. Dilmi – Bouras A., Professeur et doyen de la faculté des sciences agronomiques et biologiques, UHB Chlef, pour son aide, ses conseils, sa disponibilité, son soutien moral et sa sympathie et surtout pour la confiance qu'il m'a témoigné tout au long de la réalisation de ce travail.*

*Mes vifs remerciements et sincères gratitude vont aussi aux membres de jury :*

*M<sup>me</sup> Allem R., maître de conférences à l'UHB Chlef, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury et pour avoir bien voulu lire ce mémoire et faire part de ses remarques.*

*Mr Riazi A., maître de conférences à l'université de Mostaganem, d'avoir accepté d'examiner et juger ce travail.*

*Mr Bensaid A., maître de conférences à l'UHB Chlef, d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Mes remerciements vont également :*

*A Mr Zemouri A., responsable de la post graduation et M<sup>me</sup> hadj Ben Ali F. pour m'avoir faciliter les taches administratives.*

*A l'ensemble du personnel administratif de la faculté des sciences agronomiques et biologiques de l'UHB chlef, spécialement : Mr Taherti M., Mr Bouthiba A., Mr Amzert D. et M<sup>elle</sup> Bouthiba F.*

*A M<sup>me</sup> Tabti M., M<sup>me</sup> Riati S., Mr Hadj Mahdi M., M<sup>elle</sup> Gadouche A. et M<sup>elle</sup> Mekref S., ingénieurs aux laboratoires de la faculté des sciences agronomiques et biologiques de l'UHB chlef, qui ont mis à ma disponibilité les laboratoires et le matériel.*

*A Mr Rata M. Etudiant en post graduation « spécialité écologie » qui m'a aidé dans l'étude statistique.*

*A mes enseignants de la faculté des sciences agronomiques et biologiques de l'UHB chlef qui trouvent entre ces lignes mes sentiments les plus distingués.*

*Je tiens à remercier aussi :*

*Le personnel de laboratoire d'hygiène de la wilaya de chlef et à leur tête Mr Rouem qui m'a facilité l'accès au laboratoire et l'utilisation de son matériel.*

*Mr boukhatem responsable au laboratoire d' El chiffaa de chlef pour ses conseils de valeurs.*

*Enfin, je n'oublie pas de dire merci à ma famille car sans eux ce travail n'aurait pas vu le jour.*

## Table des matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des annexes	
Introduction .....	01

### CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE

<b>I. GENERALITES SUR LES BACTERIES LACTIQUES</b> .....	03
<b>II. LES LACTOCOQUES</b> .....	04
1. Caractères morphologiques, écologiques et physiologiques.....	05
2. Habitat des lactocoques .....	05
3. Classification et nomenclature .....	05
4. Caractères biochimiques et nutritionnels des lactocoques .....	06
4.1. Métabolisme des sucres .....	06
4.2. Métabolisme des protéines.....	08
4.3. Métabolisme des citrates .....	10
4.4. Métabolisme des lipides et estérolyse .....	12
5. Les exigences de <i>Lactococcus lactis</i> .....	12
5.1. En minéraux .....	12
5.2. En acides aminés, vitamines et acides organiques .....	12
6. Génétique de <i>Lactococcus lactis</i> .....	13
6.1. Les plasmides.....	13
6.2. Les bactériophages lactiques .....	13
7. Activité antimicrobienne des lactocoques.....	14
7.1. Action des acides organiques.....	14
7.2. Action de diacétyle .....	14
7.3. Action des bactériocines .....	14
7.3.1. Définition .....	14
7.3.2. Classement des bactériocines .....	15
7.3.3. Caractéristiques des bactériocines.....	16
7.3.4. Mode d'action des bactériocines .....	17
7.3.5. Utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire .....	17
<b>III. BARRIERES PHYSIOLOGIQUES DU TRACTUS GASTRO-INTESTINAL HUMAIN</b> .....	18
1. Le tractus gastro-intestinal.....	18
2. Barrières physiologiques du tractus gastro-intestinal .....	19

2.1. Le suc gastrique.....	19
2.1.1. L'acide chlorhydrique (HCl) .....	19
2.1.2. Le mucus .....	19
2.1.3. Les pepsinogènes .....	19
2.1.4. Facteurs intrinsèques .....	19
2.2. Les sels biliaires .....	19
2.3. Le microbiote intestinal .....	20
2.3.1. Facteurs majeurs influençant la microflore gastro-intestinale .....	20
2.3.2. Répartition topographique de la flore digestive.....	21
2.3.3. Diversité du microbiote intestinal du colon .....	23
2.3.4. Etablissement du microbiote intestinal.....	27
2.3.5. Rôle de la flore intestinale .....	27
<b>IV. PROBIOTIQUES ET MICROFLORE INTESTINALE .....</b>	<b>28</b>
1. Définition des probiotiques .....	28
2. Démarches générales de sélection des probiotiques .....	29
3. Classement des probiotiques .....	30
4. Effets des probiotiques sur la santé humaine.....	31
4.1. Sur le tractus gastro-intestinal .....	31
4.1.1. Protection contre les maladies inflammatoires du tube digestif .....	31
4.1.2. Les probiotiques et les infections gastro-intestinales .....	32
4.1.3. Les probiotiques et la prévention du cancer du colon .....	32
4.1.4. Les probiotiques et les maladies inflammatoires de l'intestin .....	32
4.1.5. Les probiotiques et la perméabilité intestinale .....	32
4.1.6. Les probiotiques et la motilité de l'intestin .....	33
4.2. Autres effets .....	33

## **CHAPITRE II : MATERIEL & METHODES**

<b><u>Partie 1: ETUDE DE LA SURVIE DES LACTOCOQUES DANS LES CONDITIONS EXTREMES DU TUBE DIGESTIF .....</u></b>	<b>34</b>
1. Matériel.....	34
1.1. Matériel biologique.....	34
1.2. Milieux de culture .....	35
1.3. Produits et réactifs.....	36
1.4. Appareillage .....	36
2. Méthodes.....	36
2.1. Repiquage, revivification et vérification de la pureté des souches bactériennes.....	36
2.2. Étude du pouvoir acidifiant des souches lactiques pures .....	38

2.3. Étude de la survie des souches pures dans les conditions extrêmes du tube digestif .....	38
2.4. Survie des espèces bactériennes extrémophiles en présence de la flore intestinale .....	39
2.5. Étude du pouvoir acidifiant et de la survie des associations bactériennes.... ..	39
<b>Partie 2: ISOLEMENT, IDENTIFICATION ET DENOMBREMENT DES ESPECES DE LA FLORE INTESTINALE RESIDENTE .....</b>	<b>39</b>
1. Matériel.....	39
1.1. Matériel biologique .....	39
1.2. Milieux de culture.....	40
1.3. Produits et réactifs.....	40
2. Méthodes .....	40
2.1. Isolement, identification et dénombrement des espèces intestinales aérobies et aéro-anaérobies facultatifs.....	41
2.1.1. <i>E. coli</i> et <i>Enterococcus spp.</i> .....	41
2.1.2. <i>Lactobacillus spp.</i> .....	44
2.3. Isolement, identification et dénombrement des espèces anaérobies strictes .....	45
2.3.1. Les Bifidobacteries .....	45
2.3.2. Isolement, identification et dénombrement de <i>Clostridium spp</i> .....	47
2.3.3. Isolement, identification et dénombrement de <i>Bacteroides spp.</i> .....	49
<b>Partie 3 : ETUDE DE L'INTERACTION DE LACTOCOCCUS LACTIS SSP ET DES ESPECES ISOLEES DE LA FLORE INTESTINALE RESIDENTE .....</b>	<b>50</b>
1. Matériels .....	50
1.1. Matériels biologiques .....	50
1.2. Milieux de culture .....	50
1.3. Autres matériels .....	50
2. Méthodes .....	50
2.1. Préparation des pré – cultures.....	50
2.2. Méthode de disque ou porte germe .....	51
2.3. Localisation de la substance inhibitrice .....	52
2.4. Identification des substances responsables de l'interaction .....	52
2.4.1. Préparation de la préculture bactérienne .....	52
2.4.2. Préparation de la culture proprement dite .....	53
2.4.3. Elimination de l'effet de l'acide lactique .....	53
2.4.4. Élimination de l'effet des bactériocines .....	53
2.5. Effet des conditions du tube digestif sur l'action des bactériocines .....	55
2.5.1. Effet du pH .....	55
2.5.2. Effet des enzymes digestives .....	55
2.6. Détermination de la charge des espèces intestinales après l'interaction par la méthode de culture mixte (co-culture) .....	55

Validation statistique des résultats.....	55
-------------------------------------------	----

### CHAPITRE III : RESULTATS & DISCUSSIONS

<b>Partie 1 : ETUDE, <i>IN VITRO</i>, DE LA SURVIE DES LACTOCOQUES DANS DES CONDITIONS EXTREMES DU TUBE DIGESTIF</b> .....	56
1. Revivification et vérification de la pureté des souches lactiques .....	56
2. Pouvoir acidifiant des souches lactiques .....	57
3. Survie, <i>in vitro</i> , des souches lactiques pures à différents pH en absence et en présence de sels biliaires et de la flore intestinale .....	59
3.1. Survie des souches lactiques pures à pH 2,5 .....	60
3.2. Survie des souches lactiques pures à pH 4,3 .....	61
3.3. Survie des souches lactiques pures à pH 6,5 .....	63
4. Pouvoir acidifiant des associations bactériennes .....	69
5. Survie, <i>in vitro</i> , des associations bactériennes à différents pH en absence et présence de sels biliaires et de flore intestinale .....	71
5.1. Survie des combinaisons bactériennes à pH 2,5 .....	71
5.2. Survie des associations bactériennes à pH 4,3 .....	72
5.3. Survie des associations bactériennes à pH 6,5 .....	74
<b>Partie 2 : ISOLEMENT, IDENTIFICATION ET DENOMBREMENT DES ESPECES DE LA FLORE INTESTINALE</b> .....	79
1. Isolement des espèces aérobies et aéroanaérobies facultatives .....	79
1.1. <i>E. coli</i> .....	79
1.2. <i>Enterococcus ssp</i> .....	80
1.3. <i>Lactobacillus ssp</i> .....	81
2. Isolement des espèces anaérobies strictes .....	82
2.1. Bifidobactéries .....	82
2.2. <i>Bacteroides ssp</i> .....	83
2.3. <i>Clostridium ssp</i> .....	84
<b>Partie 3 : ETUDE DE L'EFFET ANTAGONISTE DE <i>LACTOCOCCUS LACTIS SSP</i> EXTREMOPHILES VIS-A-VIS DES ESPECES DE LA FLORE INTESTINALE</b> .....	86
1. Activité antagoniste des souches extrémophiles de <i>Lactococcus lactis</i> vis-à-vis des espèces intestinales .....	86
1.1. Vis-à-vis d' <i>E. coli</i> .....	86
1.2. Vis-à-vis d' <i>Enterococcus ssp</i> .....	88
1.3. Vis-à-vis de <i>Clostridium ssp</i> .....	89
1.4. Vis-à-vis de <i>Bacteroides ssp.</i> .....	90
1.5. Vis-à-vis de Bifidobacteries et <i>Lactobacillus</i> .....	91

2. Localisation des substances inhibitrices .....	93
3. Effet de l'acide lactique .....	95
4. Effet des bactériocines.....	96
5. Etude de l'influence des barrières physiologiques du tube digestif sur l'action des bactériocines.....	98
5.1. Action du pH .....	98
5.2. Action des enzymes digestives .....	99
6. Détermination du pourcentage d'inhibition par les bactériocines .....	99
7. Détermination de la charge des espèces intestinales après l'interaction.....	100
<b>Conclusion</b> .....	103
<b>Références bibliographiques</b> .....	105
<b>Annexes</b> .....	123
<b>Abstract</b>	
<b>Résumé</b>	

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01 :</b>	Classification des bactéries lactiques (Fliss et <i>al.</i> , 2001).....	04
<b>Tableau 02 :</b>	Importance des minéraux dans le métabolisme des lactocoques (Leveau et Bouix, 1993) .....	12
<b>Tableau 03 :</b>	les principaux facteurs influençant la composition et la fonction de la microflore intestinale (Holzapfel et <i>al.</i> ,1998) .....	21
<b>Tableau 04 :</b>	Composition du microbiote intestinal .....	24
<b>Tableau 05 :</b>	Microorganismes employés comme probiotiques chez l'homme et chez les animaux d'élevage (Dacosta, 2001).....	31
<b>Tableau 06 :</b>	Les souches bactériennes utilisées dans l'étude .....	35
<b>Tableau 07 :</b>	Tests biochimiques réalisés pour vérifier la pureté des souches .....	37
<b>Tableau 08 :</b>	Espèces recherchées dans les selles .....	41
<b>Tableau 09 :</b>	Les caractères biochimiques étudiés par les galeries API 20 E .....	43
<b>Tableau 10 :</b>	Caractères d'identification des Lactobacilles .....	44
<b>Tableau 11 :</b>	Tests d'identification des Bifidobactéries .....	45
<b>Tableau 12 :</b>	Tests biochimiques caractéristiques de <i>Clostridium ssp.</i> .....	47
<b>Tableau 13 :</b>	Les souches cibles et leurs bouillons de croissances .....	51
<b>Tableau 14 :</b>	Résultats de l'identification biochimique d' <i>E.coli</i> (par les galeries API 20 E). .....	79
<b>Tableau 15 :</b>	Résultats de l'identification biochimique d' <i>Enterococcus ssp</i> (par les galeries API 20 E) .....	80
<b>Tableau 16 :</b>	Résultats de l'étude des caractères cultureux, morphologiques et biochimiques des colonies obtenues .....	81
<b>Tableau 17 :</b>	Résultats des tests d'identification du genre Bifidobacterium .....	82
<b>Tableau 18 :</b>	Résultats des tests d'identification du <i>Bacteroides ssp.</i> .....	83
<b>Tableau 19 :</b>	Résultats des tests d'identification du <i>Clostridium ssp.</i> .....	84
<b>Tableau 20 :</b>	Diamètre des zones d'inhibitions (en mm) causées par les extraits cellulaires (culots) et les fractions extracellulaires (surnageants).....	93
<b>Tableau 21 :</b>	Diamètres d'inhibition trouvés par l'utilisation de l'acide lactique (en mm)... ..	95
<b>Tableau 22 :</b>	Diamètres des zones d'inhibitions (mm) provoquées par les bactériocines des souches lactiques vis-à-vis des espèces intestinales.....	96

## Liste des figures

<b>Figure 01 :</b>	Métabolisme du lactose, galactose et glucose chez <i>Lc. lactis</i> sp et enzymes Impliquées dans la voie métabolique centrale (Cocaign- Bousquet et <i>al.</i> ,2002).....	07
<b>Figure 02 :</b>	Catabolisme des acides aminés par <i>Lc. lactis</i> sp (Grattepanche, 2005).....	09
<b>Figure 03 :</b>	Métabolisme du citrate conduisant à la formation du diacétyle (Grattepanche, 2005).....	11
<b>Figure 04 :</b>	Les microflores des différents compartiments de l'appareil digestif de l'homme (Ouwehand et Vesterlund, 2003) .....	22
<b>Figure 05 :</b>	Vue générale sur la microflore du colon humain( Gibson et Roberfroid, 1995).....	26
<b>Figure 06 :</b>	Diagramme d'étude de l'interaction selon la méthode de porte germes .....	52
<b>Figure 07 :</b>	Diagramme d'étude de l'interaction après l'élimination de l'effet de l'acide lactique .....	54
<b>Figure 08 :</b>	Diagramme d'étude de l'interaction après l'élimination de l'effet des bactériocines .....	54
<b>Figure 09 :</b>	<i>Lactococcus lactis</i> pure sur boîte de pétri .....	56
<b>Figure 10 :</b>	Evolution de l'acidité Dornic à 30°C, en fonction du temps, des cultures pures de <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> .....	58
<b>Figure 11 :</b>	Evolution de l'acidité Dornic à 30°C, en fonction du temps, des cultures pures de <i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i> et <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> .....	58
<b>Figure 12 :</b>	Evolution de quelques souches de <i>Lactococcus lactis</i> à pH 2,5 en absence de sels biliaires .....	60
<b>Figure 13 :</b>	Evolution de quelques souches de <i>Lactococcus lactis</i> à pH 2,5 en présence de 0,3 % de sels biliaires .....	61
<b>Figure 14 :</b>	Evolution de quelques souches de <i>Lactococcus lactis</i> à pH 4,3 en absence de sels biliaires .....	62
<b>Figure 15 :</b>	Evolution de quelques souches de <i>Lactococcus lactis</i> à pH 4,3 en présence de 0,3 % de sels biliaires .....	63
<b>Figure 16 :</b>	Evolution de quelques souches de <i>Lactococcus lactis</i> à pH 6,5 en absence de sels biliaires .....	64
<b>Figure 17 :</b>	Evolution de quelques souches de <i>Lactococcus lactis</i> à pH 6,5 en présence de 0,3 % de sels biliaires .....	65
<b>Figure 18 :</b>	Evolution de quelques souches de <i>Lactococcus lactis</i> à pH 6,5 en présence de 3 % d'une flore intestinale standard .....	66
<b>Figure 19 :</b>	Evolution de l'acidité Dornic à 30°C, en fonction du temps, des associations bactériennes testées .....	70
<b>Figure 20 :</b>	Evolution de différentes associations bactériennes à pH 2,5 en absence de sels biliaires .....	71

<b>Figure 21 :</b>	Evolution de différentes associations bactériennes à pH 2,5 et en présence de 0,3% de sels biliaires .....	72
<b>Figure 22 :</b>	Evolution de différentes associations bactériennes à pH 4,3 en absence de sels biliaires .....	73
<b>Figure 23 :</b>	Evolution de différentes associations bactériennes à pH 4,3 en présence de 0,3% de sels biliaires .....	74
<b>Figure 24 :</b>	Evolution de différentes associations bactériennes à pH 6,5 en absence de sels biliaires .....	75
<b>Figure 25 :</b>	Evolution de différentes associations bactériennes à pH 6,5 en présence de 0,3% de sels biliaires .....	76
<b>Figure 26 :</b>	Evolution de différentes associations bactériennes à pH 6,5 en présence de 3% d'une flore intestinale standard.....	77
<b>Figure 27</b>	Répartition des espèces de la flore intestinale dans les selles .....	85
<b>Figure 28</b>	Activité inhibitrice de <i>Lc .l<sub>3</sub></i> , <i>Lc .l<sub>9</sub></i> et <i>Lc .l<sub>13</sub></i> sur d' <i>E. coli</i> .....	87
<b>Figure 29 :</b>	Activité inhibitrice de <i>Lc .l<sub>7</sub></i> , <i>Lc .d<sub>1</sub></i> et <i>Lc .c<sub>3</sub></i> sur d' <i>E. coli</i> .....	87
<b>Figure 30 :</b>	Activité inhibitrice des combinaisons A3, A4 et A5 sur d' <i>E. coli</i> .....	87
<b>Figure 31 :</b>	Activité inhibitrice de, <i>Lc .l<sub>9</sub></i> , <i>Lc .l<sub>12</sub></i> et <i>Lc .l<sub>13</sub></i> sur <i>Enterococcus ssp</i> .....	88
<b>Figure 32 :</b>	Activité inhibitrice de, <i>Lc .d<sub>1</sub></i> , <i>Lc .d<sub>4</sub></i> et <i>Lc c<sub>2</sub></i> sur <i>Enterococcus ssp</i> .....	88
<b>Figure 33 :</b>	Activité inhibitrice des combinaisons A1, A3 et A4 sur <i>Enterococcus ssp</i> .....	88
<b>Figure 34 :</b>	Activité inhibitrice de <i>Lc .l<sub>9</sub></i> , <i>Lc .d<sub>1</sub></i> et <i>Lc .c<sub>3</sub></i> sur de <i>Clostridium ssp</i> .....	88
<b>Figure 35 :</b>	Activité inhibitrice de, <i>Lc .l<sub>7</sub></i> , <i>Lc .l<sub>12</sub></i> et <i>Lc .l<sub>13</sub></i> sur de <i>Clostridium ssp</i> .....	88
<b>Figure 36 :</b>	Activité inhibitrice des combinaisons A1, A3 et A4 sur de <i>Clostridium ssp</i> .....	90
<b>Figure 37 :</b>	Activité inhibitrice de <i>Lc .l<sub>9</sub></i> , <i>Lc .d<sub>1</sub></i> et <i>Lc .c<sub>3</sub></i> sur de <i>Bacteroides ssp</i> .....	90
<b>Figure 38 :</b>	Activité inhibitrice de, <i>Lc .l<sub>3</sub></i> , <i>Lc .l<sub>5</sub></i> et <i>Lc .l<sub>11</sub></i> sur <i>Bacteroides ssp</i> .....	90
<b>Figure 39 :</b>	Activité inhibitrice des combinaisons A1, A2 et A4 sur <i>Bacteroides ssp</i> .....	91
<b>Figure 40 :</b>	Activité inhibitrice de, <i>Lc .l<sub>3</sub></i> , <i>Lc .l<sub>7</sub></i> et <i>Lc .d<sub>1</sub></i> sur <i>Bifidobacterium ssp</i> .....	92
<b>Figure 41 :</b>	Activité inhibitrice de <i>Lc .l<sub>5</sub></i> , <i>Lc .l<sub>12</sub></i> et <i>Lc .d<sub>3</sub></i> sur <i>Lactobacillus ssp</i> .....	92
<b>Figure 42 :</b>	Activité inhibitrice des surnageants de <i>Lc .l<sub>5</sub></i> , <i>Lc .l<sub>7</sub></i> et <i>Lc .d<sub>1</sub></i> sur <i>Enterococcus ssp</i>	94
<b>Figure 43 :</b>	Activité inhibitrice des surnageants de <i>Lc .l<sub>7</sub></i> , <i>Lc .l<sub>13</sub></i> et <i>Lc .d<sub>1</sub></i> sur <i>Clostridium ssp</i> .....	94
<b>Figure 44 :</b>	Activité inhibitrice des surnageants de <i>Lc .l<sub>3</sub></i> , <i>Lc .l<sub>12</sub></i> et <i>Lc .d<sub>1</sub></i> sur <i>Bacteroides ssp</i>	94
<b>Figure 45 :</b>	Activité inhibitrice des surnageants de <i>Lc .l<sub>7</sub></i> , <i>Lc .l<sub>12</sub></i> et <i>Lc .d<sub>1</sub></i> sur <i>E.coli</i> .....	94
<b>Figure 46 :</b>	Effet du pH sur l'activité inhibitrice des bactériocines produites par la souche <i>Lc.l<sub>9</sub></i> vis-à-vis des espèces intestinales sensibles .....	98
<b>Figure 47 :</b>	Pourcentage d'inhibition Des souches intestinales par les bactériocines des souches lactiques extrémophiles .....	100
<b>Figure 48 :</b>	Evaluation du nombre des espèces intestinales et de la souche <i>Lc.l<sub>9</sub></i> après 192 h d'incubation.....	101

## Liste des abréviations

**A** : Association bactérienne

**ATP** : Adénosine tri phosphate

**D.O** : Densité optique

**FAO** : Organisation pour l'alimentation et l'agriculture

**Lc.l** : *Lactococcus lactis susp lactis*

**Lc.c** : *Lactococcus lactis subsp cremoris*

**Lc.d** : *Lactococcus lactis susp lactis* biovar *diacetylactis*

**Subsp** : Sous espèce

**UFC/ml** : Unité formant colonies par millilitre

**Zi** : Diamètre des zones d'inhibition

## Liste des annexes

### ANNEXE 1 : Composition des milieux de culture

<b>Tableau 01 :</b>	Composition du milieu M 17 (Terzaghi et Sandine, 1975 ).....	123
<b>Tableau 02 :</b>	Composition de la Gélose semi- solide VF : Milieu viande – Foie gélosé à 6 % (pour mille).....	123
<b>Tableau 03 :</b>	Composition du Lait de Sherman .....	123
<b>Tableau 04 :</b>	Composition du Lait tournesolé .....	123
<b>Tableau 05 :</b>	Composition du Milieu Gibson et Abd El Malek .....	124
<b>Tableau 06 :</b>	Composition du Milieu MRS (MAN ROGOSA et SHARP) .....	124
<b>Tableau 07 :</b>	Composition de la Gélose nutritive .....	124
<b>Tableau 08 :</b>	Composition du milieu Mueller – Hinton agar .....	125
<b>Tableau 09 :</b>	Composition du Milieu Slanetz et Bartley .....	125
<b>Tableau 10 :</b>	Composition du Milieu Hecktoen.....	125
<b>Tableau 11 :</b>	Composition du Bouillon nutritif .....	126
<b>Tableau 12 :</b>	Composition de la Gélose EMB (éosine méthyle bilié) .....	126
<b>Tableau 13 :</b>	Composition du Bouillon TSB (Tryptone Soja Broth) .....	126

### ANNEXE 2 : Résultats de la survie des souches pures et des associations bactériennes à différentes conditions expérimentales

<b>Tableau 01 :</b>	Evolution de l'acidité des souches lactiques pures en fonction du temps d'incubation .....	127
<b>Tableau 02 :</b>	Evolution de l'acidité des association bactériennes en fonction du temps d'incubation.....	128
<b>Tableau 03 :</b>	Survie des souches lactiques pure à pH 2,5 sans sels biliaries.....	129
<b>Tableau 04 :</b>	Survie des souches lactiques pure à pH 4,3 sans sels biliaries.. .....	130
<b>Tableau 05 :</b>	Survie des souches lactiques pure à pH 6,5 sans sels biliaries .....	131
<b>Tableau 06 :</b>	Survie des souches lactiques pure à pH 2,5 +0,3 % de sels biliaries.....	132
<b>Tableau 07 :</b>	Survie des souches lactiques pure à pH 4,3 +0,3 % de sels biliaries. ....	133
<b>Tableau 08 :</b>	Survie des souches lactiques pure à pH 6,5 + 0,3 % de sels biliaries.....	134
<b>Tableau 09 :</b>	Survie des souches lactiques pure à pH 6,5 + 3 % de flore intestinale.....	135
<b>Tableau 10 :</b>	Survie des associations bactériennes à pH 2,5 en absence de sels biliaries.....	136
<b>Tableau 11 :</b>	Survie des associations bactériennes à pH 2,5 en présence de 0,3 % de sels biliaries.....	136
<b>Tableau 12 :</b>	Survie des associations bactériennes à pH 4,3 en absence de sels biliaries.....	137

<b>Tableau 13 :</b>	Survie des associations bactériennes à pH 4,3 en présence de 0,3 % de sels biliaires.....	137
<b>Tableau 14:</b>	Survie des associations bactériennes à pH 6,5 en absence de sels biliaires.....	138
<b>Tableau 15:</b>	Survie des associations bactériennes à pH 6,5 en présence de 0,3 % de sels biliaires.....	138
<b>Tableau 16 :</b>	Survie des associations bactériennes à pH 6,5 en présence de 3 % de flore intestinale .....	139

### **ANNEXE 3 : Diamètres des zones d'inhibitions**

<b>Tableau 01 :</b>	Criblage des souches lactiques vis-à-vis des germes intestinales (moyenne de trois essais, diamètres d'inhibition en mm).....	140
<b>Tableau 02 :</b>	Germes obligatoires et passagers mis en évidence par une analyse de routine de la flore physiologique intestinale et valeurs de tolérance d'après les laboratoires d'analyse Réunis Kutter-Liners – Hastert, (2003).....	141
<b>Tableau 03 :</b>	Pourcentage d'inhibition par les bactériocines (%).....	142
<b>Tableau 04 :</b>	Diamètres d'inhibition des espèces intestinales à différents pH. ....	142
<b>Tableau 05 :</b>	Charges microbiennes des espèces intestinales après l'interaction.....	143

## Résumé

L'étude réalisée vise trois objectifs : sélection de souches de *Lactococcus lactis* locales extrêmophiles, isolement, identification et dénombrement de quelques espèces de la flore intestinale résidente humaine et l'étude de l'interaction entre les souches lactiques extrêmophiles et les espèces isolées de la flore intestinale.

L'étude de la survie de vingt souches de *Lactococcus lactis* pure et de dix associations bactériennes nous a permis de sélectionner treize souches pures et sept associations résistantes aux conditions extrêmes du tube digestif et qu'on les a qualifié d'extrêmophiles.

A partir de selles d'un enfant âgé de huit ans, on a pu isoler six espèces représentatives de la flore intestinale humaine (*E. coli*, *Enterococcus ssp.*, *Lactobacillus ssp.*, *Bifidobacterium ssp.*, *Clostridium ssp.* et *Bacteroides ssp.*).

Les espèces de *Lactococcus lactis* généralement et de *Lactococcus lactis ssp lactis* spécialement ont révélé une activité inhibitrice très importante à l'égard des bactéries Gram positif (*Clostridium ssp* et *Enterococcus ssp*), importante vis-à-vis des espèces Gram négatif (*E. coli* et *Bacteroides ssp*) et négligeable vis-à-vis de *Bifidobacterium ssp* et *Lactobacillus ssp*.

Les substances responsables de l'activité inhibitrice se localisent dans les fractions extracellulaires. L'acide lactique produit par les souches ne joue aucun effet antagoniste alors que des substances de nature protéique appelées bactériocines ont provoqué des zones d'inhibition importantes. Ces substances sont fortement sensibles aux variations du pH (un pH compris entre 5 et 7 semblerait optimum pour leur fonctionnement) et aux enzymes protéolytiques. Les pourcentages d'inhibitions les plus élevés sont trouvés vis-à-vis des bactéries gram positif, la souche *Lc.l<sub>9</sub>* a donné le meilleur pourcentage d'inhibition. Les bactériocines produites par *Lc.l<sub>9</sub>* ont exercé un effet transitoire sur les espèces intestinales. Le nombre de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* augmente avec le temps d'incubation même après la disparition de l'espèce lactique. Au contraire, une diminution remarquable de la charge bactérienne de *Clostridium ssp.*, *Enterococcus ssp.*, *E. coli* et *Bacteroides ssp.* a été remarqué au bout de 6 jours de contact avec les lactocoques mais ces valeurs reviennent aux taux normaux après 7 jours.

Les résultats obtenus montrent que les espèces de *Lactococcus lactis* survivent en harmonie avec les espèces banales de la flore intestinale (*Lactobacillus ssp.* et *Bifidobacterium ssp.*) tandis qu'elles limitent la propagation des souches qui peuvent menacer la santé de l'homme (spécialement *Clostridium ssp.* et *Bacteroides ssp.*), mais d'une façon transitoire.

**Mots clés** : Bactéries lactiques extrêmophiles, flore intestinale résidente, activité antagoniste, bactériocines.

## Abstract

The study of the survival of twenty pure stocks of *Lactococcus lactis* and ten bacterial associations enabled us to select thirteen pure stocks and seven associations resistant to the extreme conditions of the digestive tract and that they were qualified extremophyl.

From saddles of a eight years old child, we have isolate six species representative of the human intestinal flora (*E. coli*, *Enterococcus ssp.*, *Lactobacillus ssp*, *Bifidobacterium ssp*, *Clostridium ssp.* and *Bacteroides ssp*).

The substances responsible for the inhibiting activity are located in the extracellular fractions. The lactic acid produced by the stocks does not play any antagonistic effect whereas substances of proteinic nature called bactriocin caused zones of significant inhibition. These substances are strongly sensitive to the variations of the pH (a pH ranging between 5 and 7 would seem optimum for their function) and to the proteolytic enzyme.

The highest percentages of inhibition are found with respect to the gram positive bacteria, the stock *Lc.l*<sub>9</sub> gave the illor percentage of inhibition. The bacteriocins produced by *Lc.l*<sub>9</sub> exerted a transitory effect on the intestinal species. The number of Lactotobacillus and Bifidobacterium increases with the time of incubation even after the disappearance of the lactic species. On the contrary, a remarkable reduction in the bacterial load of *Clostridium ssp.*, *Enterococcus ssp.*, *E coli* and *Bacteroides ssp.* was noticed at the end of 6 but these values returns at the rates normals after 7 days.

The results obtained show that the species of *Lactococcus lactis* survived in harmony with the banal species of the intestinal flora (*Lactobacillus ssp.* and *Bifidobacterium ssp.*) while they limit the spread of the stocks which can threaten the health of the man (especially *Clostridium ssp.* and *Bacteroides ssp.*), but in a transitory way.

**Key words:** Lactic bacteria extrêmophiles, resident intestinal flora, antagonistic activity, bacteriocin.

### Introduction

L'homme à l'instar des animaux vit continuellement en association avec la population de microorganisme complexe habitant son tractus intestinal ; les investigations récentes ont mis en évidence le rôle crucial que joue la microflore intestinale dans le maintien et l'amélioration de la santé (Amrouche, 2005) ; cette microflore est fortement influencée par l'alimentation.

Les travaux de Metchnikoff, (1907) ont démontré que la consommation d'aliments fermentés permet de rétablir la flore intestinale en générant des effets bénéfiques sur la santé de l'homme. En effet, de nombreuses études ont rapporté les propriétés prophylactiques et thérapeutiques aux microorganismes dits « probiotiques » qui signifie littéralement « en faveur de la vie », contrairement aux antibiotiques signifiant « contre la vie », et qui se définit actuellement comme étant des microorganismes vivants, qui ingérés en quantité convenable, ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte en améliorant son équilibre intestinal. Les probiotiques sont principalement des levures et des bactéries lactiques (Moreau, 2001).

Parmi les bactéries lactiques probiotiques, le groupe de levains lactiques mésophiles, auxquels les lactocoques appartiennent, qui est le premier à avoir fait l'objet de sélection et de production pour l'industrie laitière. Les souches sont sélectionnées pour leur aptitude à acidifier le lait et former des arômes. Outre son application directe dans la constitution de la matrice fromagère et dans les caractéristiques rhéologiques et texturales des produits finis, *Lactococcus lactis* a pris une place dans un grand nombre d'études, car cette souche présente une innocuité et une capacité à produire des substances qui s'avèrent avoir une activité antagoniste impressionnante vis-à-vis d'autres espèces bactériennes.

Ces bactéries sont capables de produire des composés antibactériens, des peptides dénommés bactériocines doués d'une activité bactéricide ou bactériostatique à l'égard de plusieurs germes pathogènes, les bactériocines de *Lactococcus lactis* sont l'objet d'une attention toute particulière depuis plusieurs années en raison de l'intérêt tant fondamental qu'appliqué qu'elle suscitent (Daoudi, 2000).

De nombreuses études ont été réalisées sur les bactéries utilisées comme probiotiques dans le but de mieux maîtriser leur effets bénéfiques, mais on ne sait pratiquement que peu de leur devenir après ingestion et de leur mécanisme d'action (Lin et al, 2005) et la question qui se pose, est ce que les lactocoques qui traversent les barrières physiologiques et atteignent le colon sont métaboliquement active ?

Dans ce contexte s'inscrit notre étude dont les objectifs visés sont les suivants :

- ❖ Sélection, *in vitro*, de souches de *Lactococcus lactis* extrêmophiles (résistantes aux barrières physiologiques du tube digestif qui sont représentées par l'acidité corrosive de l'estomac, les sels biliaires et les espèces de la flore intestinale) ;
- ❖ Isolement, identification et dénombrement de quelques espèces représentatives de la flore intestinale résidente humaine ;
- ❖ Etude de l'activité antagoniste des souches lactiques extrêmophiles vis-à-vis des espèces intestinales isolées dont le but de la sélection de souches à caractère probiotique ont la capacité d'améliorer les effets bénéfiques de la flore intestinale;
- ❖ Etude des substances responsables de l'interaction.



## CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. GENERALITES SUR LES BACTERIES LACTIQUES

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio- organotrophes (Deroissart, 1986), Ces microorganismes sont caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique sous les deux formes lévogyre et dextrogyre, cette fermentation peut être homolactique (70 à 90% d'acide lactique) ou hétérolactique (50% d'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol et le CO<sub>2</sub>) (Leveau et Bouix, 1993).

Ils ont été isolés à partir de nombreux milieux naturels végétaux (plantes et fruits) ; animaux (le lait) et humains (cavité buccal, vaginale, les fèces.....) (Romeo et *al.*, 2001). Ce sont des cocci ou des bâtonnets à Gram positif, immobiles, asporogènes, non pigmentés, anaérobies mais aérotolérantes parce que certaines souches possèdent une pseudo catalase (Biavati et *al.*, 2000), elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux, elles sont exigeantes sur le plan nutritionnel, leur capacité de biosynthèse est faible ce qui explique leur polyauxotrophie pour divers acides aminés, bases nucléiques, acides gras, vitamines et sucres fermentescibles ( Novel, 1993).

La température optimale de croissance de ces souches bactériennes diffère selon les espèces, elle varie entre 28 et 45°C (Larpen, 2000).

La classification des bactéries lactiques a été le souci de plusieurs chercheurs qui les ont finalement classés, en se basant sur les techniques moléculaires, comme le montre le tableau suivant :

Tableau 1 : Classification des bactéries lactiques

différents genres	<i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
<b>Domaine</b>	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
<b>Phylum</b>	Fimicutes	Fimicutes	Fimicutes	Fimicutes
<b>Classe</b>	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli
<b>Ordre</b>	Lactobacillale	Lactobacillale	Lactobacillale	Lactobacillale
<b>Famille</b>	Streptococcaceae	Leuconostocaceae	Lactobacillaceae	Lactobacillaceae
<b>Genre</b>	Streptococcus	Leuconostoc	Pediococcus	Lactobacillus

*Source* : Novel (1993).

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage se répand en industrie laitière. Les bactéries lactiques sont utilisées pour la fermentation d'un grand nombre de produits d'origine animale ou végétale. Seuls les cinq genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont communément propagés dans les salles à ferments des industries laitières ou employés dans la fermentation lactique des produits laitiers (Champagne, 1998 ; Langella et al., 2001).

## II. LES LACTOCOQUES

Le genre **Lactococcus** correspond au groupe des streptocoques lactiques de Sherman (1937) dont la principale espèce est *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis* sp.).

Ils sont utilisés pour la fabrication de :

- fromages frais : Quarg, Féta, Cottage cheese,
- fromages à pâte molle : Camembert, Brie, Pont l'Evêque, Coulommiers,
- fromages durs à pâte pressée : Cheddar, Gouda, Edam ou des fromages à pâte persillée : Roquefort (Devoyod et Poullain, 1988), Silton, Gorgonzola
- Comme il sont utilisés pour la préparation du kéfir, du beurre et de certains laits fermentés tel que le viili finlandais (Tamine, 1981 et Jehano, 1996).

### 1. Caractères morphologiques, écologiques et physiologiques

Selon Desmazeaud, (1996), les lactocoques se présentent sous forme de coques de 1 µm de diamètre, ces coques peuvent être isolées, associées par paires ou en chaînettes de longueur variable.

Ce sont des bactéries homofermentaire ne produisant que l'acide lactique L (+), elles sont mésophiles, leur température de croissance optimale est comprise entre 20 et 30 °C, peuvent croître à 10°C mais pas à 45 °C, elles ont une faible thermorésistance et ne résistent pas à un chauffage modéré tel que la pasteurisation basse (Novel, 1993 et Deroissart, 1994). Ces microorganismes sont dépourvus de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence (microaérophiles).

Les lactocoques se distinguent par la production d'acide dans le lait tournesolé (0,8 à 1% d'acide lactique) et par leur sensibilité aux milieux salés (6,5% de NaCl) et alcalins (pH 9,6), ils ne sont pas pathogène, caractérisés par la présence de l'antigène N et l'absence de l'hémolyse β alors que l'hémolyse α peut être présente chez certaines souches (Dellaglio, 1994).

### 2. Habitat des lactocoques

Les réservoirs naturels des lactocoques sont le lait (*Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* et *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*) (Sandine, 1988), la flore minoritaire du rumen (Jones, 1978) et certains végétaux (*Lactococcus lactis* subsp *lactis*, et *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*) (Sandine, 1985).

### 3. Classification et nomenclature

En se fondant sur des critères moléculaires Schleifer et *al.* (1985) ont proposé de séparer les lactocoques du genre streptococcus et de créer le genre « **Lactococcus** », actuellement ce genre comporte plusieurs espèces et sous espèces dont les plus importantes en industrie laitière sont d'après Dupuy, (2004) :

➤ *Lactococcus lactis* subsp *lactis* : qui est la plus abondante dans le lait à température ambiante, elle se présente sous forme de diplocoques, hydrolyse l'arginine et produit un système dégradant la caséine, comme elle fermente plusieurs sucres et capable de pousser en présence de 4 % de NaCl.

➤ *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* : cette espèce possède beaucoup de similitudes avec *Lactococcus lactis*, elle se distingue par sa capacité d'utiliser le citrate et de produire le diacétyle.

➤ *Lactococcus lactis* subsp *crémoris* : qui est caractérisée par ses propriétés acidifiantes.

#### 4. Caractères biochimiques et nutritionnels de *Lactococcus lactis*

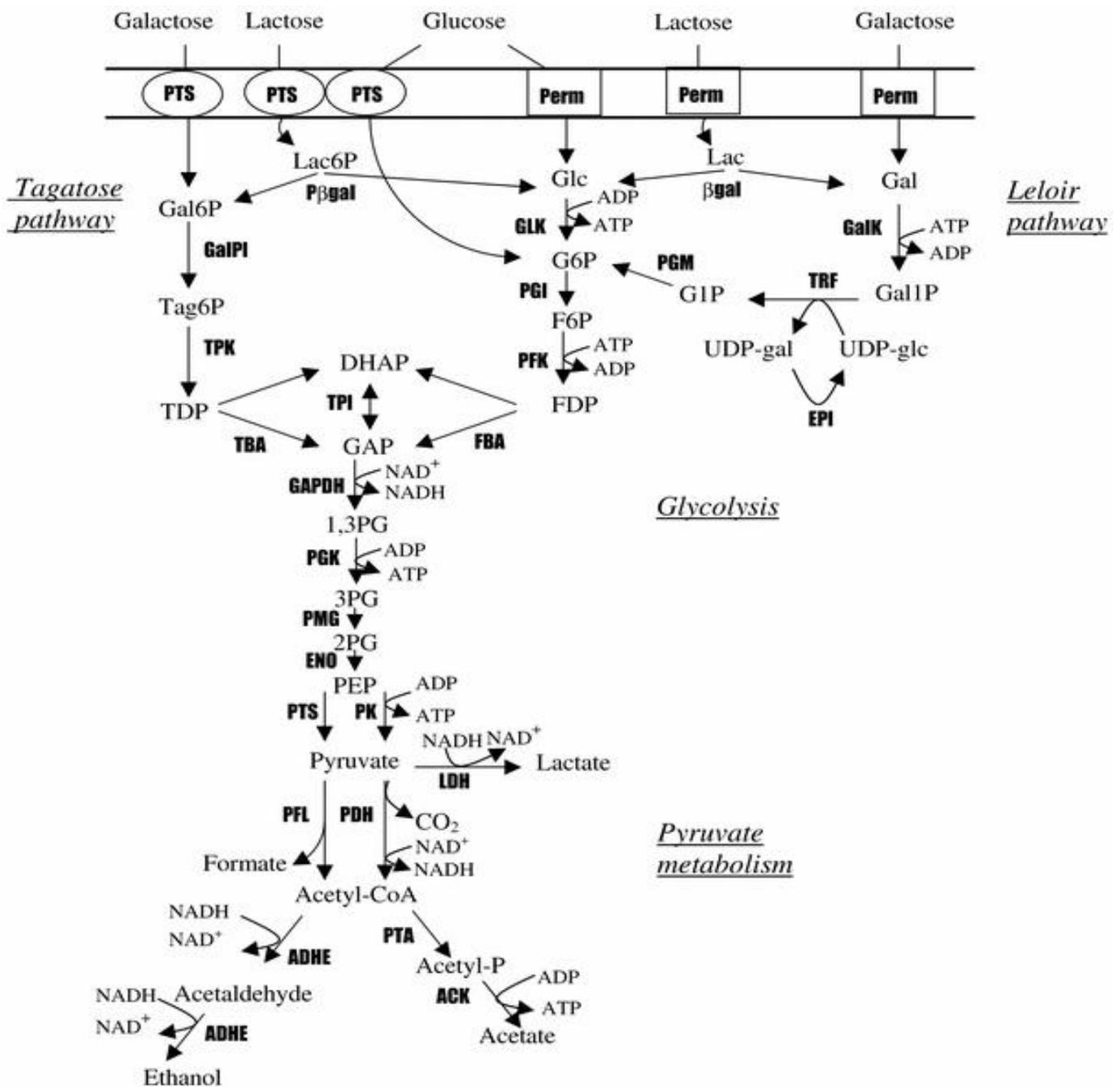
##### 4.1. Métabolisme des sucres

La figure 1 présente les différentes voies métaboliques utilisées par *Lc. lactis sp* pour l'utilisation du lactose, galactose et glucose.

Lorsque la glycolyse se déroule de façon optimale, les souches de *Lc. lactis sp* suivent principalement une voie homofermentaire dans laquelle 90 à 95 % des sucres consommés sont convertis en acide lactique, cependant, sous certaines conditions de fermentation et pour quelques souches, une partie du pyruvate peut dévier de la voie centrale de la glycolyse et être à l'origine de la formation de divers composés : acétaldéhyde, éthanol, acétate et formate (Melchiorsen et *al.*, 2002).

Les espèces de *Lc. lactis* sont généralement associés à une forte capacité d'acidification du lait, mais plusieurs souches appartenant à cette espèce ne produisent que de faibles quantités d'acide parce que l'opéron lactose contenant les gènes intervenant dans le transport et une partie du métabolisme du lactose est souvent porté par un plasmide (De Vos et *al.*, 2004), la perte de ces gènes rend les souches des variants lents (slow coagulating variants) ou des souches lactose négative (Lac -) incapables d'acidifier le lait en 24 heures et de croître dans un milieu contenant le lactose comme seule source d'hydrate de carbone (Lee et Moon, 2003).

Leur aptitude à abaisser le pH du lait aboutit à la formation du caillé, l'acidité joue aussi un effet favorable sur l'égouttage et le drainage du sérum ce qui confère la texture et la plasticité au fromage, elle induit en plus la production des constituants d'arômes et assure la protection du produit contre les germes de putréfaction (Alais, 1984).



*Glc* : glucose ; *G6P* : glucose-6-phosphate ; *G1P* : glucose-1-phosphate ; *F6P* : fructose-6-phosphate ; *FDP* : fructose-1,6-diphosphate ; *DHAP* : dihydroxyacétone-phosphate ; *GAP* : glycéraldéhyde-3-phosphate ; *1,3PG* : 1,3-diphosphoglycérate ; *3PG* : 3 phosphoglycérate ; *2PG* : 2-phosphoglycérate ; *PEP* : phosphoénolpyruvate ; *Tag6P* : tagatose-6-phosphate ; *TDP* : tagatose-1,6-diphosphate ; *Gal* : galactose ; *Gal6P* : galactose-6-phosphate ; *Gal1P* : galactose-1-phosphate ; *GLK* : glucokinase ; *PGI* : glucose-phosphate isomérase ; *PFK* : phosphofruktokinase ; *FBA* : fructose- biphosphate aldolase ; *TPI* : triose-phosphate isomérase ; *GAPDH* : glycéraldéhyde-phosphatedéshydrogénase ; *PGK* : phosphoglycérate kinase ; *PMG* : phosphoglycérate mutase ; *ENO* : émolase ; *PK* : pyruvate kinase ; *GalPI* : galactose/ uridyl transférase ; *EPI* : UDP-glucose épimérase ; *PGM* : phosphoglucomutase ; *LDH* : lactate déshydrogénase ; *PFL* : pyruvate formate lyase ; *PDH* : pyruvate déshydrogénase ; *PTA* : phosphotransacétylase ; *ACK* : acétate kinase ; *ADHE* : alcooldéshydrogénase

**Figure 1 :** Métabolisme du lactose, galactose et glucose chez *Lc. lactis* sp et enzymes Impliquées dans la voie métabolique centrale. Selon **Cocaign-Bousquet et al. (2002)**

## 4.2. Métabolisme des protéines

Le système protéolytique de *Lc. lactis* sp est directement impliqué lors de la maturation fromagère puisqu'il dégrade la caséine du lait en petits peptides et en acides aminés, ce qui génère alors des composés reliés aux saveurs ou leurs précurseurs, ces caractéristiques expliquent l'usage très fréquent des lactocoques en industrie fromagère.

Les voies menant de la dégradation des caséines au catabolisme des acides aminés sont présentées sur la figure 2.

Deux types de protéinases de paroi ont été mis en évidence chez *Lc. lactis* sp (Pritchard et al., 1993).

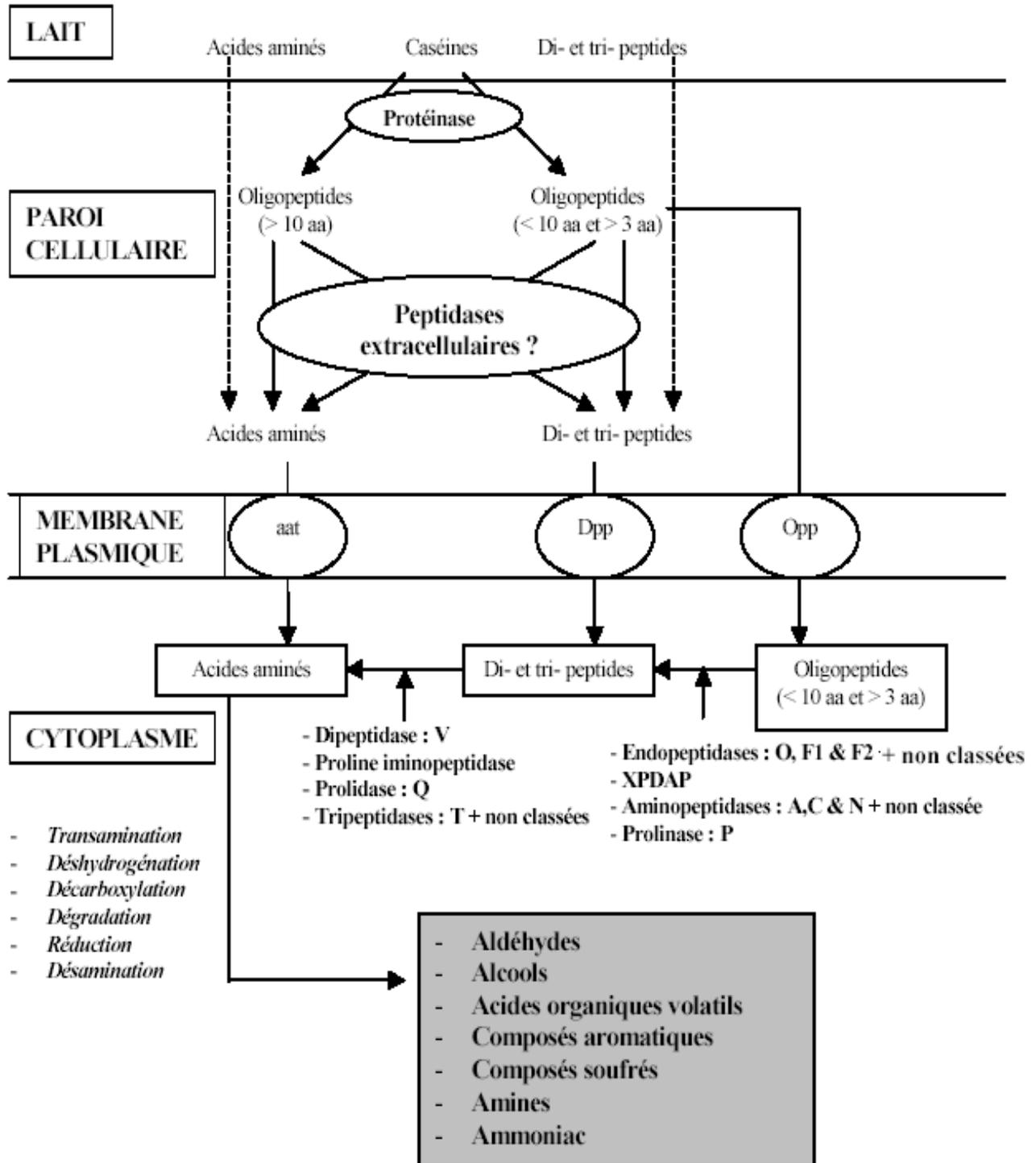
Les oligopeptides générés après action de la protéinase sont susceptibles d'être dégradés en di- et tri- peptides ainsi qu'en acides aminés à l'extérieur de la cellule, Un système de transport, Opp, assure le passage des oligopeptides d'une taille maximale de 10 résidus d'acides aminés à travers la membrane plasmique (Kunji et al., 1998).

Les oligopeptides sont ensuite dégradés dans le cytoplasme en di- et tripeptides puis en acides aminés par des mécanismes faisant intervenir de nombreuses enzymes.

Une partie de ces acides aminés, notamment ceux pour lesquels les *Lc. lactis* sp sont auxotrophes, servira à la synthèse de nouvelles protéines et une autre partie participera à la formation des arômes.

La protéolyse est parfois à l'origine d'un défaut de saveur : l'amertume, ce défaut résulte de l'accumulation de peptides de petite taille, ayant une hydrophobicité élevée et dont la partie C terminale est constituée soit de leucine, de phénylalanine ou de tyrosine.

Le choix des souches est particulièrement important pour éviter ce défaut. Les variants lents de lactocoques déficients en protéinase de paroi (Prt -) ne produisent pas d'amertume. De plus, ces souches dites « non amères » possèdent des activités enzymatiques capables de dégrader les peptides amers en peptides non amers et acides aminés libres, la spécificité des protéinases de paroi pour les caséines joue également un rôle sur le développement de l'amertume (Broadbent et al., 2002).



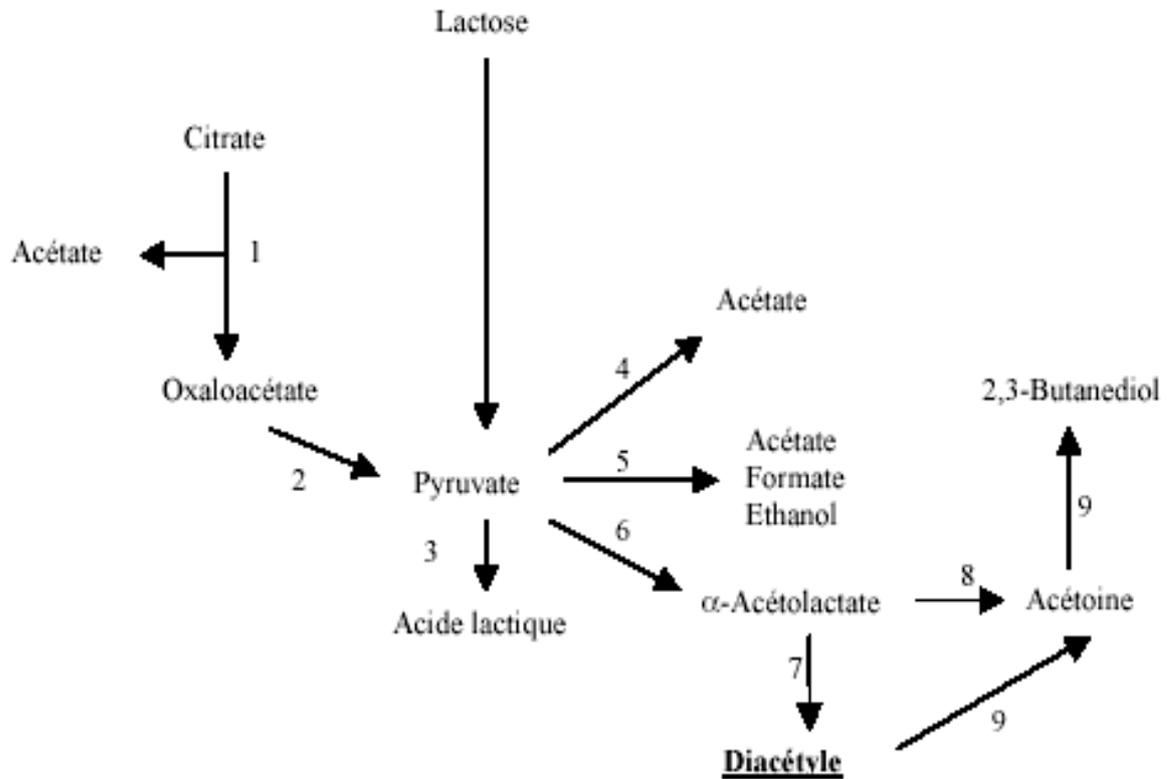
**Figure 2 :** Catabolisme des acides aminés par *Lc. lactis* sp. Selon Grattepanche, (2005)

### 4.3. Métabolisme des citrates

Selon Devis et *al.* (1994), le métabolisme du citrate génère des arômes notamment le diacétyle (figure 3) particulièrement recherché dans certains produits laitiers tels que le beurre et les fromages frais.

Avant d'être métabolisé, le citrate est transporté à l'intérieur de la cellule grâce à une enzyme, la citrate perméase P (Cit P) qui scinde la molécule du citrate en acétate et oxaloacétate, cette dernière est ensuite converti en CO<sub>2</sub> et en pyruvate par une oxaloacétate décarboxylase (Drider et *al.*, 2004). L'acide pyruvique qui résulte de cette réaction est utilisé comme précurseur d'arômes où il sera converti en diacétyle, acétoine et 2,3 butanédiol (2,3 butylènes glycol).

La production de diacétyle est variable selon les conditions de fermentation (Hugenholtz, 1993) et les souches, les travaux de Bassit et *al.* (1994) ont montré que les souches de *lactococcus lactis subsp lactis biovar diacétylactis* et *lc.lactis subsp crémoris* produisent des quantités importantes de diacétyle et d'acétaldéhyde et sont dit « des bactéries d'arôme ».



Enzymes ou étape : citrate lyase (1); oxaloacétate décarboxylase (2); lactate déshydrogénase (3); pyruvate déshydrogénase (4); pyruvate formate lyase (5);  $\alpha$ -acétolactate synthase (6); décarboxylation oxydative (7);  $\alpha$ -acétolactate décarboxylase (8); diacétyle-acétoïne réductase (9).

**Figure 3 :** Métabolisme du citrate conduisant à la formation du diacétyle  
Selon **Grattepanche, (2005)**

#### 4.4. Métabolisme des lipides et estérolyse

Certaines souches de lactocoques possèdent des lipases capables d'hydrolyser les lipides, présents dans le lait, en acides gras à courtes chaînes, ces acides gras constituent les précurseurs de composés aromatiques tels que le méthyl-cétone, les thioesters et les lactones (Collins et *al.*, 2003 ; Tungjaroenchai et *al.*, 2004).

### 5. Les exigences de *Lactococcus lactis*

#### 5.1. En minéraux

La nécessité des minéraux métalliques dans le métabolisme chez les bactéries lactiques s'explique d'abord par leur fonction de cofacteur pour de nombreuses enzymes, le tableau qui suit montre l'importance de certains minéraux dans le métabolisme des lactocoques.

**Tableau 2** : Importance des minéraux dans le métabolisme des lactocoques

Minéral	Importance
Le magnésium	améliore l'activité des protéases par son rôle dans la paroi cellulaire
Le potassium	la régulation du pH intracellulaire
Le cuivre	augmente la production de diacétyle

*Source* : Leveau et Bouix, (1993).

#### 5.2. En acides aminés, vitamines et acides organiques

Comme toutes les bactéries lactiques, les lactocoques se caractérisent sur le plan nutritionnel par une importante déficience biosynthétique. Ils requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés mais de très nombreux facteurs de croissance sont nécessaires à leur multiplication, en particulier des acides aminés et des vitamines de groupe B.

## 6. Génétique de *Lactococcus lactis*

La génétique des bactéries lactiques est récente comparée à celle d'autres bactéries mais elle a évolué rapidement depuis quelques années (Novel, 1993).

### 6.1. Les plasmides

Les souches de *Lc. lactis subsp lactis* et *subsp cremoris* portent au moins deux plasmides; généralement, chaque souche possède de 4 à 7, voire 11 à 14 plasmides (Fujita et al., 1984), de rares souches ne portent qu'un seul plasmide (Ramos et al., 1983).

Chez les lactocoques, ces plasmides peuvent coder des aptitudes indispensables à la fermentation du lait : le métabolisme du lactose et la dégradation des protéines, ainsi que d'autres propriétés utiles en technologie laitière : la fermentation des citrates, la production de substances filantes, la résistance aux bactériophages, aux agglutinines et au sel. Ils peuvent également coder d'autres caractères secondaires tel que la production de bactériocine (De Roissart, 1986).

### 6.2. Les bactériophages lactiques

Les bactériophages (ou phages) sont des virus qui s'attaquent aux bactéries avec une certaine spécificité et provoquent leur lyse, c'est-à-dire leur destruction. Selon la part jouée dans la fermentation lactique par la souche bactérienne attaquée, il en résulte un défaut d'acidification plus ou moins important.

L'action inhibitrice des phages est d'autant plus perçue que de grandes quantités de lait sont mises en œuvre, que les fabrications sont mécanisées et qu'une cinétique précise et intense d'acidification est recherchée, les perturbations provoquées par les phages ont des causes complexes et des conséquences économiques importantes (De Roissart, 1986).

## 7. Activité antimicrobienne des lactocoques

Les bactéries lactiques généralement et les lactocoques spécialement sont connus par leur capacité de produire un grand nombre d'agents inhibiteurs (les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocine) contre la flore de dégradation des aliments et les bactéries pathogènes.

### 7.1. Action des acides organiques

Dans les produits fermentés, la baisse du pH dépend de la matière première fermentée et des souches utilisées (plus ou moins acidifiantes). Il est plus souvent entre 4 et 4,5 dans le cas des yogourts, 4,8 à 5,3 dans le cas des saucissons, c'est dire des valeurs

inférieures aux valeurs limites de développement de la plupart des flores d'altération et de la flore pathogène (Sutra et *al.*, 1998).

L'effet inhibiteur spécifique des acides organiques est généralement attribué à leur forme non dissociée. Cette forme pénètre librement dans la cellule où elle s'ionise, ce qui provoque un abaissement du pH interne et une inhibition de la flore acido - sensible telle que les *Pseudomonas* et un blocage de certains mécanismes de transport (Van Den Berg et *al.*, 1995).

## **7.2. Action de diacétyl**

Le diacétyl produit par de nombreuses bactéries lactiques est un inhibiteur actif contre de nombreux microorganismes. L'action inhibitrice est accrue en milieu acide, les bactéries Gram négatives sont plus sensibles au diacétyl que les Gram positives, les premières sont inhibées à la concentration de 200 g/l et les dernières au 300 g/l (Hugenholtz et Starrenburg, 1992).

## **7.3. Action des bactériocines**

### **7.3.1. Définition**

Une bactériocine est une substance de nature protéique possédant une activité antimicrobienne et qui peut être produite aussi bien par des bactéries à gram positif que par des bactéries à gram négatif.

Elle est considérée comme étant un produit extracellulaire primaire, synthétisé par les bactéries par voie ribosomale et peut avoir une activité bactéricide à spectre étroit incluant les bactéries de la même espèce ou du même groupe à l'exception de la bactérie productrice qui possède un mécanisme de protection spécifique (Aymerich et *al.*, 2000 ; Ammor et *al.*, 2006).

La nature protéique de cette substance a été identifiée par Hirsch en 1951 qui l'appela nisine ; « n » : désigne les straptocoques de groupe N selon la classification de Lancefield (1993), « is » : est l'abréviation de inhibitory substances et « ine » désigne une bactériocine (De Vuyst et Vandamme, 1993).

Le spectre d'action des bactériocines se définit comme étant la diversité des bactéries sensibles à l'action bactériostatique ou bactéricide du peptide. On a d'abord attribué aux bactériocines un spectre d'activité limité aux bactéries taxinomiquement proches de la bactérie productrice (Tagg et *al.*, 1976). Certaines bactériocines possèdent un large spectre d'activité qui inclut des bactéries éloignées au point de vue phylogénétique.

### 7.3.2. Classement des bactériocines

Bradley (1967) a classé les bactériocines selon leur poids en deux groupes :

- **Bactériocines de faible poids moléculaire** : non sédimentables, résistantes à la trypsine et thermostables.
- **Bactériocines de haut poids moléculaire** : sédimentables, résistantes à la trypsine, thermolabile, visibles au microscope électronique et ressemblent aux queues de phages.

Les bactériocines ont été divisées en quatre classes (Klaenhammer, 1993), cependant aucune bactériocine de *L. lactis* n'appartient aux classes III et IV.

➤ **Classe I « les lantibiotiques »** : qui sont de petits peptides hydrophobes (< 5KDa) comprenant les acides aminés inhabituels suivants : la lanthionine – la  $\beta$  méthyllanthionine et des résidus déshydratés (la dehydroalanine et déhydrobutyrine) liés par des ponts soufrés intra chaîne, sont synthétisées par plusieurs genres microbiens Gram positif (staphylocoques, bacillus, lactococcus ...) (Cleveland et al., 2001), dans le cas des bactéries lactiques l'exemple type est la nisine produite par *lactococcus lactis* qui a une action bactéricide contre de nombreuses bactéries à gram positif mais n'agit pas sur les bactéries à gram négatif.

➤ **Classe II « bactériocines ne possédant pas d'acides aminés modifiés »** : comporte des bactériocines constituées de peptides de faible poids moléculaire, généralement inférieur à 15 KDa et thermostable (entre 30 min à 100°C et 15 min à 121°C), à spectre étroit où leur activité est dirigée contre les bactéries phylogénétiquement différentes, parmi les bactériocines les plus étudiées dans cette classe la diplococcine qui est produite par plusieurs souches de *lactococcus lactis ssp cremoris*, la lactococcine A, la lactocine 27, la lactacine B et F, (Davay et Richardson, 1981).

➤ **Classe III** est représentée par des bactériocines de haut poids moléculaire (plus de 30KDa), sensibles à la chaleur.

➤ **Classe IV** : comporte les bactériocines composées d'une partie non protéique nécessaire à l'activité inhibitrice (sucre ou lipide), cette classe a été ajoutée suite à l'observation de la perte de l'activité de certaines bactériocines après leur incubation en présence d'enzymes dégradant les sucres et les lipides (Jiménez –Diaz et al., 1993) mais son existence reste controversée (Nes et al., 1996).

### 7.3.3. Caractéristiques des bactériocines

➤ **Caractères biochimiques** : vue leur nature protéinique, ces substances présentent une sensibilité aux enzymes protéolytiques quelle que soit leur origine : pancréatique ( $\alpha$  chymotrypsine, trypsine) ou gastrique (pepsine) (Piard et Desmazeaud, 1992).

➤ **Caractères physiques** : en général les bactériocines de faible poids moléculaire sont très thermostables, à l'opposé de celles qui sont à poids moléculaire élevé (sensibles aux traitements thermiques) (Alves et *al.*, 2006 ; Albano et *al.*, 2007).

➤ **Caractères chimiques** : Ces molécules sont stables dans les milieux acides et neutres, par contre elles perdent leur activité en milieu basique, c'est le cas de la nisine qui est inactivée à 80% à pH 10 (Belliard et *al.*, 1996). De même, la lactastrepsine qui est stable à pH 4,6 – 5 et devient réversiblement inactivée à pH égal ou supérieur à 6 (Piard et Desmazeaud, 1992 ; Kostinek et *al.*, 2007), cependant Lee et Paik, (2001) rapportent que l'activité de la bactériocine, issue d'un streptocoque lactique mésophile, n'est pas affectée par une variation du pH allant de 2 à 11.

➤ **Caractères antigéniques** : certaine bactériocines peuvent présenter des propriétés antigéniques qui sont en rapport avec leur poids moléculaire élevé et le niveau de complexité structurale.

➤ **Caractères génétiques** : la synthèse des bactériocines par les lactocoques est régie par des facteurs dits « facteurs bactériocinogènes » qui sont portés soit par des chromosomes, soit par des éléments extrachromosomiques tels que les plasmides (Barrefoot et Klaenhammer, 1984 ; Larpent , 2000).

En parallèle à la production de bactériocine, les bactéries synthétisent une protéine dite « d'immunité » qui leur permet de contrôler l'action du composé antagoniste l'exemple est celui des gènes NISI et nis FEG qui sont impliqués dans l'immunité cellulaire à la nisine.

En général, les facteurs bactériocinogènes et les protéines d'immunité sont portés par le même gène et la transmission des facteurs bactériocinogènes se fait soit normalement par voie héréditaire ou par transduction ou alors après une manipulation génétique.

En effet, grâce au génie génétique, des souches capables de produire des taux élevés de bactériocines ou de ferments résistants aux inhibiteurs ont été produites ( Ray et *al.*, 1992 ; Leloir et *al.*, 2001).

#### 7.3.4. Mode d'action des bactériocines

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

**1<sup>ère</sup> étape** : elle consiste en l'adsorption de la bactériocine sur les récepteurs spécifiques ou non spécifiques de la membrane des cellules cibles.

**2<sup>ème</sup> étape** : elle est une phase irréversible implique la modification pathologique de la cellule cible.

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

Alors que Schved et *al.* (1994) assurent que les bactériocines peuvent avoir trois types d'effets :

- Effet bactériostatique : c'est-à-dire ralentissement ou arrêt de la croissance
- Effet bactéricide : perte de la viabilité et lyse cellulaire telles que la nisine
- Effet bactéricide sans lyse cellulaire

#### 7.3.5. Utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire

L'application des bactériocines constitue une nouvelle perspectives pour la conservation des aliments et l'élimination des microorganismes indésirables et pathogènes.

La nisine produite par des souches de *Lactococcus lactis*, fut la première bactériocine utilisée comme bioconservateur alimentaire, elle est reconnue comme GRAS ( Generally Recognised As Safe) par l'organisation mondiale de la santé et son utilisation est autorisée dans plus de 48 pays.

Dans les produits laitiers, les travaux de Thuault et Quimper, (1997) montrent que l'utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocines dans la fabrication du fromage à pâte molle diminue d'un facteur de 10% le taux de *Listeria monocytogènes*.

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

Dans les produits carnés, Richard, (1996) ; Kalta et *al.* (2001) ont montré qu'une destruction de 99,9% de la population initiale de *Listeria monocytogènes* a été enregistrée

lors de l'utilisation de 5000 µl/g de nisine dans la viande fraîche hachée et conservée à 4°C.

### III. BARRIERES PHYSIOLOGIQUES DU TRACTUS GASTRO-INTESTINAL HUMAIN

#### 1. Le tractus gastro-intestinal

Le tractus gastro-intestinal est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes, par sa surface totale (muqueuse) estimée à 200-300 m<sup>2</sup>, il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement (Holzapfel et al., 1998). L'écosystème gastro-intestinal est généré par une alliance stable entre l'épithélium gastro-intestinal, le système immunitaire et une importante flore microbienne.

Son rôle principal réside dans la digestion qui débute dès l'instant où les aliments pénètrent dans la cavité buccale. Ils vont donc subir des transformations progressives qui ont pour but de les réduire en substances absorbables et utilisables (les nutriments). Ces transformations sont selon Perlemuter et al. (1998) de deux ordres : mécanique par une action de broyage et de brassage et chimique par l'utilisation des enzymes digestives.

Selon Taglang, (2005) le tractus gastro-intestinal humain est composé d' :

- **Une bouche** : où se passe la mastication des aliments.
- **Un estomac** : où les aliments s'accumulent et se livrent par petites portions au duodénum après avoir été préparés à la digestion du grêle.
- **Les intestins** :
  - \* Intestin grêle (6 à 8 m de long) composé d'un :
    - Duodénum qui est un carrefour important où vient confluer les sucs biliaires et pancréatiques.
    - Jéjunum et l'iléon, où s'opère la plus grande partie des actions digestives qui permettent l'utilisation des aliments.
  - \* Le gros intestin (1,40 à 1,70 m de long) composé d'un :
    - Cæcum (peu développé).
    - Côlon : où le contenu intestinal prend un caractère fécal proprement dit.
    - Rectum.

## 2. Barrières physiologiques du tractus gastro-intestinal

### 2.1. Le suc gastrique

Est un liquide pratiquement incolore, filant et très acide (pH : 1,5) sécrété par les glandes de la paroi gastrique, sa sécrétion et sa composition sont rythmées par le repas ; elles sont variables dans les 24 heures (Perlemuter et *al.*, 1998), il est constitué de :

#### 2.1.1. l'acide chlorhydrique (HCl)

L'HCl confère au suc gastrique son acidité (pH : 1), il est sécrété par les cellules bordantes grâce à une ATPase  $H^+/K^+$ , il a pour fonctions :

- la destruction des microbes et l'empêchement de la prolifération de ces derniers dans l'estomac sauf le bacille de Koch ;
- la transformation de pepsinogène inactif en pepsinogène actif ;
- le déclenchement de fonctionnement du pylore et stimulation de la sécrétion pancréatique.

#### 2.1.2. Le mucus

Dont le rôle est de protéger la muqueuse gastrique contre l'acidité de ses propres ferments et de l'acide chlorhydrique. Il est riche en bicarbonates ( $HCO_3$ ) (Rullier, 1995).

#### 2.1.3. Les pepsinogènes

Qui sont sécrétés par les cellules principales ; ce sont des enzymes protéolytiques qui dégradent les protéines en plus petites molécules après être transformés en pepsine grâce à l'acide chlorhydrique (Perlemuter et *al.*, 1998).

#### 2.1.4. Facteurs intrinsèques

Qui possèdent une action antihistaminique ; ils vont se combiner avec la vitamine  $B_{12}$ , ce qui permet à celle-ci d'être absorbée au niveau de l'intestin grêle (Rallu, 1999).

### 2.2. Les sels biliaires

Les hépatocytes sécrètent quotidiennement de 800 à 1000 ml de bile qui est un liquide jaune, brunâtre ou vert olive, son pH est compris entre 7,6 et 8,6 (Dore, 1994). La bile contient principalement : 95% d'eau, du mucus, des sels minéraux et du cholestérol. Elle agit essentiellement sur les graisses, elle va les fractionner, les émulsionner et les transformer en micelles ce qui va permettre leur absorption au niveau intestinal

(Moserscott et *al.* , 2001) comme elle assure l'élimination des déchets d'hémoglobine et de substances étrangères (Rullier, 1995).

### **2.3. Le microbiote intestinal**

La flore intestinale est l'ancienne dénomination poétique d'une réalité appelée aujourd'hui le microbiote intestinal, qui se définit selon Isolauri et *al.*, (2002), comme étant une collection complexe et en équilibre de microorganismes qui habitent normalement le tractus gastro-intestinal, sa subsistance est assurée par nos résidus alimentaires, nos sécrétions ainsi que par la desquamation de nos tissus.

Chez l'homme, le microbiote intestinal forme un écosystème très complexe. Il interagit avec l'hôte au niveau local, grâce aux contacts intimes avec la muqueuse intestinale et au niveau systémique, influençant alors les fonctions immunologiques, physiologiques, métaboliques et nutritionnelles de l'hôte ; l'écosystème colique est donc impliqué à de nombreux niveaux dans la santé humaine dès le plus jeune âge.

La flore intestinale humaine renferme environ  $10^{14}$  cellules microbiennes, soit 10 à 20 fois le nombre de cellules de l'organisme, mais parmi cette population, seuls 20% des espèces bactériennes sont actuellement répertoriées dans les collections de souches (Bjorksten, 2004).

La carte d'identité complète de la flore intestinale n'est donc pas complètement élucidée, même si les méthodes d'étude moléculaires constituent un sacré pas en avant dans le domaine, de plus, si chaque individu possède une microflore fécale caractéristique assez stable dans le temps, en raison notamment d'un effet barrière de la flore elle – même, les différences interindividuelles sont importantes, accentuent la biodiversité et compliquent, fatalement, son étude et sa compréhension.

#### **2.3.1. Les facteurs majeurs influençant le microbiote intestinal**

La composition et les fonctions de la microflore du tractus gastro-intestinal sont influencées par divers facteurs liés au changement des conditions physiologiques de l'hôte (âge, état de santé,...), de la composition du régime alimentaire, des paramètres physico-chimiques (le pH intestinal, la motricité...) et des circonstances environnementales (contamination par les pathogènes, antibiothérapie, chimiothérapie, climat, stress, hygiène ...) (Mitsuoka, 1989 ; Hopkins et *al.*, 2002). Les facteurs majeurs influençant la microflore gastro-intestinale sont résumés dans le Tableau.

**Tableau 3** : les principaux facteurs influençant la composition et la fonction de la microflore intestinale

<b>Facteurs médus par l'hôte</b>	<b>Facteurs microbiens</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- pH, sécrétions (immunoglobulines, bile, sels, enzymes)</li> <li>- Mobilité (péristaltisme)</li> <li>- Physiologie (variable selon les compartiments)</li> <li>- Cellules détachées, mucines, exsudats de tissus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- adhésion</li> <li>- motilité</li> <li>- flexibilité nutritionnelle</li> <li>- Spores, capsules, enzymes, composants antimicrobiens</li> <li>- Temps de génération</li> </ul>

**Interactions microbiennes**

<b>synergie</b>	<b>Antagonisme et stimulation</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- coopération métabolique</li> <li>- excrétion de vitamines et facteurs de croissance</li> <li>- changement de potentiel d'oxydoréduction), pH et tension d'oxygène</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- acides gras de courte chaîne, amines</li> <li>- changement de potentiel d'oxydoréduction), et tension d'oxygène</li> <li>- composants antimicrobiens, sidérophores.</li> <li>- Besoins nutritionnels</li> </ul>

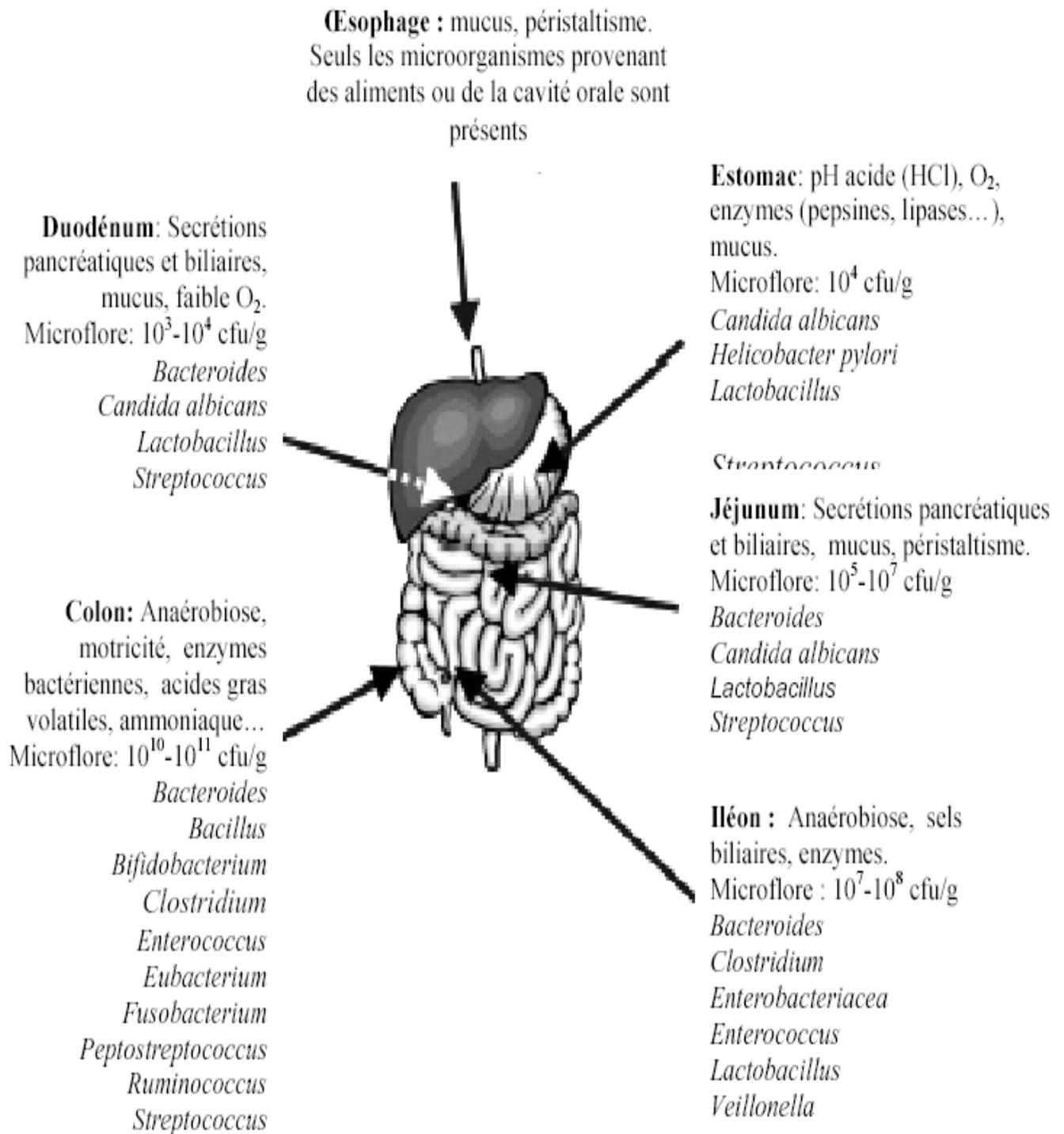
**Régime alimentaire**

Composition, fibres non digestibles, drogues, etc
---------------------------------------------------

*Source* : Holzapfel et al. (1998)

**2.3.2. Répartition topographique des espèces intestinales**

La répartition de la flore varie selon les segments du tube digestif, du point de vue microbiologique, comme le montre la figure 4, l'environnement gastro-intestinal comprend trois régions principales qui offrent des conditions très différentes pour la survie des différents microorganismes.



**Figure 4 :** Les microflores des différents compartiments de l'appareil digestif de l'homme (Ouwehand et Vesterlund, 2003).

➤ **Au niveau de l'estomac :** la prolifération microbienne est fortement réduite (inférieure à  $10^3$  UFC/g) à cause de la présence d'oxygène apporté par la déglutition et de la forte acidité. De ce fait, l'estomac héberge sélectivement les microorganismes acidotolérants et anaérobies facultatifs comme les lactobacilles, streptocoques, levures, etc.

➤ **Au niveau de l'intestin grêle :** on observe une variation quantitative (duodénum  $10^3$ - $10^4$  UFC/g, jéjunum  $10^4$ - $10^6$  UFC/g, iléon  $10^6$ - $10^8$  UFC/g) et qualitative : diminution progressive des bactéries aérobies au profit des bactéries anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridies. Il y a peu de bactéries dans l'intestin grêle où elles ne jouent pratiquement aucun rôle (Gournier-Chateau, 1994 et Dacosta, 2001).

➤ **Au niveau du colon :** (absence d'oxygène), le transit, très fortement ralenti, est à l'origine d'une stase d'où l'augmentation importante de la population bactérienne (de  $10^9$  à  $10^{11}$  UFC/g). C'est une véritable chambre de fermentation, siège de très nombreuses biotransformations des aliments non assimilés au niveau du grêle. Le côlon est la seule zone colonisée de façon permanente : la flore microbienne essentiellement anaérobie est dense et active, produisant localement de nombreux métabolites (Blum et *al.*, 1999 ; Rastall, 2004).

### 2.3.3. Diversité du microbiote intestinal du colon

Le microbiote intestinal colique constitue un écosystème complexe composé de plusieurs centaines d'espèces, sous-espèces et biotypes bactériens. La majorité de ces bactéries est anaérobie stricte (Conway, 1995), certains microorganismes sont présents en plus grand nombre que d'autres. Il est estimé qu'un ensemble d'environ 40 espèces représente 99% de la microflore bactérienne (Macfarlane et Macfarlane, 1997).

Le microbiote intestinal se trouve dans le côlon sous deux états, l'état planctonique où les populations bactériennes évoluent de façon libre et isolée dans l'environnement colique et un état sessile où les bactéries sont fixées à des particules alimentaires ou au mucus intestinal formant alors un biofilm (Macfarlane et *al.*, 1990 ; Probert et Gibson, 2002). L'analyse de sa composition en taxa (genres bactériens et/ou grands groupes phylogénétiques) fait ressortir l'existence de composantes récurrentes, retrouvées chez tous les individus.

Trois phyla bactériens, Firmicutes, Bacteroides et Actinobacteria rassemblent la plus grande part des bactéries fécales dominantes comme le montre le tableau 4 :

Tableau 4 : Composition du microbiote intestinal

<i>Phylum</i>	<i>Groupe</i>	<i>Genre et/ou espèces</i>	<i>répartition (%)</i>	<i>Source</i>
<b>Firmicutes</b> (bactéries à Gram +)	<b><i>Eubacterium rectale</i>- <i>Clostridium coccoïdes</i></b>	* <i>Eubacterium</i> * <i>Clostridium</i> , * <i>Ruminococcus</i> * <i>Butyrovibrio</i>	14 à 31	Frans <i>et al.</i> (1998).
	<b><u><i>Clostridium leptum</i></u></b>	* <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , * <i>Ruminococcus albus</i> * <i>R. flavefaciens</i> ,	16 à 22	Sghir <i>et al.</i> (2000).
<b><u>Bactéroïdes</u></b>		* <i>Bacteroides</i> , * <i>Prevotella</i> * <i>Porphyromonas</i>	9 à 42	Rigottier-Gois <i>et al.</i> (2003)
<b><u>Actinobacteria</u></b>	<b><u>Bifidobactéries</u></b>		0,7 à 10	Seksik <i>et al.</i> (2003).
	<b><u>Collinsella- Atopobium</u></b>		0,3à 3,7	Jansen <i>et al.</i> (1999).

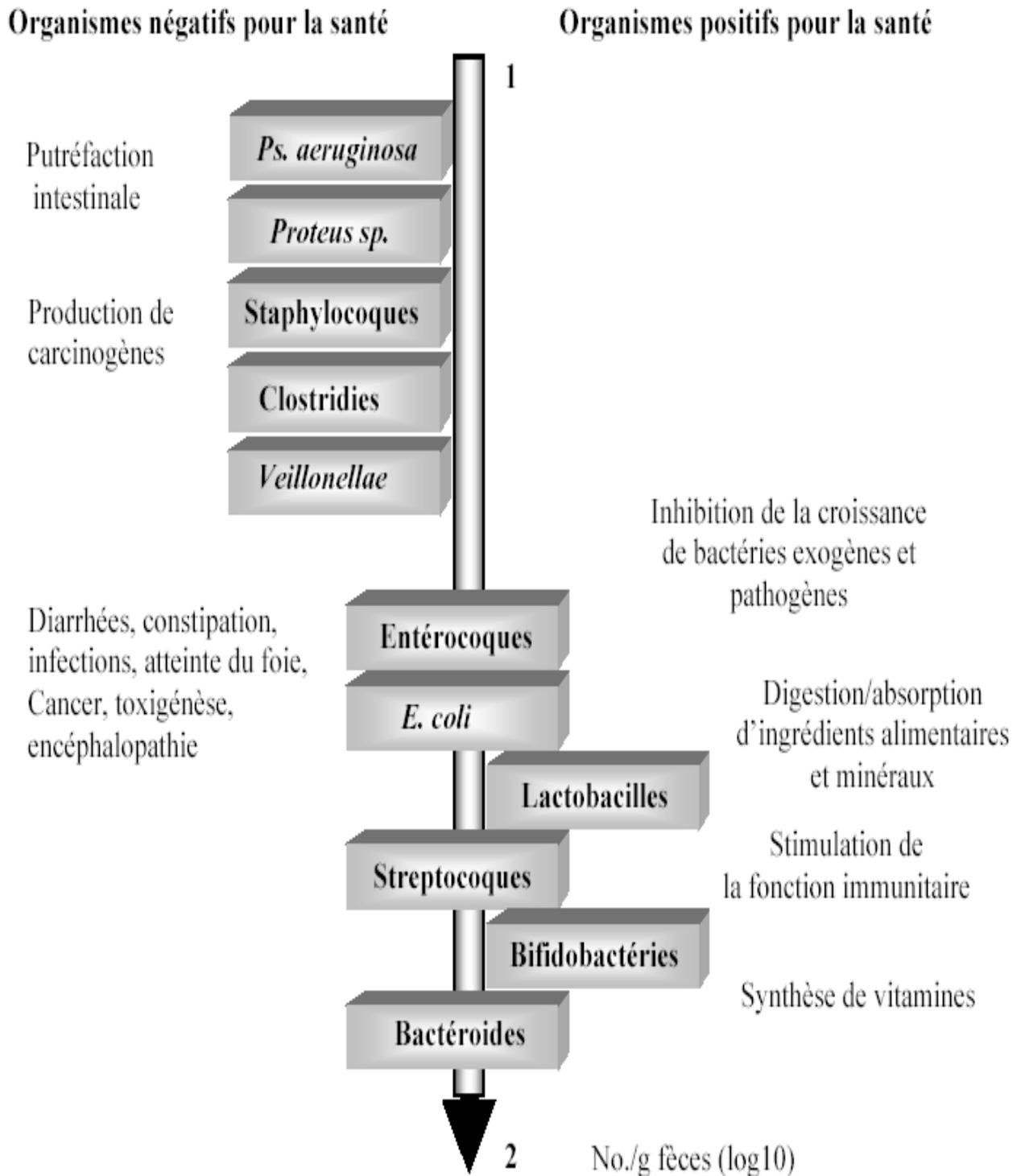
Les bactéries anaérobies facultatives sont moins nombreuses en moyenne 0,4 à 1% et représentées par les lactobacilles, les entérocoques, les streptocoques et les *Enterobacteriaceae*. Les levures (ex: *Candida albicans*) sont relativement faiblement représentées (Ouwehand et Vesterlund, 2003; Isolauri *et al.*, 2004).

On y trouve également, mais exceptionnellement, des espèces apparentées à *Clostridium ramosum*, *Eubacterium cylindroides*, *Phascolarctobacterium*, *Verrucomicrobium* ou *Sporomusa-Selenomonas-Veillonella*.

Toutefois, il faut noter qu'une partie de la flore gastro-intestinale (fraction minoritaire) demeure non cultivable et moins explorée, et ce pour diverses raisons : méconnaissance des besoins de croissance de certaines bactéries, la sélectivité des milieux utilisés, le stress dû aux conditions de culture, la nécessité d'anaérobiose stricte et la difficulté de stimuler les interactions entre les bactéries et les autres microorganismes ou les cellules de l'hôte (Zoetendal *et al.*, 2004).

Les bifidobactéries et les lactobacilles, ainsi que certains entérocoques, *E. coli*, streptocoques et bactéroïdes, se distinguent par leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, comme l'amélioration de la maturation et de l'intégrité de l'intestin, l'antagonisme contre les pathogènes et la modulation de la fonction immunitaire (Gibson et Roberfroid, 1995; Schiffrin et Blum, 1999; Rastall, 2004)

Les principaux composants de la flore du colon ainsi que leurs effets sur l'hôte sont présentés dans la figure 5.



**Figure 5 :** Vue générale sur la microflore du colon humain.  
Selon **Gibson et Roberfroid**, (1995).

### 2.3.4. Etablissement du microbiote intestinal

Le fœtus des mammifères évolue *in utero* dans un environnement stérile et les êtres humains naissent axéniques (Cathy et Saloff-Coste, 2005). La colonisation microbienne débute durant le processus de la naissance, en absence des mécanismes immunitaires sophistiqués de l'adulte, le tube digestif du nouveau-né est un environnement particulièrement permissif où les niveaux de population atteignent rapidement  $10^{11}$  bactéries par gramme de selles, la colonisation suit néanmoins un schéma relativement organisé, sous la dépendance de facteurs exogènes et endogènes.

Chez le nourrisson, la nature du lait influence l'établissement du microbiote intestinal. Les nouveau-nés allaités au sein possèdent un microbiote anaérobie strict différent par rapport aux nouveau-nés nourris avec des préparations de lait infantiles. Chez les enfants allaités au sein la microflore anaérobie stricte est dominée par le genre *Bifidobacterium* ; alors que les enfants nourris avec des formules infantiles ont une microflore anaérobie stricte hétérogène et donc composée de plusieurs genres bactériens (Bourlioux, 2007).

Or les bifidobactéries qui sont notamment susceptibles de protéger le nouveau-né contre les risques d'allergie, les bactéries pathogènes responsables des affections gastro-intestinales stimulent la maturation du système immunitaire (Dupont et *al.*, 2000).

Si la microflore intestinale se stabilise assez tôt dans la vie, il est couramment admis, bien qu'assez mal démontré jusqu'ici, que la composition de la flore se modifie chez les sujets âgés (Mitsuoka, 1996) avec :

- Une diminution notable des bifidobactéries qui deviennent sous-dominantes.
- Une augmentation des entérobactéries et des bactéries lactiques qui deviennent dominantes.
- Une augmentation de clostridies.

### 2.3.5. Rôle de la flore intestinale

Selon Bourlioux, (2007) les effets du microbiote intestinal sur la santé humaine peuvent se résumer comme suit :

- **Effets digestifs** : l'absence de flore entraîne un ralentissement du transit intestinal et une dilatation du caecum (effet sur la motricité).

➤ **Effets nutritionnels**

- Production d'acides gras à chaîne courte diminuant la synthèse hépatique du cholestérol ;
- Dégradation des hydrates de carbone non absorbés (amidon, pectine, glycoprotéines) aboutissant à la production d'acides organiques assimilables par l'hôte (acétate, propionate, butyrate) et de gaz (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>) ;
  
- Hydrolyse des lipides alimentaires non absorbés grâce aux lipases bactériennes et à la conjugaison des acides biliaires primaires, indispensable pour une bonne absorption des graisses ;
  
- Dégradation de certaines protéines et de certains acides aminés (tryptophane), permettant la récupération de l'azote ;
  
- Apport vitaminique : certaines bactéries anaérobies facultatives (*E.coli*, *E.aerogenes*) sont capables de synthétiser un large éventail de vitamines (biotine, riboflavine, acide pantothénique, pyridoxine et vitamine K).

➤ **Protection contre l'infection** : elle s'exerce d'abord par l'effet de barrière joué par la flore résidente vis-à-vis des bactéries exogènes « résistance à la colonisation », par élimination totale de la souche exogène « effet drastique », ou par maintien de la souche exogène en sous-dominance « effet permissif ».

La flore digestive stimule aussi l'immunité locale, comme l'ont montré les comparaisons du statut immunitaire des animaux conventionnels et axéniques, ces deux effets peuvent, dans certaines conditions, être augmentés par quelques souches bactériennes probiotiques en transit.

#### **IV. PROBIOTIQUES ET MICROFLORE INTESTINALE**

##### **1. Définition des probiotiques**

A partir des travaux de Metchinkoff en 1908, l'idée des bactéries lactiques ingérées vivantes pouvaient avoir un effet bénéfique a été développée.

La notion de probiotique est née et a donné lieu à plusieurs définitions au cours du temps, il semble y avoir aujourd'hui un consensus sur la définition récemment publiée par un comité d'expert réunis par la FAO, l'OMS, et l'ILSI qui précisent que les probiotiques sont « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte au-delà de l'effet nutritionnel premier » (Luquet et Corrieu, 2005).

Depuis une dizaine d'années, un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation de cultures lactiques à effets bénéfiques pour la santé ou « probiotique » pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore alimentation animale.

## 2. Démarches générales de sélection des probiotiques

La première étape de la sélection des souches à caractère probiotique consiste à identifier les effets santé recherchés à partir des attentes des consommateurs par exemple : la réduction des maladies gastro-intestinales (diarrhée, constipation, syndrome de colon irritable et la maladie de crohn), la diminution du cholestérol ou de la pression artérielle en réponse à l'augmentation des maladies cardiovasculaires.

Les vertus de santé incluses selon Marteau et *al.* (1994) ; Saarela et *al.* (2000) ; Dacosta, (2001) les spécifications suivantes :

- Les souches utilisées sont de préférence d'origine humaine ;
- Etre de bonne qualité alimentaire et en grande quantité avant l'ingestion ;
- Elles sont répertoriées comme des souches non pathogènes ;
- Adhéré aux cellules intestinales au moins temporairement et exclue ou réduit l'adhérence des pathogènes ;
- Elles n'ont pas une histoire d'association avec les infections comme les endocardites ou déséquilibre gastro- intestinal.
- Elles ne transmettent pas les gènes de résistance contre les antibiotiques ;

La deuxième étape est basée sur des critères technologiques où les souches doivent satisfaire selon Luquet et Corrieu, (2005) trois conditions indispensables :

- La propagation et la production à grande échelle et leur conditionnement en vue d'une utilisation ultérieure ;
- L'adaptation au milieu dans le quel elle sera utilisée (par exemple le lait) et leur résistance aux processus technologiques ;
- La survie dans le produit fini pendant plusieurs semaines à 10°C.

Tandis que la troisième étape repose sur des aspects fonctionnels qui doivent être stabilisés par l'utilisation des méthodes *in vitro* et la résultante doit être reflétée par un contrôle dans une étude humaine, ces aspects sont représentés par :

- Leurs influences minimales sur les propriétés organoléptiques et nutritionnelles de l'aliment probiotique (Ventura et *al.*, 2004) ;

- Leur résistance au passage dans les voies digestives (acidité gastrique, sels biliaires) (Charteris et *al.* , 2000 ; Dilmi - Bouras, 2002) ;
- L'adhésion temporaire à la surface épithéliale intestinale (Dilm-Bouras et Sadoun, 2002) ou la persistance dans le tractus gastro- intestinale (Saarela et *al.* , 2002) ;
- La stimulation immunitaire sans effet inflammatoire (Dacosta, 2001) ;
- Production de substances anti microbiennes (Dacosta, 2001) ;
- Des propriétés anti-mutagènes et anti cancérigènes (Majamaa , 1997) ;
- Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bactériocines...) ;
- Résistance aux bactériophages (Pathmakanthan et *al.*, 2000).

### 3. Classement des probiotiques

Selon le rapport de la FAO/WHO (2002), pour qu'une espèce bactérienne soit reconnue comme étant probiotique, il faut désigner le genre, l'espèce et la souche car les effets probiotiques sont spécifiques à la souche microbienne. Le probiotique doit porter un nom reconnu scientifiquement et son identification doit être effectuée à l'aide de méthodes récentes et valides combinant les tests phénotypiques et génotypiques.

Les probiotiques sont principalement représentés par quatre grands groupes classés dans le tableau 5 :

**Tableau 5 :** Microorganismes employés comme probiotiques chez l'homme et chez les animaux d'élevage

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Bactéries lactiques ou pseudo lactiques	Bactéries non lactiques et moisissures
<i>Lb. bulgaricus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lb. cellobisus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Lb. cripatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	
<i>Lb. gallinarum</i>	<i>B. thermophilus</i>		
<i>Lb. gasseri</i>			
<i>Lb. johnsonii</i>			
<i>Lb. lactis</i>			
<i>Lb. paracasei</i>			
<i>Lb. plantarum</i>			
<i>Lb. reuteri</i>			
<i>Lb. salivarius</i>			

*Source :* Dacosta, (2001)

#### 4. Effets des probiotiques sur la santé humaine

##### 4.1. Sur le tractus gastro-intestinal

##### 4.1.1. Protection contre les maladies inflammatoires du tube digestif

Lorsque le tube digestif est sain, l'individu tolère sa propre microflore, phénomène perdu au cours des maladies inflammatoires du tube digestif.

Schultsz et *al.* (1999) ; Dupont et *al.* (2000) ont mis en évidence une réduction des activités exoglycosidasiqes (beta-galactosidase, N-acétyl-beta-glucosaminidase, alpha-mannosidase) dans les selles de patients ayant une maladie de Crohn active. Cette

diminution était corrélée à une baisse des *Bifidobacterium* dans la flore fécale. Ces travaux soulignent l'importance de la flore bifide en clinique et son interaction avec l'activité métabolique et le mucus.

#### **4.1.2. Les probiotiques et les infections gastro-intestinales**

Des études cliniques ont démontré que des infections gastrointestinales causées par *Helicobacter pylori*, la diarrhée du voyageur, diarrhée due aux rotavirus, diarrhée-associée aux antibiotiques comme celle causée par *Clostridium difficile*, peuvent être contrecarrées avec succès par l'utilisation de probiotiques (Mercenier et al., 2002 ; Turchet et al., 2003; Plummer et al ; 2004; Tursi et al.,2004 ; Wang et al., 2004).

#### **4.1.3. Les probiotiques et la prévention du cancer du colon**

Certaines études montrent que les bactéries probiotiques ont la propriété d'inhiber les processus conduisant à la formation du cancer du colon chez l'homme. En effet, Matsumoto et Benno, (2004) ont mentionné que la consommation de yogourt contenant *Lactococcus lactis* réduit significativement la mutagénéicité dans l'intestin des volontaires.

#### **4.1.4. Les probiotiques et les maladies inflammatoires de l'intestin**

Selon la littérature, les processus inflammatoires impliqués dans les pathologies de l'intestin de l'homme comme la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la pouchite sont contrôlés par les probiotiques (Gosselink et al., 2004) .

#### **4.1.5. Les probiotiques et la perméabilité intestinale**

L'altération de la perméabilité intestinale (fonction-barrière) causée par une infection, toxine ou autre facteur favorise un transfert aberrant d'antigènes (y compris la microflore locale) à travers l'intestin en engendrant des réponses immunitaires inappropriées (réactions inflammatoires ou autoimmunes) (Baumgart et Dignass, 2002).

Des études récentes ont montré que la consommation de probiotiques stabilise la fonction barrière de l'épithélium intestinal. Par exemple, Isolauri et al. (2004) ont démontré que *Lactobacillus* GG normalise le processus de perméabilité intestinale chez le rat. En outre, Rosenfeldt et al. (2004) a démontré que l'administration de probiotiques permet de stabiliser la fonction-barrière de l'intestin et de diminuer les symptômes gastro-intestinaux chez des enfants souffrant d'une dermatite atopique.

#### 4.1.6. Les probiotiques et la motilité de l'intestin

La motilité intestinale joue un rôle important dans la réduction de la croissance des microorganismes pathogènes dans l'intestin. Les probiotiques pourraient avoir des effets positifs sur la motilité de l'intestin en réduisant le temps de transit des microorganismes pathogènes (Corthier, 2007).

#### 4.2. Autres effets

L'ingestion quotidienne d'une quantité déterminée de bactéries lactiques permet avant tout de rééquilibrer et maintenir une flore intestinale normale en plus de :

- L'inhibition des bactéries pathogènes (Ballangue, 1993) ;
- Atténuation des problèmes d'intolérance au lactose (Saint Laurent, 2002) ;
- Stimulation du système immunitaire de l'hôte sans réaction inflammatoire ;
- Réduction de la teneur sérique en cholestérol (Dilmi-Bouras, 2006 ; Dilmi-Bouras et *al.*, 2007) ;
- Amélioration de la valeur nutritionnelle (Vignola, 2002).

Les effets bénéfiques associés à la consommation des bactéries lactiques sont potentialisées lorsqu'elles sont ingérées vivantes, des arguments de plus en plus nombreux s'accumulent en faveur de cette hypothèse (Cherbut, 2001) et ces effets ont d'autant plus de chance d'exister quand les bactéries vivantes persisteront longtemps dans le tractus digestif avec un taux situé entre  $10^6$  à  $10^9$  cellules vivantes par ml (Bouhnik, 1993 ; Cherbut, 2001 ; Dilmi-Bouras et Sadoun, 2002b ; Marteau et *al.*, 2003).

Sans doute les conditions régnant au niveau du tube digestif représentées par l'acidité corrosive de l'estomac, la concentration élevée en sels biliaires dans le duodénum et la flore intestinale empêchent le passage des bactéries probiotiques qui possèdent une faible capacité de résister en face de ces barrières (Bouhnik, 1993 ; Desmazeaud, 1996 ; Dilmi - Bouras et Sadoun, 2002b) mais pour augmenter leur taux de survie, les probiotiques doivent être ingérés avec des vecteurs tel que les laits fermentés, les fromages, les yaourts, les boissons à base de lactosérum et les capsules de gélatine qui les protègent contre les barrières physiologiques (Saxelin et *al.*, 1995 ; Kailasapathy, 2002).

**CHAPITRE II : MATERIEL & METHODES**

L'ensemble de ce travail a été réalisé au :

- Laboratoire de bioressources naturelles locales (faculté des sciences agronomiques et des sciences biologiques de l'Université Hassiba Benbouali Chlef) ;
- Laboratoire d'hygiène de la wilaya de Chlef ;
- Laboratoire d'analyse biologique, El – chifaâ, Chlef.

**Partie 1: ETUDE DE LA SURVIE DES LACTOCOQUES DANS LES CONDITIONS EXTREMES DU TUBE DIGESTIF****1. Matériel****1.1. Matériel biologique**

➤ 20 souches bactériennes de *Lactococcus lactis* ont été isolées et identifiées par Nehal, (2006) au laboratoire bioressources naturelles locales de (U.H.B.Chlef). Le tableau 6 indique l'origine et la saison d'isolement des différentes souches lactiques.

**Tableau 6** : Les souches bactériennes utilisées dans l'étude

<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	Origine du prélèvement	Saison de prélèvement
<i>Lc lactis subsp lactis</i> 1 ( <i>Lc .l<sub>1</sub></i> )	Vache	Hiver
<i>Lc lactis subsp lactis</i> 2 ( <i>Lc .l<sub>2</sub></i> )	Vache	Hiver
<i>Lc lactis subsp lactis</i> 3 ( <i>Lc .l<sub>3</sub></i> )	Chèvre	Hiver
<i>Lc lactis subsp lactis</i> 4 ( <i>Lc .l<sub>4</sub></i> )	Chèvre	Hiver
<i>Lc lactis subsp lactis</i> 5 ( <i>Lc .l<sub>5</sub></i> )	Vache	Printemps
<i>Lc lactis subsp lactis</i> 6 ( <i>Lc .l<sub>6</sub></i> )	Vache	Printemps
<i>Lc lactis subsp lactis</i> 7 ( <i>Lc .l<sub>7</sub></i> )	Vache	Printemps
<i>Lc lactis subsp lactis</i> 8 ( <i>Lc .l<sub>8</sub></i> )	Vache	Printemps
<i>Lc lactis subsp lactis</i> 9 ( <i>Lc .l<sub>9</sub></i> )	Chèvre	Printemps
<i>Lc lactis subsp lactis</i> 10 ( <i>Lc .l<sub>10</sub></i> )	Vache	Eté
<i>Lc lactis subsp lactis</i> 11 ( <i>Lc .l<sub>11</sub></i> )	Vache	Eté
<i>Lc lactis subsp lactis</i> 12 ( <i>Lc .l<sub>12</sub></i> )	Chèvre	Eté
<i>Lc lactis subsp lactis</i> 13 ( <i>Lc .l<sub>13</sub></i> )	Chèvre	Eté
<i>Lc lactis subsp crémoris</i> 1 ( <i>Lc.c<sub>1</sub></i> )	Vache	Hiver
<i>Lc lactis subsp crémoris</i> 2 ( <i>Lc.c<sub>2</sub></i> )	Brebis	Hiver
<i>Lc lactis subsp crémoris</i> 3 ( <i>Lc.c<sub>3</sub></i> )	Brebis	Printemps
<i>Lc lactis subsp lactis</i> biovar <i>diacétylactis</i> 1 ( <i>Lc.d<sub>1</sub></i> )	Vache	Printemps
<i>Lc lactis subsp lactis</i> biovar <i>diacétylactis</i> 2 ( <i>Lc.d<sub>2</sub></i> )	Chèvre	Printemps
<i>Lc lactis subsp lactis</i> biovar <i>diacétylactis</i> 3 ( <i>Lc.d<sub>3</sub></i> )	Brebis	Printemps
<i>Lc lactis subsp lactis</i> biovar <i>diacétylactis</i> 4 ( <i>Lc.d<sub>4</sub></i> )	Vache	Hiver

Source : Nehal, (2006).

## 1.2. Milieux de culture

- Milieu gélosé M17 (référence : DIFCO 218561) ;
- Bouillon M17 (référence : DIFCO 218561) ;
- Lait en poudre Celia (Craon France).

### 1.3. Produits et réactifs

- Colorants et indicateurs colorés (Bleu de méthylène, Fushine de Ziehl , Violet de gentiane, phénophtaléine) ;
- Alcool (90 et 96°) ;
- Huile de vaseline stérile ;
- Eau oxygénée ;
- NaOH (1/9 N) ;
- Acide chlorhydrique concentré ;
- Solution physiologique de NaCl ;
- Sels biliaires en poudre : (référence 4054, Merck).

### 1.4. Appareillage

- Centrifugeuse ; Agitateur magnétique ;
- Microscope optique ; pH mètre à affichage numérique ;
- Compteur des colonies ; Balance électronique ; Etuves.

## 2. Méthodes

### 2.1. Repiquage, revivification et vérification de la pureté des souches bactériennes

Les souches conservées à -20°C sont décongelées et mises dans le lait écrémé reconstitué à 16% ; puis repiquées plusieurs fois sur leurs milieu sélectif d'enrichissement (M17).

La méthode utilisée pour examiner la pureté des souches est celle préconisée par plusieurs auteurs Dellaglio, (1994), Bourgeois et *al.*, (1996) et Larpent, (2000), elle consiste à :

- ensemercer, après repiquage, 1ml en surface sur gélose M17 avec la méthode des stries et incubé 24 h à 30°C,
- après incubation, la pureté des souches est confirmée par des examens macroscopiques et microscopiques (coloration simple au bleu de méthylène et coloration de Gram) et des tests biochimiques comme il est consigné dans le tableau 7.

**Tableau 7** : Tests biochimiques réalisés pour vérifier la pureté des souches

Tests	Mode opératoire	Observation des tests positifs
Culture aux différentes températures	5 ml de bouillon M 17 sont ensemencés et incubés à 30, 37 et 45°C / 72h et à 10°C/10 j.	Trouble
Thermo résistance	Ensemencer 5 ml de bouillon M17 et mettre au bain marie à 60°C/30 min. refroidir et incuber à 30°C/24 h.	Trouble
Croissance en milieu alcalin	Ensemencer 5 ml de bouillon M17 à pH 9,6 et incuber à 30°C pendant 24 h.	Trouble
Croissance sur lait tournesolé	Lait tournesolé ensemencé à raison de 1 % et incubé à 30°C pendant 48 h.	- virage au rose avec coagulation-acidification due à la fermentation du lactose. -Décoloration de l'indicateur due à la réduction
Croissance sur lait bleu de Sherman	Ensemencer le lait écrémé stérile à 1 % de bleu de méthylène et incuber à 30°C /48 h.	Coagulation du lait
Recherche de la catalase	Une colonie microbienne + une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes.	Effervescence
Type fermentaire	Ensemencer le milieu Gibson et Abdelmalek et couvrir par une couche de gélose blanche stérile formant un bouchon et incuber à 30°C/10 j.	Montée de la gélose blanche vers le haut du tube due à une hétéro fermentation
Production d'acétoïne	Ensemencer 5 ml de lait écrémé stérile, après 24 h d'incubation, introduire 2 ml de la culture obtenue dans un tube stérile ; ajouter 2 ml d'une solution de NaOH à 40% (P/V) et une trace de créatine.	Coloration rose après 30 minutes à température ambiante
Fermentation des sucres	Ensemencer un milieu pour fermentation sucrée par quelques gouttes de solution stérile de sucre (5 g/l) et incuber à 30°C pendant 48 h.  Les sucres testés sont le glucose, le saccharose, l'arabinose, le maltose, le xylose, le lactose, le galactose, le raffinose et la salicine.	L'indicateur vire au jaune dans le tube où le sucre est fermenté.

*Source* : Guiraud, (1998).

## 2.2. Étude du pouvoir acidifiant des souches lactiques pures

Afin de sélectionner des souches bactériennes satisfaisantes sur le plan technologique l'étude du pouvoir acidifiant est nécessaire. Ce dernier est effectué par le suivi de l'acidité Dornic d'un lait pasteurisé ensemencé par 1% de la souche pure de *Lactococcus lactis* à différents intervalles de temps 0 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h et après incubation à 30°C.

## 2.3. Étude de la survie des souches pures dans les conditions extrêmes du tube digestif

Le but de cette étude est de sélectionner des souches lactiques extrêmophiles qui peuvent résister aux barrières physiologiques du tube digestif (pH stomacal bas, péristaltisme intestinale et concurrence bactérienne au niveau du gros intestin).

L'étude de la survie est réalisée selon la méthode suivante :

Les bouillons de croissance et les milieux de culture sont fraîchement préparés et divisés directement en deux fractions :

✓ La fraction 1 : sans sels biliaires , répartie en flacons et autoclavée à 120°C pendant 15 mn , puis additionnée d'acide chlorhydrique concentré jusqu'à obtention du pH désiré :

- pH 2,5 : représente le pH de l'estomac à jeûne.
- pH 4,3 : représente le pH de l'estomac au moment ou juste après le repas.
- pH 6,5 : représente le pH au niveau des intestins.

✓ La fraction 2 : est additionnée de 0,3 % de sels biliaires, après son autoclavage à 120°C pendant 15 mn. Le pH est ajusté comme précédemment décrit.

Les bouillons de croissance sont ensuite répartis dans des tubes stériles à raison de 10 ml par tube.

A ces différentes fractions sont additionnées : 3 % d'inoculum d'une souche lactique pure. Ces fractions sont ensuite incubées à 37°C où la croissance des ferments est contrôlée par dénombrement sur boîtes de Pétri pendant les intervalles de temps suivants : 0 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h et 72 h.

## 2.4. Survie des espèces bactériennes extrêmophiles en présence de la flore intestinale

Pour estimer le nombre des bactéries qui atteignent l'intestin après leur passage à travers l'estomac, il faut préparer un bouillon M17 à pH 6,5 additionné de 3 % d'inoculum d'une flore intestinale standard obtenu à partir des selles d'un enfant âgé de huit ans. Ce milieu est inoculé par 3 % d'inoculum d'une souche lactique pure qui a été préalablement cultivée dans un milieu M17 à pH 4,3 pendant 3 h.

Le suivi de la survie des lactocoques en présence des espèces de la flore intestinale est réalisé par des dénombrements successifs à différents intervalles de temps : 0, 3, 6, 24, 48 et 72 h.

## 2.5. Étude du pouvoir acidifiant et de la survie des associations bactériennes

A partir des meilleurs résultats, un criblage bactérien a permis de sélectionner des souches pure extrêmophiles qui ont servi à préparer des associations constituées d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, une de *Lactococcus lactis* subsp *crémoirs* et une de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacétylactis*. La survie de ces combinaisons bactériennes est étudiée comme précédemment décrit.

## **Partie 2 : ISOLEMENT, IDENTIFICATION ET DENOMBREMENT DES ESPECES DE LA FLORE INTESTINALE RESIDENTE**

La flore intestinale se caractérise par une grande densité et diversité et est implantée essentiellement au niveau colique. Cette étude est réalisée par les analyses de routine de la flore physiologique qui se limitent aux germes cultivables et dont les fonctions dans l'écosystème intestinal sont connues. Elle consiste à isoler les espèces qui figurent dans la matière fécale.

### 1. Matériel

#### 1.1. Matériel biologique

Selles fraîches d'un enfant en bonne santé âgé de 8 ans.

#### 1.2. Milieux de culture

- Milieu Gibson et Abdelmalek (Institut Pasteur. Alger),
- Milieu Müeller – Hinton agar (Institut Pasteur. Alger),
- Gélose EMB (Eosine méthyle bilié) (Institut Pasteur. Alger),

- Gélose Héktoen (Institut Pasteur. Alger),
- Gélose nutritive (Institut Pasteur. Alger),
- Milieu MRS (MAN ROGOSA et SCHARP),
- Milieu MRS cystéine,
- Bouillon nutritive (Institut Pasteur. Alger),
- Gélose au sang (Institut Pasteur. Alger),
- Milieu VF (gélose viande foie) (Institut Pasteur. Alger),
- Galeries API 20 E (Biomérieux 69280 Marry France),
- Lait cystéine,
- Milieu BCP (Institut Pasteur. Alger),
- Gélose Columbia (Institut Pasteur. Alger),
- Gélose Slanetz et Bartley (Institut Pasteur. Alger),
- Galerie biochimique classique (mannitol mobilité- citrate simmons-  
bouillon nitraté- bouillon ADH, LDC, ODC – milieu MEVAG sans sucre – eau peptonée  
exempte d'indole).

### 1.3. Produits et réactifs

- Colorants et indicateurs colorés (Bleu de méthylène, Fuschine de Ziehl ,  
Violet de gentiane, phénophtaléine)
- Alcool (90 et 96°),
- Huile de paraffine,
- Huile de vaseline,
- Eau oxygénée,
- Solution physiologique de NaCl,
- Solution stérile de sucres (adonitol, glycérol et sorbose
- Réactif pour la lecture des galeries (Réactif du kovacs, Acide  
sulfanilique,  $\alpha$  naphthamine, réactif TDA, réactif VP1 et VP2).

### 2. Méthodes

Les principales espèces de la flore intestinale recherchées dans les selles sont représentées dans le tableau 8.

**Tableau 8 :** Espèces recherchées dans les selles

Type respiratoire	Germes résidents recherchés
Germes aérobies	<i>E.coli</i>
	<i>Enterococcus spp</i>
Germes micro aérophiles	<i>Lactobacillus spp</i>
Germes anaérobies stricts	<i>Bacteroides</i>
	<i>Bifidobacterium spp</i>
	<i>Clostridium spp</i>

## 2.1. Isolement, identification et dénombrement des espèces intestinales aérobies et aéroanaérobies facultatifs

### 2.1.1. *E. coli* et *Enterococcus spp*

L'isolement d' *E. coli* et d' *Enterococcus spp* , principale flore aérobie de l'intestin est facilement réalisable sur milieux ordinaires, compte tenu qu'il n'y a pas, à l'état normal, d'exigences particulières pour leur multiplication. La méthode d'isolement à partir des selles consiste, selon Bernard et Reynaud, (2003) à :

- dissoudre 1g de selles fraîches prélevés stérilement dans 9 ml d'eau physiologique,
- homogénéiser et filtrer la solution par un papier filtre stérile,
- préparer plusieurs dilutions décimales (jusqu'à  $10^{-6}$ ) à partir de cette solution,
- à partir de chaque dilution, ensemercer par stries le milieu EMB pour *E. coli* et le milieu Slanetz et Bartley pour les entérocoques,
- incuber à 37°C pendant 24 heures.

L'identification de ces deux espèces bactériennes repose sur l'étude des caractères cultureux (aspect des colonies), morphologiques (examens microscopiques) et biochimiques à l'aide des galeries API 20E qui sont utilisées comme suit :

- introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes), poser la pointe de la pipette sur le coté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation, vers l'avant,
- pour les tests CIT, VP, et GEL, remplir tube et cupule,

- pour les autres tests remplir uniquement les tubes (non les cupules).
- Pour les tests ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine,
- refermer la boîte d'incubation,
  - incuber à 37°C pendant 24 h.

Les caractères donnés par les galeries ainsi que la lecture des résultats sont mentionnées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Les caractères biochimiques étudiés par les galeries API 20 E

Tests	Composants actifs	Quantité	Réactions/enzymes	Résultat Négatif	Résultat Positif
<b>ONPG</b>	2-nitrophénol.βd galactopyranosidase	0,223	B galactosidase (ortho nitro phényl β Dgalactopyranosidase)	Incolore	Jaune
<b>ADH</b>	L- arginine	1,9	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/ orangé
<b>LDC</b>	L- lysine	1,9	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge/ orangé
<b>ODC</b>	L-ornithine	1,9	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/ orangé
<b>CIT</b>	Trisodium citrate	0,756	Utilisation du citrate	Vert pâle/ Jaune	Bleu vert/bleu
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Sodium thiosulfate	0,075	Production d' H <sub>2</sub> S	Incolore/ Grisâtre	Dépôt noir/ fin liseré
<b>URE</b>	Urée	0,76	Uréase	Jaune	Rouge orangé
<b>TDA</b>	L-tryptophane	0,38	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron rougeâtre
<b>IND</b>	L- tryptophane	0,19	Production d'indole	Incolore/vert pale	Rose
<b>VP</b>	Sodium pyruvate	0,6	Production d'acétoïne (vogue proskauer)	Incolore	Rose/rouge
<b>GEL</b>	Gélatine (origine bovine)	1,9	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
<b>GLU</b>	D- glucose	1,9	Fermentation/oxydation du glucose	Bleu /bleu vert	Jaune/jaune gris
<b>MAN</b>	D-mannitol	1,9	Fermentation/oxydation du mannitol	Bleu /bleu vert	jaune
<b>INO</b>	Inositol	1,9	Fermentation/oxydation du inositol	Bleu /bleu vert	jaune
<b>SOR</b>	D- sorbitol	1,9	Fermentation/oxydation du sorbitol	Bleu /bleu vert	jaune
<b>RHA</b>	L- mannose	1,9	Fermentation/oxydation du mannose	Bleu /bleu vert	jaune
<b>SAC</b>	D- saccharose	1,9	Fermentation/oxydation du saccharose	Bleu /bleu vert	jaune
<b>MEL</b>	D- melibiose	1,9	Fermentation/oxydation du melibiose	Bleu /bleu vert	jaune
<b>AMY</b>	Amygdaline	0,57	Fermentation/oxydation du amygdaline	Bleu /bleu vert	jaune
<b>ARA</b>	L- arabinose	1,9	Fermentation/oxydation d'arabinose	Bleu /bleu vert	jaune

Le dénombrement d' *E. coli* et d'*Enterococcus ssp* aura lieu par un ensemencement en masse du milieu EMB, Slanetz et Bartley respectivement.

### 2.1.2. *Lactobacillus ssp.*

Les lactobacilles représentent la flore micro-aérophiles et leur isolement consiste à ensemer en surface le milieu MRS à partir des dilutions décimales préparées précédemment. L'ensemencement est suivi d'une incubation de 24h à 37°C. L'étude des caractères culturels, morphologiques et biochimique se fait de la même façon résumée dans le tableau 10.

**Tableau 10 :** Caractères d'identification des Lactobacilles

Examen	Technique	Observation des Résultats positifs
Macroscopique	Examen direct des colonies bactériennes	Colonies blanchâtres légèrement allongées
Microscopique	Examen à l'état frais Coloration simple et coloration de GRAM	Bacilles Gram positif
Recherche de la catalase	Ajouter une goutte de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur une culture dans milieu solide	Effervescence
Oxydase	Ajouter un disque OX qui est imprégné de DPD à une culture bactérienne	Couleur rouge
Mobilité	Ensemencer le milieu mannitol mobilité par piqûre centrale à partir d'une culture bactérienne sur boîte de pétri	Envahissement du milieu
Production du gaz à partir du glucose	Ensemencer les bactéries dans un bouillon MRS contenant une cloche de Durham, recouvrir le tube par une couche d'huile de vaseline stérile et incuber à 37°C pendant 24 h	La cloche contient du gaz
Dégradation des sucres (glucose, raffinose, fructose, saccharose, galactose, mannose et mélibiose)	Additionner 4 gouttes de sucre recherché à une eau peptonée contenant le rouge de phénol puis ensemer cette dernière à partir d'une culture bactérienne et incuber à 37°C pendant 24 h	Virage de la couleur rouge vers le jaune ou l'orange due à l'acidification du milieu

Source : Guiraud, (1998).

Le dénombrement des Lactobacilles se fait par un ensemencement en masse du milieu MRS à 37°C pendant 48 h.

### 2.3. Isolement, identification et dénombrement des espèces anaérobies strictes

Les *Bifidobactéries*, les *Clostridium* et les *Bacteroides* sont des bactéries anaérobies strictes qui ne peuvent se cultiver qu'en absence de l'oxygène ce qui nécessite l'utilisation des techniques bactériologiques inhabituelles, en absence d'oxygène aussi bien lors du prélèvement, du transport, de culture et d'isolement. Ces contraintes techniques peuvent expliquer les difficultés rencontrées lors de l'isolement de ces espèces.

#### 2.3.1. Les Bifidobacteries

Les bifidobacterium sont des espèces bactériennes anaérobies strictes et leur isolement nécessite une incubation dans des jarres d'anaérobiose.

- Dissoudre 1g de selles fraîches dans 9 ml d'eau physiologique,
- filtrer la solution par utilisation de papier filtre stérile,
- préparer des dilutions décimales (jusqu'à  $10^{-9}$ ) à partir de cette solution,
- ensemencer par la technique de double couche 1 ml de chaque dilution dans une boîte de Pétri,
- couler le milieu MRS cystéiné,
- incuber en anaérobiose les boîtes ensemencées à 37°C pendant 48 h,
- après 48 h d'incubation les examens portés dans le tableau 10 sont réalisés pour identifier les formes bactériennes obtenues.

**Tableau 11** : Tests d'identification des Bifidobactéries

Examen	Technique	Observation des Résultats positifs
Macroscopique	Examen direct des colonies.	Colonies lisses, punctiformes à contour irrégulier
Microscopique	Coloration simple. Coloration de Gram.	Bâtonnets incurvés en V ou en Y, Gram positif
Croissance en aérobiose	Incubation en aérobiose pendant 72 h du bouillon MRS cystéiné ensemencé par des colonies bactériennes.	Trouble

Catalase	Colonie + 1 goutte d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	effervescence
Mobilité	Ensemencement par piqûre centrale de milieu mannitol mobilité.	envahissement du milieu
Production de gaz à partir du glucose	Ensemencement des bactéries dans le milieu MRS cystéiné + cloche du durham + une couche d'huile de vaseline stérile et incuber à 37°C pendant 48h.	la cloche contient remonte en surface
Production d'indole	1 ml de culture de bifidobactéries sur milieu MRS cystéiné est inoculé dans un tube d'eau peptonée exempte d'indole + huile de vaseline ; incuber en anaérobiose à 37°C /48h ; après incubation ajouter quelques gouttes de réactif du kovacs	Apparition d'un d'anneau rouge
Réduction des nitrates	Ensemencement des tubes de bouillon nitrate + une couche de vaseline ; incuber à 37°C/48h, après incubation, il faut ajouter les réactifs suivants (3 à 4 gouttes d'acide sulfanilique puis 3 à 4 gouttes d' α naphthamine.	Apparition d'une couleur rose (réduction des nitrates)
Coagulation du lait cystéiné	1 ml de suspension épaisse de bifidobactéries est inoculé dans le lait cystéiné, incuber à 37°C /24h	Coagulation du lait
Tests de fermentation des sucres	10 ml de MRS cystéine (bouillon) estensemencée avec une colonie de bifidobactérie ensuite incuber à 37°C pendant 48h. Après 48h d'incubation, centrifuger à 3000tr/min pendant 15mn - récupérer le culot et le rincer 3 fois à l'eau physiologique - ensemer les tubes contenant le BCP par 1% d'une suspension bactérienne épaisse puis additionner 1ml d'une solution stérile de sucres à 10% (adonitol, glycérol et sorbose) puis ajouter une couche de vaseline stérile - incuber à 37°C pendant 48h	Changement de la couleur due à l'acidification du milieu

La charge des bifidobactéries dans les selles est estimée par un ensemencement en masse du milieu MRS cystéiné.

### 2.3.2. Isolement, identification et dénombrement de *Clostridium ssp*

Les selles sont analysées rapidement de la même façon précédente mais exception faite, l'ensemencement se fait en surface dans le milieu gélose au sang de cheval et l'incubation dans des jarres d'anaérobiose pendant 120 heures.

Après incubation, l'identification proprement dite des espèces est réalisée par des tests culturels, microscopiques et biochimiques comme il est indiqué dans le tableau 12.

**Tableau 12 :** Tests biochimiques caractéristiques de *Clostridium ssp*.

Examen	technique	Observation des Résultats positifs
Macroscopique	Etude directe des colonies.	
Microscopique	Examen direct et coloration de GRAM.	Bacilles Gram positif
Catalase	Ajouter une goutte de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur une culture dans milieu solide .	Effervescence
Oxydase	Ajouter un disque OX qui est imprégné de DPD à une culture bactérienne.	Couleur rouge
Production d'indole	Ensemencer en masse par piqûre centrale le milieu VF, après incubation pendant 24h ajouter quelques gouttes du réactif de kovacs.	Apparition de couleur rose
Recherche de la nitrate réductase	Ensemencer le milieu nitrate-mobilité par une piqûre centrale ensuite incuber en anaérobiose pendant 48h, après incubation additionner 5 gouttes du réactif nitrate réductase I et 5 gouttes du réactif nitrate réductase II.	Couleur rouge (réduction du nitrate en nitrite)
Production d'hydrogène sulfureux	Ensemencer le milieu VF additionner de 0,2 g/l de sulfate ferreux et de 0,3 g/l d'hyposulfite de sodium ensuite incuber en anaérobiose à 37°C pendant 48 h.	La production d'hydrogène sulfureux provoque le noircissement du milieu

Recherche de l'uréase	Ensemencer le milieu VF additionné de 10 g/l d'urée ensuite incubé en anaérobiose à 37°C pendant 48 h.	La présence de l'uréase est caractérisée par une alcalinisation décelable par l'adjonction d'un indicateur coloré (le rouge de phénol)
Recherche de lécithinase	Ensemencer en stries le milieu de Willis et Hoops par des colonies bactériennes puis incubé en anaérobiose à 37°C pendant 24h.	Le virage au jaune du réactif traduit la fermentation du lactose et l'éclaircissement du jaune d'œuf autour des colonies et un précipité en halo traduit la dégradation de la lécithine
Fermentation des sucres	Après régénération du milieu VF, additionner de 1 % d'une solution sucrée de concentration 5 % (maltose, saccharose, lactose, xylose, glycérol, salicine amidon) et ensemer par une piqûre centrale ce milieu, après 24 h d'incubation à 37°C additionner 10 gouttes de l'indicateur coloré universel Prolabo. Faire toujours des témoins sans sucres.	L'acidification se traduit par le virage au rouge du milieu si la quantité d'acide est importante et au jaune si elle est faible
Hydrolyse de la gélatine	Ensemencer le milieu de Rosenow contenant un disque de gélatine de corhn au charbon par une colonie de Clostridium, recouvrir par une couche d'huile de vaseline pour créer l'anaérobiose ensuite incubé à 37°C pendant 48 h.	La dégradation de la gélatine se traduit par la libération des particules de charbon

Source : Philippon et Dubreuil, (2007).

Le dénombrement des *Clostridium ssp* se fait par un ensemencement en masse du milieu.

### 2.3.3. Isolement, identification et dénombrement de *Bacteroides ssp*

Après la préparation de la matière fécale, un ensemencement en surface du milieu gélose au sang est réalisé pour l'obtention des colonies de *Bacteroides ssp*. L'ensemencement est suivi par une incubation dans des jarres d'anaérobiose pendant 120 h à 37°C.

L'identification de genre bactérien est basée sur :

- l'étude des caractères microscopique et macroscopiques,
- la recherche de l'oxydase et de la catalase,
- réduction des nitrates et hydrolyse de la gélatine (même méthode utilisée pour les *Clostridium*).
- Production d'hydrogène sulfureux : elle est mise en évidence par ensemencement du milieu sulfate du fer par une colonie de *Bifidobacterium*, la production d'H<sub>2</sub>S se traduit après incubation à 37°C pendant 48 h par un noircissement au niveau de l'inoculation.
- Production d'indole : elle est mise en évidence en ensemencant une eau peptonée exempte d'indole par une colonie bactérienne. Le tube doit être recouvert par une couche d'huile de vaseline et l'incubation se fait en anaérobiose à 37°C pendant 48 h. L'ajout de réactif du Kovacs est nécessaire pour l'apparition de l'anneau rouge dans le cas des tests positifs.
- Fermentation de l'esculine : elle est mise en évidence par l'addition de 0,5% d'esculine au milieu de mœller. Ce dernier est ensemencé par piqûre centrale à partir d'une colonie bactérienne isolée sur boîte de Pétri. Après une incubation de 48 h à 37°C, le milieu vire vers le jaune si le résultat est positif.
- Croissance en présence de 20% de sels biliaires : ce test nécessite l'ajout de 20% de sels biliaires à une gélose au sang. Après ensemencement de ce milieu en surface et incubation de 24 h à 37°C, le test est mentionné positif s'il y a croissance bactérienne.

Le dénombrement des *Bacteroides ssp* se fait par un ensemencement en masse du milieu gélose au sang.

### **Partie 3 : ETUDE DE L'INTERACTION DE *LACTOCOCCUS LACTIS* SSP ET DES ESPECES ISOLEES DE LA FLORE INTESTINALE RESIDENTE**

#### **1. Matériels**

##### **1.1. Matériels biologiques**

- Souches lactiques extrêmophiles
- Espèces de la flore intestinale identifiées dans la deuxième partie

##### **1.2. Milieux de culture**

- Milieu Müeller – Hinton agar, Bouillon de croissance,
- Bouillon M17, Bouillon TSB (tryptic soja bilié),
- Bouillon MRS, Bouillon MRS cystéine,

##### **1.3. Autres matériels**

- Disques en papier buvard stérile, étuve réglée à 37°C, jarres d'anaérobiose.

#### **2. Méthodes**

Les méthodes utilisées pour étudier l'interaction entre les lactocoques et les espèces de la flore intestinale résidente sont basées sur la diffusion des substances responsables de l'interaction dans des milieux de culture solide ou semi solide pour inhiber ou stimuler la croissance d'un microorganisme indicateur sensible.

##### **2.1. Préparation des pré – cultures**

Les bactéries lactiques sontensemencées dans des tubes qui contiennent 9 ml de milieu M17, les tubes sont incubés pendant 18 h à 30°C, des dénombrements successifs ont été réalisés dans les intervalles de temps croissant (0 h, 2 h, 6 h et 18 h), afin de déterminer le taux de croissance des bactéries et de connaître la charge initiale d'inoculation.

Les autres espèces bactériennes représentatives de la flore intestinale résidente qui sont isolées, identifiées et dénombrées dans la deuxième partie sont utilisées comme souches cibles. Ces dernières sont repiquées dans leurs milieux de croissance sélectifs et incubées à 37°C pendant 18 h en aérobie pour les espèces aérobie (*E. coli* et *Enterococcus ssp.* et *lactobacillus ssp.*) et en anaérobiose pour les espèces anaérobies strictes (*Clostridium ssp.* et *Bactéroides ssp.*).

Après incubation, quelques colonies sont reprises à partir de chaque espèce dans des bouillons de croissance sélectifs comme il est indiqué dans le tableau 13 et incubées

à 37°C pendant le temps nécessaire pour que la charge bactérienne de chaque espèce atteigne les valeurs trouvées dans les selles.

**Tableau 13** : Les souches cibles et leurs bouillons de croissances

<b>Espèces bactériennes</b>	<b>Bouillons de croissance</b>
<i>Escherichia coli</i>	Bouillon de croissance
<i>Entérocooccus spp</i>	Bouillon de croissance
<i>Clostridium spp</i>	Milieu VF liquide
<i>Bactéroïdes spp</i>	Bouillon de croissance
<i>Bifidobactérium spp</i>	Bouillon MRS cystéine
<i>Lactococcus spp</i>	Bouillon MRS

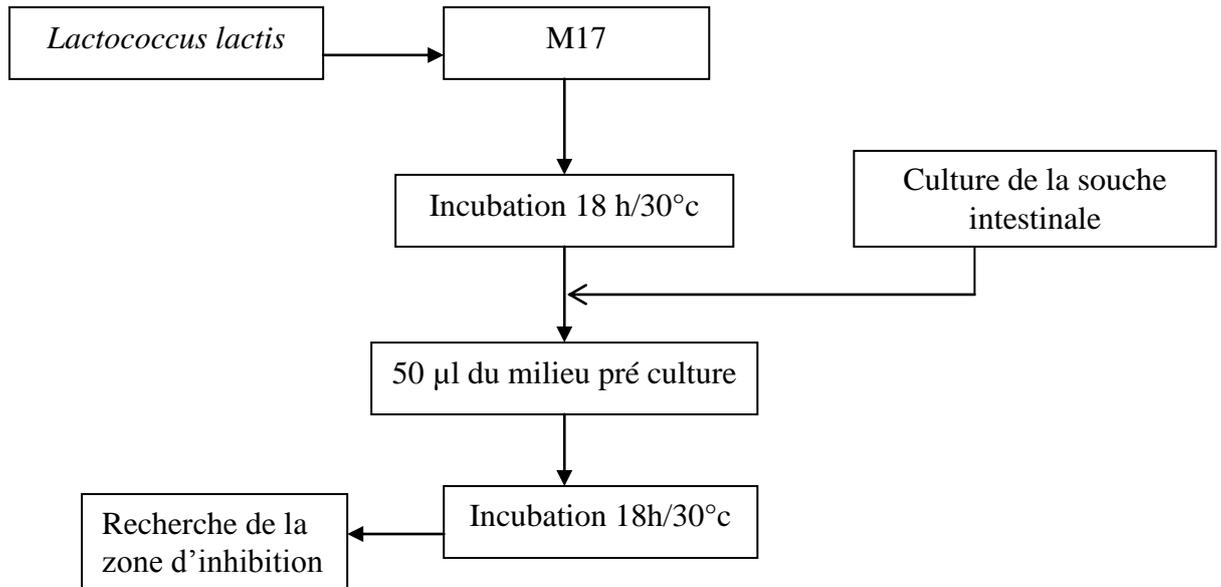
## 2.2. Méthode de disque ou porte germe

Cette méthode est utilisée pour étudier l'interaction des lactocoques avec les espèces aérobie et micro aérophile de la flore intestinale (*Escherichia coli*, *Entérocooccus spp.* et *Lactobacillus spp.*). Elle consiste selon Tadesse et al. (2004) à :

- inonder en surface les boîtes de Pétri contenant le milieu MHA par quelques millilitres des pré cultures de la souche intestinale (souche indicatrice),
- laisser sécher les boîtes pendant 30 min à 37°C,
- après séchage, déposer à la surface de la gélose des disques de papier buvard stérile et préalablement imprégnés par la pré culture des bactéries lactiques,
- sécher pendant 30 min,
- mettre les boîtes à 4°C pendant 4h pour assurer la diffusion des substances responsables de l'interaction,
- enfin incuber les boîtes à 37°C pendant 24h.

L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques dont le diamètre est mesuré à partir du centre du disque en mm.

Le diagramme qui suit (figure 6) résume les principales étapes de la méthode :



**Figure 6 :** Diagramme d'étude de l'interaction selon la méthode de porte germes

### 2.3. Localisation de la substance inhibitrice

A partir d'une culture des souches lactiques en milieu M 17 liquide, incubée pendant 24h à 37 °C, un volume de 50 ml de culture est centrifugé 10 min à 10 000 tours/min, les tests d'inhibitions sont réalisées comme précédemment citée à la fois sur le surnageant, représentant la fraction extracellulaire, et sur le culot, correspondant à la fraction cellulaire (Labioui, 2005).

### 2.4. Identification des substances responsables de l'interaction

Les lactocoques sont connus par leur capacité à produire deux catégories de substances antibactériennes (l'acide lactique et les bactériocines). Afin d'étudier l'effet et le pourcentage d'inhibition de chaque substance sur les espèces de la flore intestinale une méthode basée sur l'élimination d'un constituant au profit de l'autre est adaptée, elle est pratiquée selon les étapes suivantes :

#### 2.4.1. Préparation de la préculture bactérienne

Dans un erlenmeyer stérile,ensemencer 20 ml de M17 par les souches lactiques qui ont donnée les meilleurs inhibitions, ensuite agiter cette préculture à une vitesse de 100 tours /min et incubé à 30°C pendant 18 h.

### 2.4.2. Préparation de la culture proprement dite

La préculture déjà préparée est utilisée comme un inoculum à raison de 10% pour ensemençer 100 ml de M17 contenu dans un erlenmeyer de 500 ml, cette préparation est incubée à 37°C pendant 24 h.

### 2.4.3. Elimination de l'effet de l'acide lactique

Après 24 h d'incubation à 37°C, la culture bactérienne est centrifugée à une vitesse de 6000 tr/min pendant 2 min. Cette centrifugation est suivie par une filtration à l'aide d'un filtre de diamètre 0,45µm et va subir un ajustement du pH à 6,5 par la soude (NaOH) 1N afin d'éliminer l'effet de l'acide lactique (figure 7). Une étape de décoloration par le charbon actif est nécessaire pour éliminer les impuretés (Amrouche, 2003).

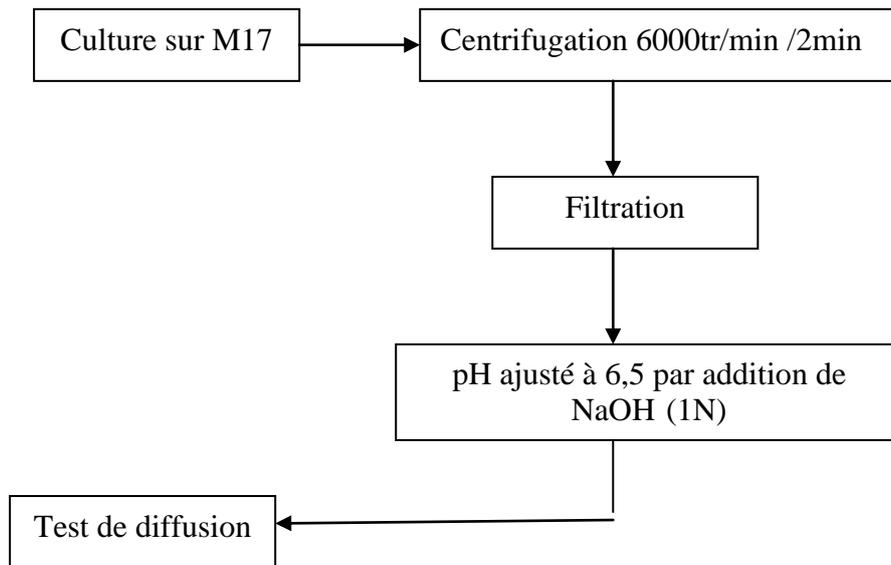
L'effet inhibiteur des bactériocines sur les espèces de la flore intestinale est testé par la méthode des disques indiquée préalablement. L'évaluation de pourcentage d'inhibition par les bactériocines est étudiée par la méthode spectrale de Grewal et al. (1998) dont le principe est basé sur la capacité de l'agent antimicrobien à inhiber la croissance de la souche cible dans un milieu liquide. Elle consiste à ajouter à 50 ml de bouillon nutritif 1 ml d'une suspension qui contient la souche cible et 1ml du surnageant, après une incubation de 4 h à 37 °C , la densité optique de la solution est mesurée.

Le pourcentage d'inhibition est déterminé selon l'équation suivante :

$$\text{Le \% d'inhibition} = \frac{(\text{DO}_f - \text{DO}_i) \cdot 100}{\text{DO}_i}$$

**DO<sub>f</sub>** : densité optique finale

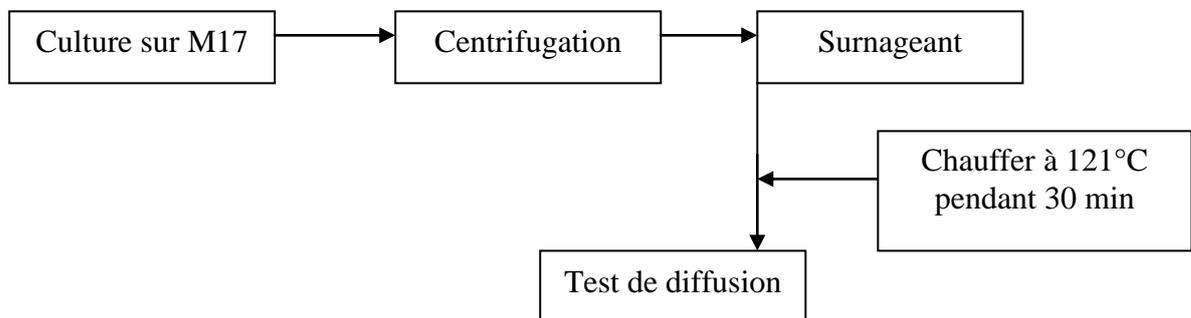
**DO<sub>i</sub>** : densité optique initiale



**Figure 7 :** Diagramme d'étude de l'interaction après l'élimination de l'effet de l'acide lactique

#### 2.4.4. Élimination de l'effet des bactériocines

Le surnageant obtenu après la centrifugation d'une culture bactérienne, préparé comme précédemment, est chauffé à 121°C pendant 30 min (figure 8). Ce surnageant est utilisé pour étudier son effet sur les espèces de la flore intestinale par la méthode des disques et le pourcentage d'inhibition est déterminé par la méthode de Grewal et *al.* (1998).



**Figure 8 :** Diagramme d'étude de l'interaction après l'élimination de l'effet des bactériocines

## **2.5. Effet des conditions du tube digestif sur l'action des bactériocines**

### **2.5.1. Effet du pH**

Mettre dans des tubes à essai 5 ml du surnageant après l'élimination de l'effet de l'acide lactique, ensuite ajuster les valeurs du pH de 1 à 9 (chaque tube est ajusté à une valeur) par l'addition du NaOH et/ou du HCl. Après 2 h d'incubation à 37°C, tester l'activité des surnageants vis-à-vis des espèces intestinales par la méthode de portes germe (Vinod Kumar et *al.*, 2006).

### **2.5.2. Effet des enzymes digestives**

Dans trois tubes à essai, mettre 5 ml du surnageant après l'élimination de l'effet de l'acide lactique, ensuite ajouter au premier tube 1 mg/ml de trypsine, au deuxième 1 mg/ml de pepsine A et au troisième 1 mg/ml de  $\alpha$  chymotrypsine, après 2 h d'incubation à 37°C l'activité des surnageants est testées par la même méthode (Vinod Kumar et *al.*, 2006).

## **2.6. Détermination de la charge des espèces intestinales après l'interaction par la méthode de culture mixte (co-culture)**

Cette méthode est utilisée pour calculer le nombre des espèces intestinales (indicatrices) après l'interaction. Elle est réalisée selon Haines et Harmon, (1973) par l'inoculation d'un bouillon de croissance (TSB) avec une souche intestinale dont le nombre des colonies est celui trouvé dans les selles et de la bactérie lactique dont la charge initiale est celle qui résulte de l'étude de la survie des lactocoques à pH 6,5 en présence de la flore intestinale.

Après incubation à 37°C, on procède à un dénombrement des bactéries lactiques et de la souche intestinale respectivement sur les milieux appropriés pendant les intervalles de temps : 0 h, 16 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 144 h, 168 h et 198 h.

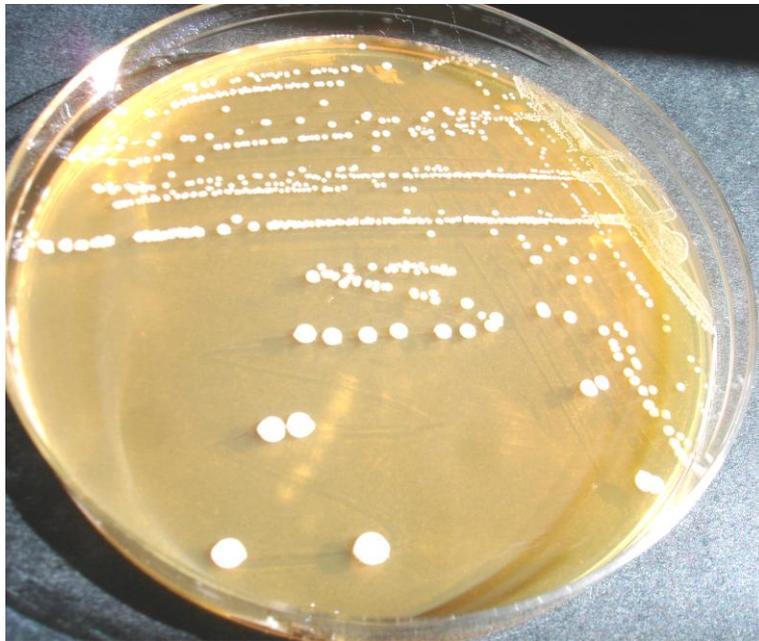
### **Validation statistique des résultats**

L'analyse statistique (analyse de la variance et de la probabilité) des résultats est réalisée à l'aide de programmes « Anova » en utilisant le logiciel XL Stat version 5.7 (2007). Nous avons effectué, d'une part, une analyse de variance, pour montrer la signification de nos résultats et d'autre part, la comparaison des moyennes, par le test de Newman-Keuls et de la probabilité (P).

## CHAPITRE III : RESULTATS &amp; DISCUSSIONS

**Partie 1 : ETUDE, *IN VITRO*, DE LA SURVIE DES LACTOCOQUES DANS DES CONDITIONS EXTREMES DU TUBE DIGESTIF****1. Revivification et vérification de la pureté des souches lactiques**

Les observations sur milieu M17 montrent qu'il y a croissance et que les colonies obtenues sont blanches, bien visibles de 2 à 3 mm de diamètre, elles se présentent sous forme allongée à contour régulier ou sous forme arrondie à contour flou (figure 9).



**Figure 9:** *Lactococcus lactis* pure sur boîte de pétri

Vue au microscope optique après coloration de Gram, les souches sont Gram + disposées en diplocoques ou en chaînettes plus ou moins longues. Elles ne possèdent pas de catalase, elles sont homofermentaires, ne se développent pas dans un bouillon à pH 9,6 ni dans un bouillon contenant 6,5% de NaCl. Elles peuvent croître à 10°C en moins de 10 jours d'incubation mais pas à 45°C après 48 h, elles réduisent, acidifient puis coagulent le lait tournesolé en 48 h au maximum.

A partir des résultats obtenus et qui sont conformes à ceux trouvés par Guiraud, (1998) et Amrouche, (2003) nous pouvons conclure que les souches de streptocoques lactiques isolées par Nehal, (2006) sont pures prêtes à être utilisées dans les expériences.

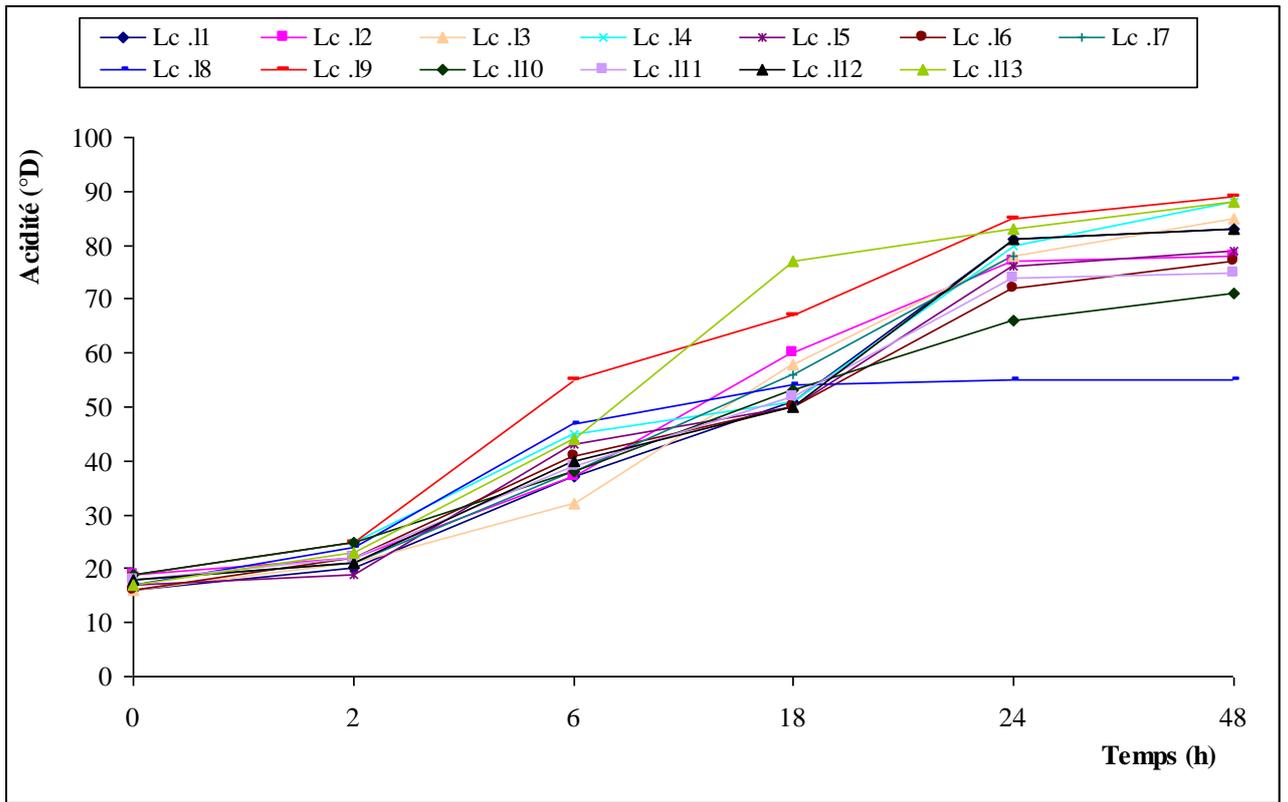
## 2. Pouvoir acidifiant des souches lactiques

La qualité d'un produit laitier fermenté reste toujours le souci des chercheurs, des producteurs et des consommateurs, elle dépend en premier lieu du pouvoir acidifiant de ses ferments qui est un caractère de sélection très important ; car des souches fortement acidifiantes limitent la durée de conservation du produit fini et des souches faiblement acidifiantes sont à l'origine de défauts de qualité où elles provoquent, pour les fromages par exemple, un égouttage insuffisant et un risque de contamination par d'autres flores.

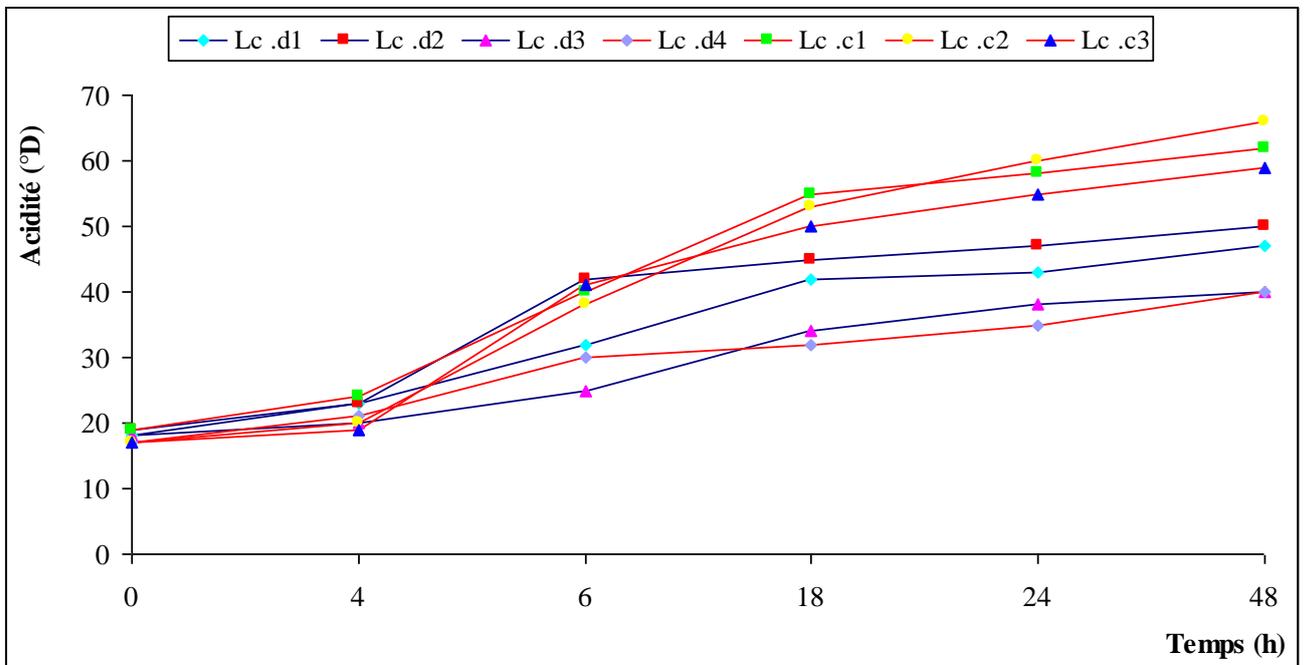
Afin de sélectionner des souches lactiques intéressantes du point de vue technologique, l'étude du pouvoir acidifiant s'est avérée importante. Elle est évaluée par le suivi de l'acidité Dornic d'un laitensemencé par une souche pure de *Lactococcus lactis* incubé à 30°C pendant les intervalles du temps suivant : 0, 2, 6, 18, 24 et 48 heures.

Les valeurs d'acidité trouvées montrent des variations plus ou moins importantes entre les différentes sous espèces. Elle varie entre 16 et 20°D à 0 h et reste presque inchangée après 3h d'incubation ce qui s'explique par l'adaptation des souches aux conditions du milieu (phase de latence).

Après 6 h d'incubation, l'acidité commence à augmenter progressivement et varie de 37 à 50°D pour la sous espèce *lactis*, 32 à 45 pour *cremoris* et 30 à 42 pour le biovar *diacetylactis*. Au-delà de 24 h d'incubation, les valeurs d'acidité Dornic augmentent fortement pour atteindre : 81°D pour *Lc .l<sub>1</sub>* et *Lc .l<sub>12</sub>*, 83 pour *Lc .l<sub>13</sub>* et 85°D pour *Lc .l<sub>7</sub>* et *Lc .l<sub>9</sub>* (figure 10). Ces valeurs sont très intéressantes mais n'excluent pas le pouvoir acidifiant des autres souches. Les sous espèces de *Diacetylactis* sont faiblement acidifiantes et l'acidité Dornic reste inférieure à 50°D après 48h d'incubation (figure 11).



**Figure 10** : Evolution de l'acidité Dornic à 30°C, en fonction du temps, des cultures pures de *Lactococcus lactis subsp. lactis*.



**Figure 11** : Evolution de l'acidité Dornic à 30°C, en fonction du temps, des cultures pures de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* et *Lactococcus lactis subsp. lactis* biovar *diacetylactis*.

D'après les résultats trouvés, nous avons constaté que les souches de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* sont plus acidifiantes que celles de *cremoris* et *diacetylactis*, ceci est en parfaite concordance avec les résultats de Cogan, (1980).

Comparativement aux résultats trouvés par Nehal, (2006), le pouvoir acidifiant des souches lactiques reste toujours dans le même intervalle avec un écart type de 5°D pour la totalité des ferments, ceci est expliqué par la capacité des lactocoques à développer une réponse adaptative au froid qui est due selon Rallu et *al.* (2000) à la synthèse de protéines de bas poids moléculaire (CSPs : cold shock proteins et CIPs : cold induced proteins) qui agissent comme des chaperonnes de l'ARN en facilitant la transcription et la traduction à faible température. Cette propriété préserve les caractères génétiques et les aptitudes technologiques des souches avec le temps.

Les 20 souches lactiques possèdent des capacités acidifiantes intéressantes et vont être toutes utilisées dans l'étude de la survie dans les conditions extrêmes du tube digestif.

### **3. Survie, *in vitro*, des souches lactiques pures à différents pH en absence et en présence de sels biliaires et de la flore intestinale**

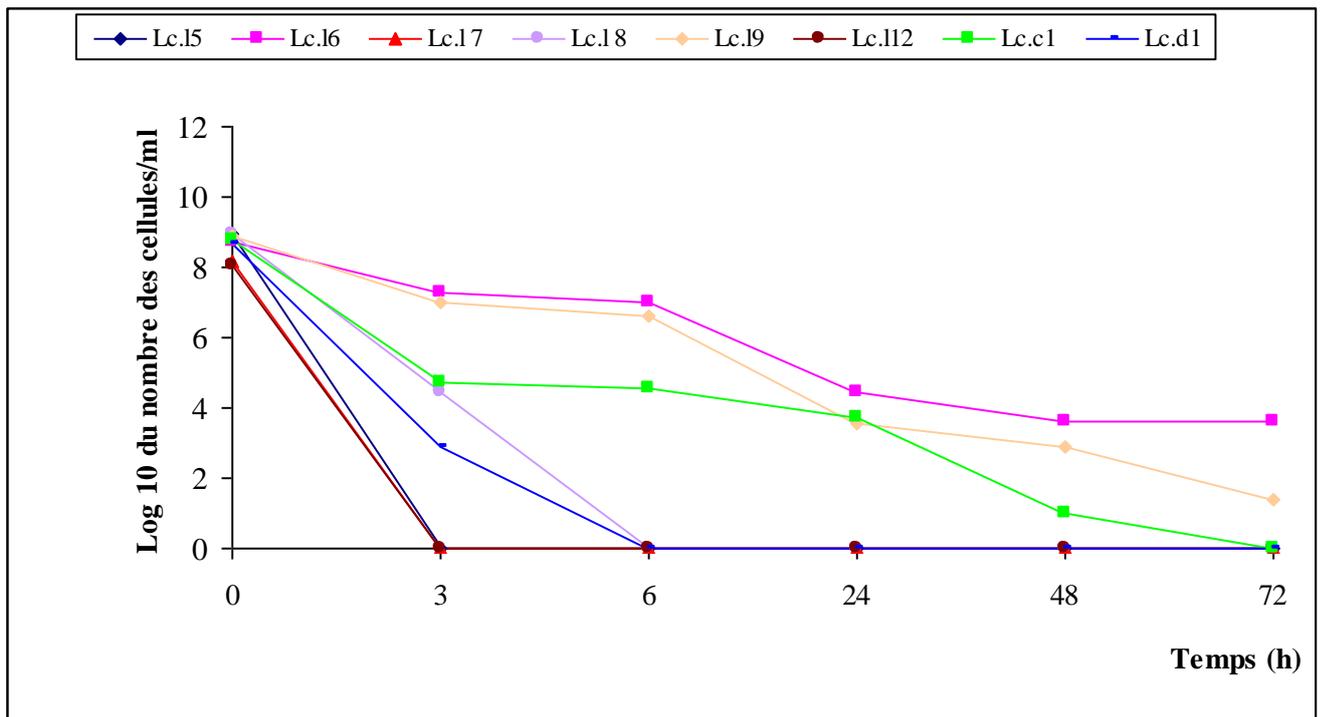
Les études actuelles confirment que pour exercer un effet probiotique significatif, les bactéries doivent arriver vivantes avec une charge égale ou supérieure à  $10^7$  UFC/ml au niveau intestinal (Cherbut, 2001); mais pour atteindre ce dernier compartiment du tube digestif, elles doivent traverser sans dommages irréversibles les barrières physiologiques de sa partie supérieure qui sont représentées par l'acidité corrosive de l'estomac (variations du pH), le péristaltisme intestinal et les sécrétions biliaires.

L'étude de la survie des souches de *Lactococcus lactis* dans le tractus gastro-intestinal est importante parce qu'elle nous permet d'avoir une meilleure connaissance de leurs devenir dans ce tractus, comme elle nous oriente vers la sélection de **souches extrêmophiles**. Ces dernières doivent avoir des capacités physiologiques d'adaptation aux conditions drastiques et extrêmes du tube digestif.

Afin d'atteindre cet objectif, nous avons testé la résistance de 20 souches lactiques pures à différents pH en absence et en présence de 0,3 % de sels biliaires et de 3 % d'une flore intestinale standard.

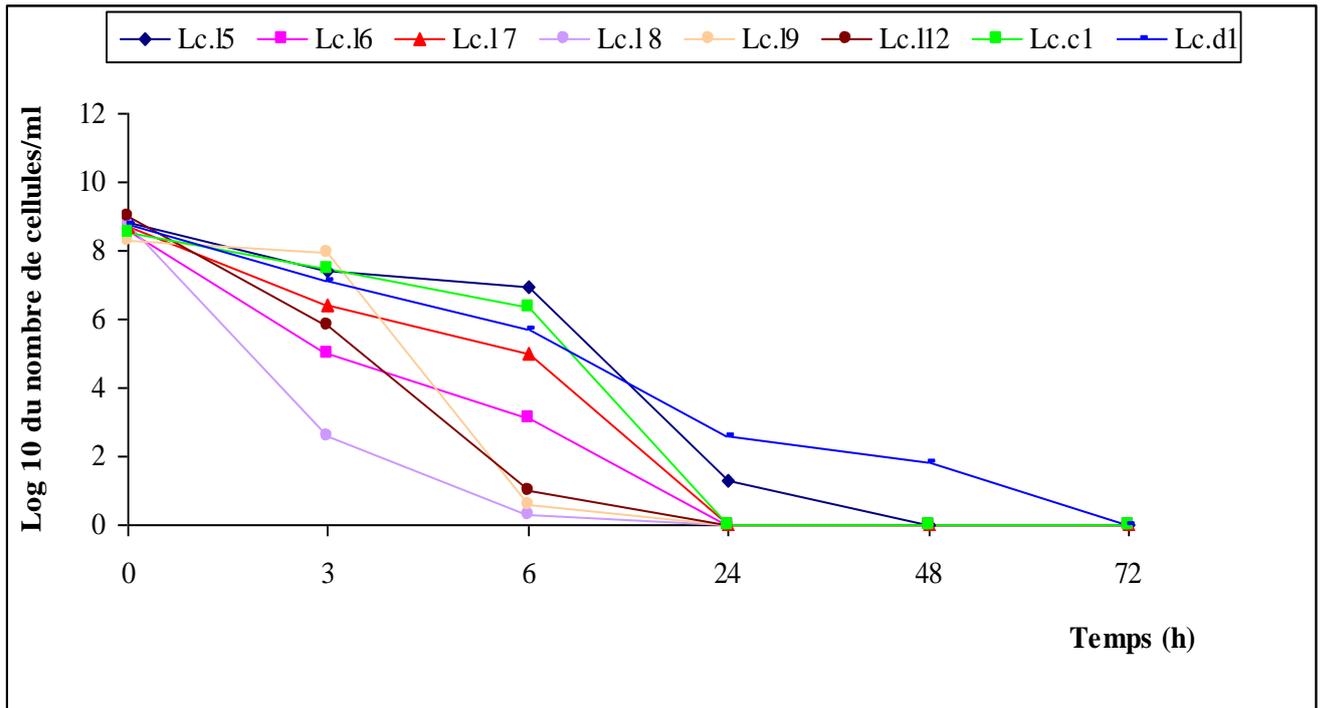
### 3.1. Survie des souches lactiques pures à pH 2,5

En milieu très acide (pH 2,5), les souches de *Lactococcus lactis* testées présentent une sensibilité variable selon les souches : *Lc.l5*, *Lc.l7*, *Lc.l12* et *Lc.l13* ont disparu au bout de 3 h d'incubation, alors que *Lc.l6*, *Lc.l9* ont montré une résistance significative ( $P < 0,05$ ) et persistent avec des charges supérieures à  $10^7$  UFC/ml. Après 6 h d'incubation, la gamme des souches sensibles s'élargie pour inclure *Lc.l2*, *Lc.l4*, *Lc.l8*, *Lc.d1*, et *Lc.c2*. Cette sensibilité touche la presque totalité des souches après une période d'incubation de 72 h (figure 12).



**Figure 12 :** Evolution de quelques souches de *Lactococcus lactis* à pH 2,5 en absence de sels biliaries

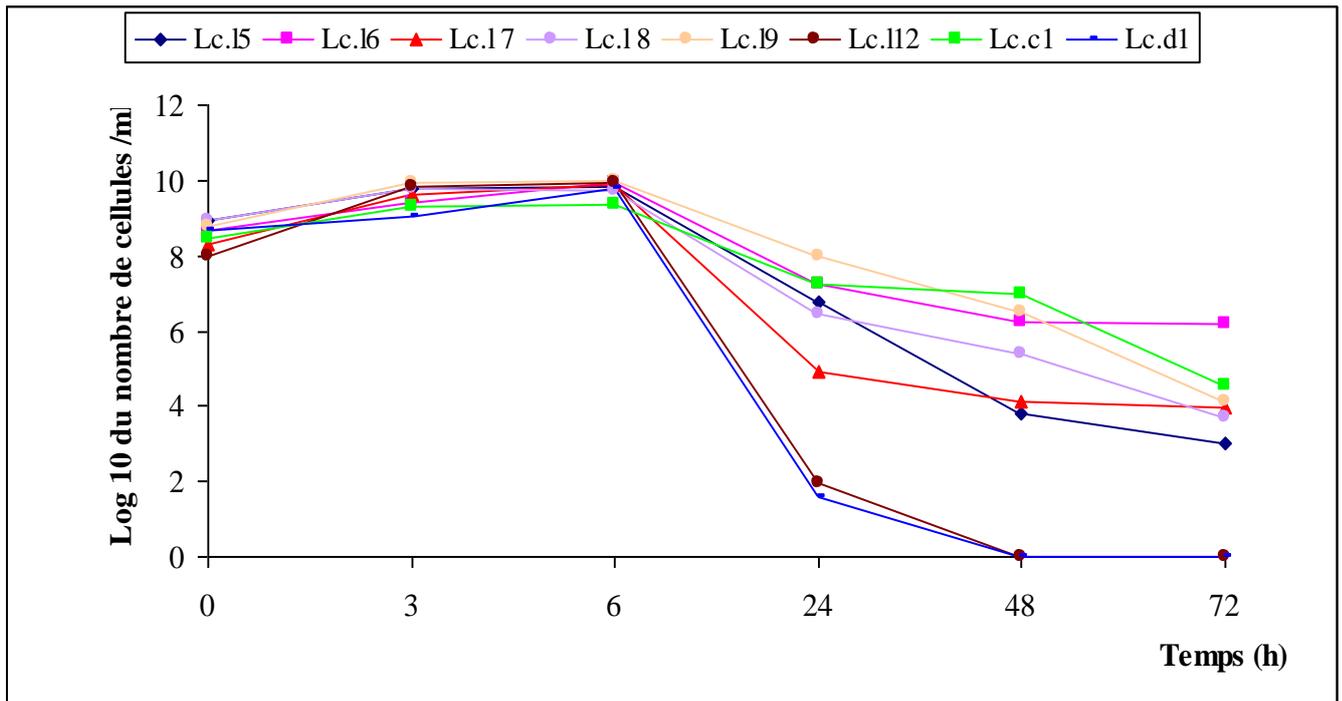
L'addition de 0,3 % de sels biliaries à pH 2,5 n'a pas modifiée d'une manière significative ( $p < 0,05$ ), le comportement des souches lactiques à l'exception de *Lc.l12*, *Lc.l5*, *Lc.l7* et *Lc.d1* qui ont révélé une meilleure survie en présence qu'en absence de sels biliaries, car le nombre des cellules vivantes enregistrées a été supérieur à  $10^7$  UFC/ml après 3 h d'incubation. Ce nombre n'a s'annuler qu'après 24 h d'incubation (figure 13).



**Figure 13 :** Evolution de quelques souches de *Lactococcus lactis* à pH 2,5 en présence de 0,3 % de sels biliaries

### 3.2. Survie des souches lactiques pures à pH 4,3

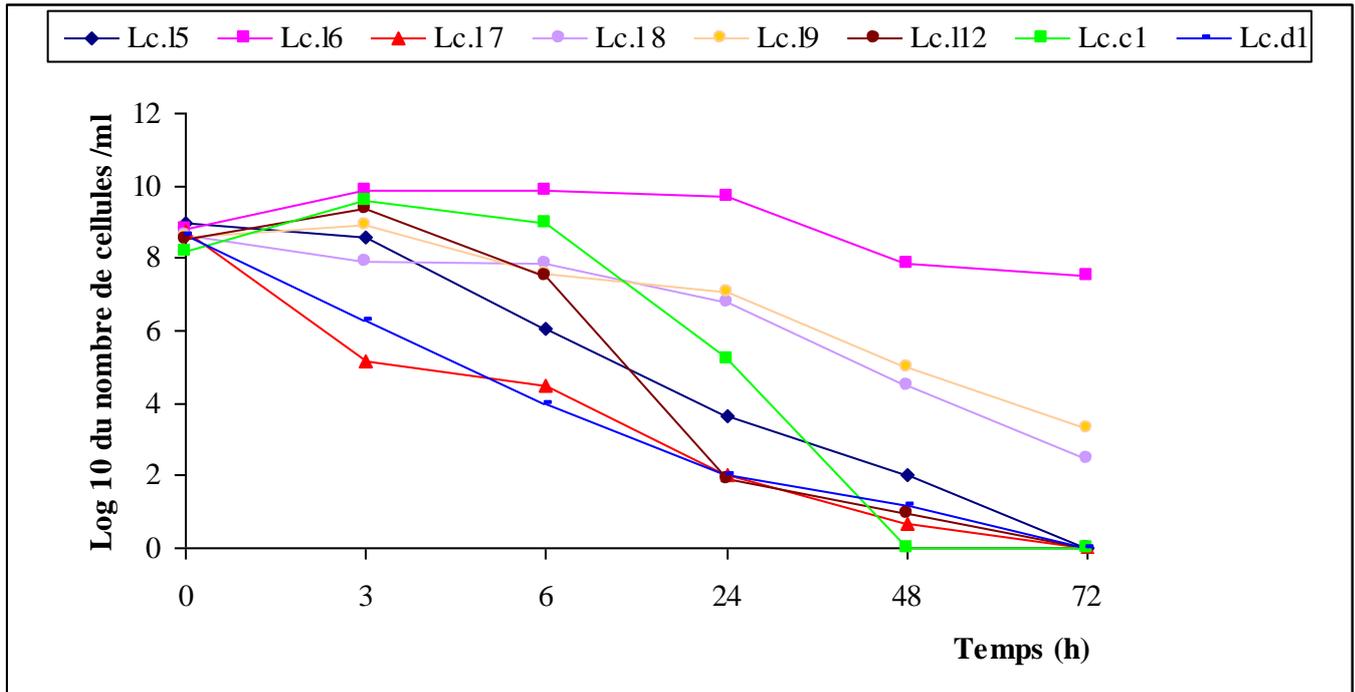
Contrairement au pH très acide de 2,5, le pH 4,3, représentant le pH de l'estomac au moment ou juste après le repas, semble tolérable par les souches lactiques utilisées. Après 3 h d'incubation, les charges bactériennes atteignent  $10^9$  UFC/ml pour toutes les souches (figure 14). Mais après 24 h d'incubation, ce nombre diminue pour atteindre moins de  $10^5$  UFC/ml pour *Lc.l1*, *Lc.l2*, *Lc.l3*, *Lc.l7*, *Lc.l13*, *Lc.c2*, et *Lc.c3* et *Lc.d4* et moins de  $10^2$  UFC/ml pour *Lc.l12* et *Lc.l10* et *Lc.d1*. La diminution du nombre de bactéries continue avec le temps et reste au alentour de  $10^4$  UFC/ml pour *Lc.l6*, *Lc.l9*, *Lc.l11* et *Lc.c1* et s'annule après 72 h d'incubation pour les autres souches.



**Figure 14 :** Evolution de quelques souches de *Lactococcus lactis* à pH 4,3 en absence de 0,3 % de sels biliaries

L'addition de 0,3 % de sels biliaries à pH 4,3 a modifié le comportement des souches lactiques (figure 15). En fonction de leur résistance, nous avons remarqué trois groupes :

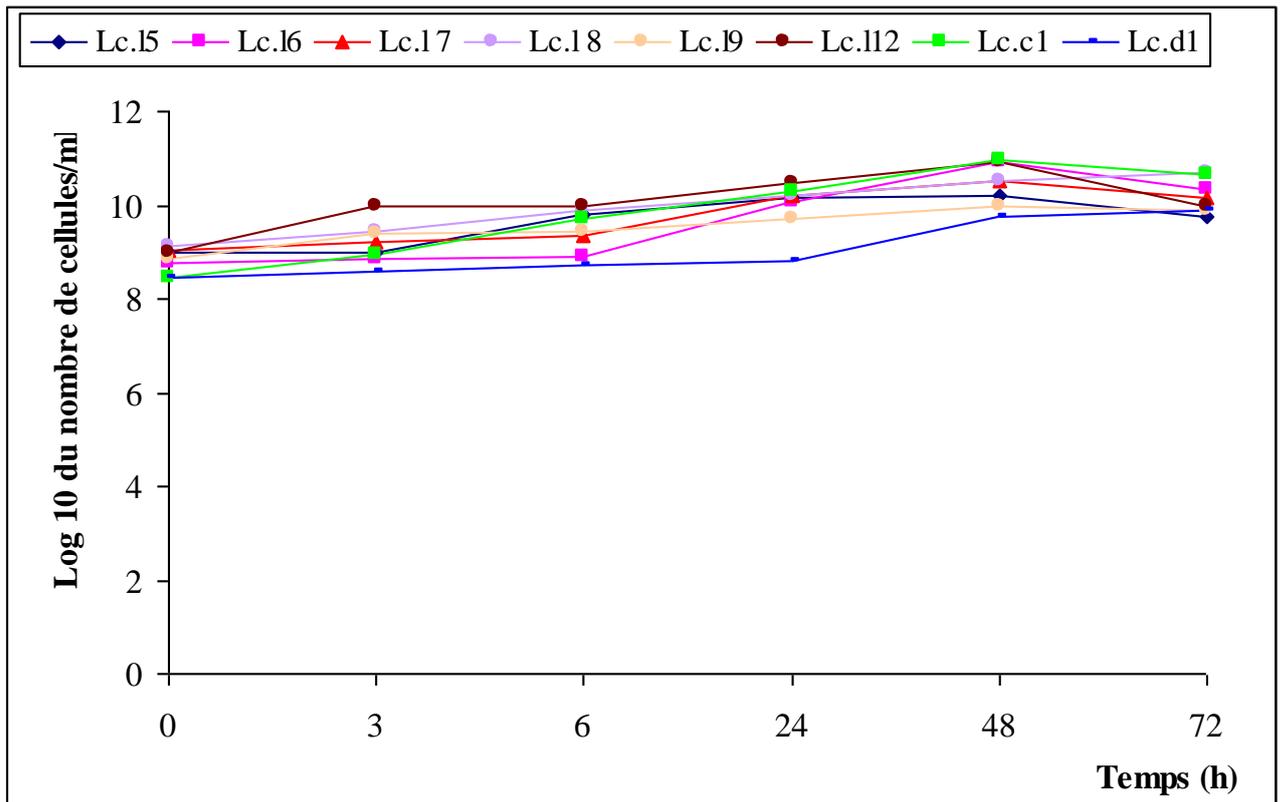
- Le premier groupe comporte *Lc.l3*, *Lc.l6*, *Lc.l11* et *Lc.d4* qui ont révélé une bonne résistance avec des charges bactériennes qui se situent entre  $6,16 \cdot 10^7$  et  $9,60 \cdot 10^9$  UFC/ml après 24 h d'incubation. Ce nombre reste important même après 72 h ( $10^7$  UFC/ml) ;
- le deuxième, regroupe *Lc.l2*, *Lc.l8*, *Lc.l9* et *Lc.l13* qui se caractérisent par une charge de l'ordre de  $10^7$  UFC/ml après 24 h d'incubation, mais au-delà de 24 h, la croissance bactérienne a connu une diminution importante et les charges sont négligeables après 72 h ;
- le troisième groupe, comporte le reste des souches qui ont montré une faible résistance dès les premières heures d'incubation.



**Figure 15 :** Evolution de quelques souches de *Lactococcus lactis* à pH 4,3 en présence de 0,3 % de sels biliaries

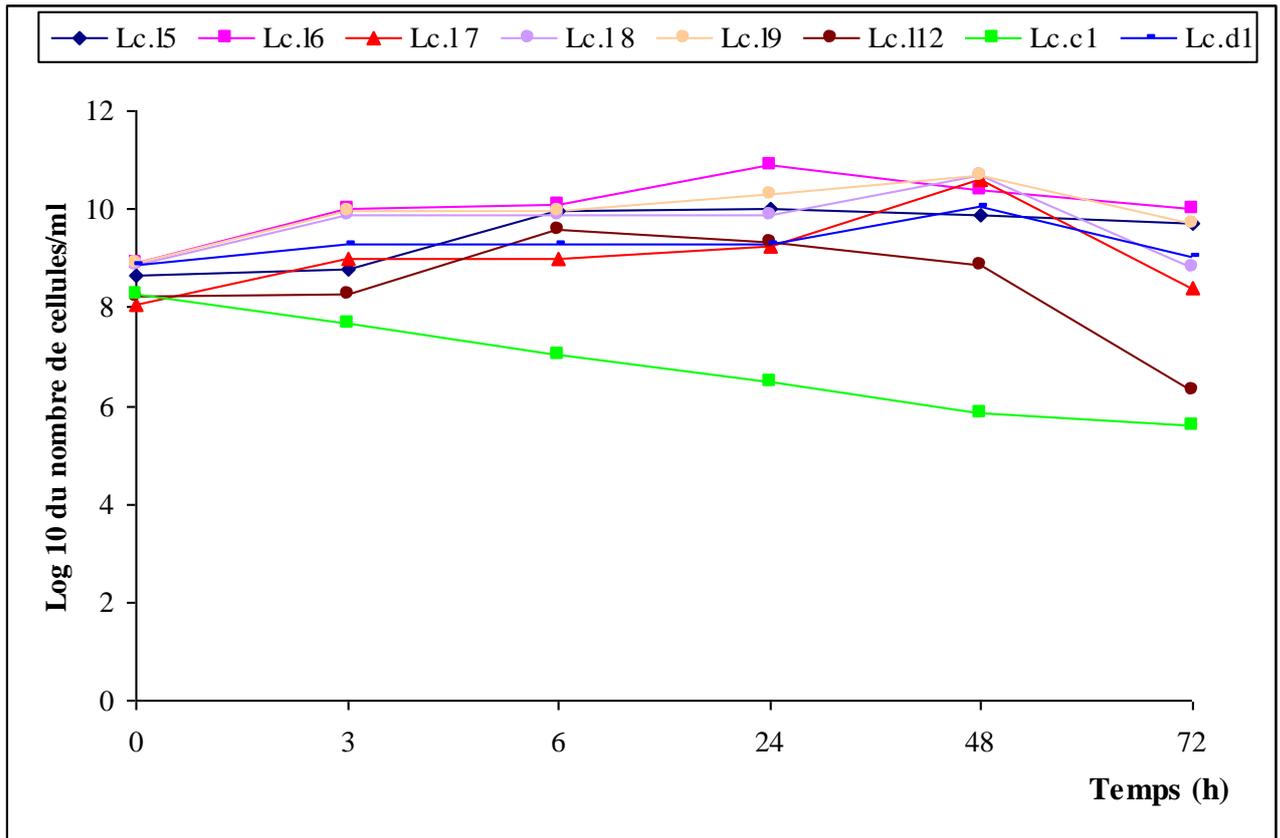
### 3.3. Survie des souches lactiques pures à pH 6,5

A pH 6,5, similaire au pH intestinal, nous avons enregistré une croissance très importante des lactocoques, supérieure à  $10^8$  UFC/ml après 3 h d'incubation (figure 16). Les charges bactériennes continuent à augmenter avec le temps d'incubation et atteignent des valeurs maximales après 48 h :  $1,44 \cdot 10^{10}$  UFC/ml pour *Lc.l5*,  $8,70 \cdot 10^{10}$  UFC/ml pour *Lc.l6*,  $3,16 \cdot 10^{10}$  UFC/ml pour *Lc.l8*,  $9,30 \cdot 10^{10}$  UFC/ml pour *Lc.c1* et  $5,88 \cdot 10^9$  UFC/ml pour *Lc.d1*. Une légère diminution est détectée après 72 h d'incubation.



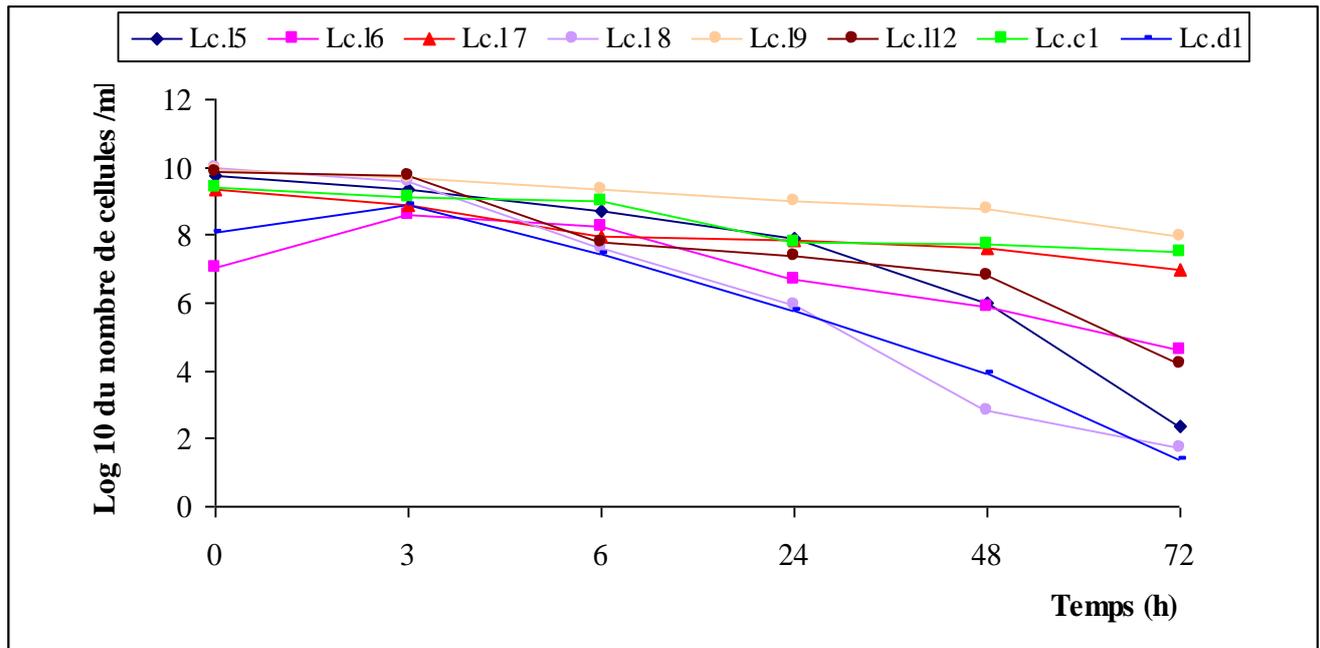
**Figure 16 :** Evolution de quelques souches de *Lactococcus lactis* à pH 6,5 en absence de sels biliaires

L'addition des sels biliaires, à pH 6,5, n'influe pas d'une manière significative ( $p < 0,05$ ) sur la croissance des lactocoques. Les charges bactériennes restent élevées avec des valeurs dépassant  $10^7$  UFC/ml après 48 h d'incubation pour toutes les souches à l'exception de *Lc.l11* ( $1,44 \cdot 10^6$  UFC/ml) et *Lc.c1*, ( $7,00 \cdot 10^5$  UFC/ml). Ces charges commencent à diminuer après 72 h d'incubation (figure 17).



**Figure 17 :** Evolution de quelques souches de *Lactococcus lactis* à pH 6,5 en présence de 0,3 % de sels biliaires

Lorsque 3 % de la flore intestinale est additionnée au bouillon de croissance à pH 6,5 ; le nombre de cellules bactériennes diminue d'une manière non significative après 3 h d'incubation. Les concentrations cellulaires restent élevées, entre  $10^8$  et  $10^9$  UFC/ml. Le nombre de cellules bactériennes diminue progressivement, avec le temps d'incubation, pour atteindre, par exemple,  $6,45 \cdot 10^7$  UFC/ml pour *Lc.l<sub>12</sub>*,  $3,54 \cdot 10^8$  UFC/ml pour *Lc.d<sub>4</sub>* et  $1,77 \cdot 10^8$  UFC/ml pour *Lc.l<sub>6</sub>* après 6 h d'incubation (figure 18). Ce nombre reste supérieur à  $10^7$  UFC/ml pour les autres souches à l'exception de *Lc.l<sub>2</sub>* ( $7,41 \cdot 10^3$  UFC/ml), mais après 72 h d'incubation, il ne reste que des traces de lactocoques.



**Figure 18 :** Evolution de quelques souches de *Lactococcus lactis* à pH 6,5 en présence de 3 % d'une flore intestinale standard

La sécrétion acide constitue le premier mécanisme de défense contre la majorité des microorganismes ; des travaux, *in vitro*, ont permis d'étudier la résistance de certaines bactéries lactiques à l'acidité. Rallu, (1999) a montré que l'espèce *Lactococcus lactis* ne survit pas à une acidification brutale du milieu, par contre, cette survie peut être améliorée par une phase d'adaptation ou par l'introduction des lactocoques dans un aliment (lait fermenté) qui va jouer le rôle d'un transporteur d'une part et d'un tampon de pH d'autre part. Le lait fermenté augmente le pH de l'estomac à des niveaux supérieurs à 4, ce qui aide certaines souches à traverser cette barrière pour atteindre le duodénum.

Le matériel génétique des lactocoques joue aussi un rôle très important dans leur résistance aux changements des conditions environnementales (Even et *al.*, 2002) où plusieurs mécanismes interviennent dont les plus importants sont :

\* L'activité de l'ATPase qui contribue à l'homéostasie du pH grâce à un échange de cations convertissant un potentiel transmembranaire en gradient de pH.

\* Le deuxième mécanisme de lutte contre l'acidification du milieu est la production de composés basiques en particulier l'ammoniac qui est produit par les lactocoques suivant la voie de l'arginine déiminase (ADI) qui implique des enzymes actives à pH 2 et 3 et assure la conversion de l'arginine en ornithine, ammoniac, CO<sub>2</sub> et

permet aussi la production de l'ATP (Sanders et al.,1999), l'ammoniac ainsi produit va réagir avec des protons permettant l'alcalinisation du cytoplasme et l'ATP générée pourra être utilisée par l'ATP ase F0-F1 pour l'expulsion des protons.

\* En plus, la décarboxylation des acides et la présence des antiports électrogéniques chez les bactéries lactiques les aident à contrecarrer la baisse du pH intracellulaire ; ce système fonctionne chez *Lactococcus lactis* ssp *lactis* dans le cas du glutamate (Sanders et al., 1999) ; le pH optimum de la glutamate décarboxylase est 4,7.

Les lactocoques peuvent également développer une réponse adaptative au stress acide, cette réponse est en stricte relation avec des protéines spécifiques responsables au maintien du pH intracellulaire à des valeurs approximatives du pH extracellulaires (Harke et al.1996). De même Kim et Dunn, (1999) ont montré que des souches de *Lactococcus lactis* peuvent avoir un taux de survie important lors d'un stress acide sévère (pH = 3,9) après une incubation de 30 min à pH 4,5.

La concentration des lactocoques à pH 6,5 est très importante parce que c'est le pH optimal de l'ATP ase, cette dernière fonctionne chez les espèces de *Lactococcus lactis* à des pH proches de la neutralité (entre 6,5 et 7,5) ce qui confirme des résultats antérieurs (Garrigues et al., 1998) et c'est le cas de nos souches.

La régression du nombre de bactéries au cours du temps n'est due qu'à l'épuisement des éléments nutritifs du bouillon de croissance et aux périodes importantes d'incubation (jusqu'à 72 h).

Les sels biliaires ont un effet bactéricide vis-à-vis de la plupart des bactéries Gram positif en jouant le rôle d'un détergeant sur les membranes cellulaires causant ainsi une augmentation de la perméabilité cellulaire ; mais les bactéries lactiques généralement (Dilmi-Bouras, 1991) et les lactocoques spécialement (Corthier et Drouault, 2001) ont des comportements variables vis-à-vis des sels biliaires surtout à différents pH.

Certaines études doutent que les sels biliaires en milieu acide jouent un rôle neutralisant ce qui améliore la résistance des bactéries lactiques, effectivement à pH 4,3 la survie des souches a été meilleure en présence de sels biliaires qu'en leur absence. Il semble que les sels biliaires avec leur pH basique (7,5 à 8,5) neutralisent le pH du milieu pour le rendre optimal à la croissance des lactocoques mais cette hypothèse reste à confirmer.

Le pH 6,5 est un pH optimal pour le développement des lactocoques mais la concurrence bactérienne provoquée par les espèces de la flore intestinale a limité leur croissance et changé leur comportement dans le bouillon. Nous avons remarqué, en général, une diminution progressive de la charge bactérienne en fonction de temps d'incubation ; alors qu'en absence de la flore intestinale les concentrations cellulaires restent élevée.

Malgré que les lactocoques ont la capacité de produire des substances antagonistes (acides lactiques et bactériocines) vis-à-vis des espèces de la flore intestinale (Vinod Kumar et *al.*, 2006), ils sont incapables de s'implanter durablement dans le colon parce que les bactéries de la flore autochtone limitent l'adhésion, la persistance et le développement des souches lactiques au niveau intestinal.

Mais il faut pas négliger que La notion d'adhésion et de persistance des probiotiques au niveau intestinal demeure très controversée puisque des études récentes ont clairement démontré que même les souches non viables de probiotiques sont capables d'exercer certains effets positifs sur la santé, ceci laisserait donc envisager une éventuelle redéfinition des probiotiques où les notions de viabilité et de persistance seront reconsidérer (Coconnier et *al.*, 1993 ; Ouwehand et *al.*, 1999 ; Dilmi - Bouras, 2006 ; 2007 ).

Par contre, d'autres chercheurs assurent que pour obtenir des effets bénéfiques sur la santé, une souche probiotique doit atteindre le gros intestin à une concentration d'environ  $10^7$  cellules viables par gramme (Stanton et *al.*, 2001) , de ce fait, la concentration d'un probiotique dans un aliment doit tenir compte de cette contrainte pour permettre d'atteindre les concentrations ciblées dans le colon, cette concentration dépend évidemment de la nature de l'aliment utilisé et de la quantité journalière consommée ( Gagnon et *al.*, 2004).

L'étude statistique des résultats qui repose sur l'analyse de la variance paramétrique (ANOVA paramétrique) à l'aide de logiciel XLStat (version 5.7). 2007 avec un seuil de signification  $\alpha = 0,05\%$  et une moyenne critique de 7 nous a permis de classer les souches testées en deux groupes :

➤ Le premier groupe est celui des sous espèces non extrêmophiles : il comporte les souches écartées de l'expérience parce que leur nombre à été inférieur à  $10^7$  UFC/ml après 3 h d'incubation tandis que le temps de transit intestinal est au moins 6 h. Les souches *Lc.d<sub>2</sub>*, *Lc.l<sub>1</sub>*, *Lc.l<sub>2</sub>*, *Lc.l<sub>4</sub>*, *Lc.l<sub>6</sub>* *Lc.l<sub>8</sub>*, *Lc.l<sub>10</sub>* ont révélé une résistance non significative, après 3h d'incubation, par les différentes conditions expérimentales (pH 2,5, 4,3 et 6,5 sans sels biliaries et en présence de sels biliaries, pH 6,5 en présence des

espèces de la flore intestinale) où les valeurs observées sont inférieures des valeurs critiques, ce qui nous oblige de les éliminer de l'expérience.

➤ Tandis que le deuxième groupe comporte les souches, *Lc.l3*, *Lc.l5*, *Lc.l7*, *Lc.l9*, *Lc.l11*, *Lc.l12*, *Lc.l13*, *Lc.d1*, *Lc.d3*, *Lc.d4*, *Lc.c1*, *Lc.c2*, *Lc.c3* ayant montré une résistance significative après 3 h d'incubation ( $p < 0,05$ ). Ces souches peuvent être qualifiées d'extrêmophiles, elles sont utilisées dans des associations pour étudier leurs effets sur les espèces de la flore intestinale résidente humaine.

Les résultats trouvés nous permettent de conclure que les différentes souches testées de *Lactococcus lactis* possèdent des variations plus ou moins importantes dans la résistance vis-à-vis des pH bas en présence ou en absence de sels biliaries. Cette conclusion corrobore les résultats trouvés par Dilmi-Bouras, (1991, 2002) qui montre que les bactéries lactiques en culture isolées ou en association montrent des variations importantes à pousser dans un milieu synthétique en présence ou en absence d'acide et de sels biliaries.

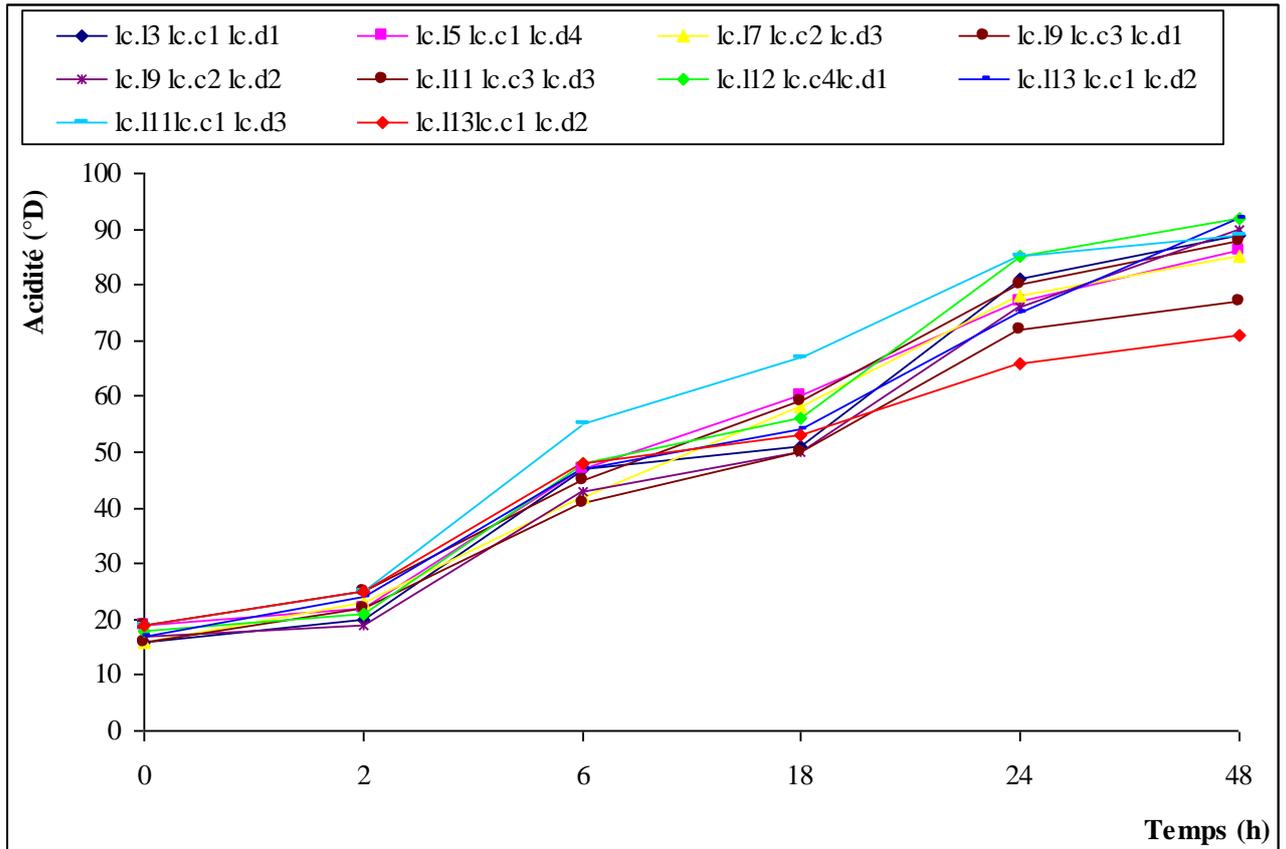
#### 4. Pouvoir acidifiant des associations bactériennes

Novel, (1993) a montré que l'utilisation des associations bactériennes améliore les qualités organoleptiques des produits finis mais à conditions que les souches associées ont la capacité de développer une bonne relation de symbiose entre elles. A la lumière de cette donnée, nous avons testé le pouvoir acidifiant et la survie de 10 combinaisons bactériennes criblées au hasard à partir des 13 souches pures extrêmophiles.

Les associations bactériennes testées sont :

*lc.l3 lc.c1 lc.d1*; *lc.l5 lc.c1 lc.d4*; *lc.l7 lc.c2 lc.d3*; *lc.l9 lc.c3 lc.d1*; *lc.l9 lc.c2 lc.d2*; *lc.l11 lc.c3 lc.d3*; *lc.l12 lc.c4 lc.d1*; *lc.l13 lc.c2 lc.d1*; *lc.l11 lc.c1 lc.d3*; *lc.l13 lc.c1 lc.d2*.

Les résultats de la figure 19 montrent que le pouvoir acidifiant des 10 associations bactériennes se rapproche, les valeurs oscillent entre 20 et 25°D après 3 h d'incubation et dépassent 45°D 6 h après, l'acidité Dornic continue à augmenter pour atteindre 88°D pour *lc.l9 lc.c3 lc.d1*, 90°D pour *lc.l9 lc.c2 lc.d2*, 92°D pour *lc.l13 lc.c2 lc.d1*, 92°D pour *lc.l12 lc.c4 lc.d1* et 94°D pour *lc.l13 lc.c1 lc.d2* après 48 h d'incubation.



**Figure 19** : Evolution de l'acidité Dornic à 30°C, en fonction du temps, des associations bactériennes testées

Selon Rallu et *al.* (2000), les levains lactiques mésophiles en association acidifient le lait en produisant de l'acide lactique à travers leur métabolisme homofermentaire du glucose, lactose et galactose, exception faite pour la sous espèce *diacetylactis* qui ne peut pas métaboliser le galactose.

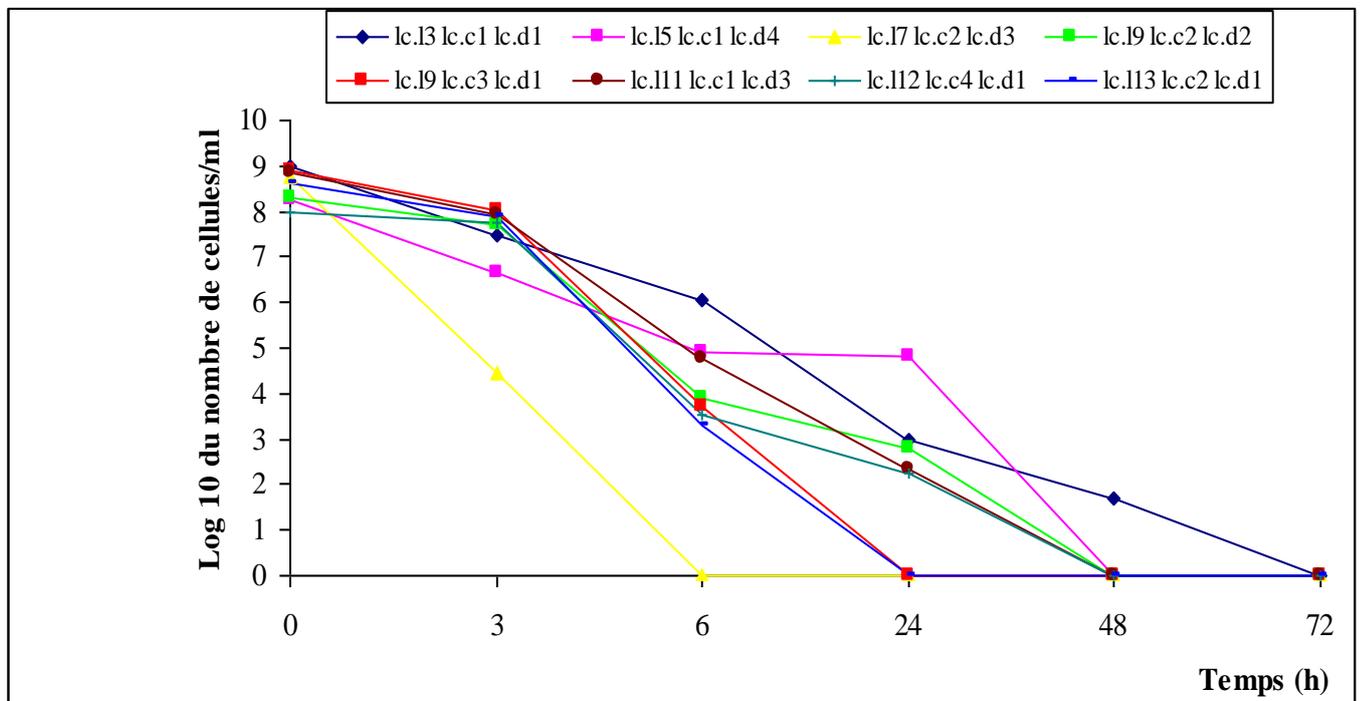
En plus, l'établissement d'une bonne relation de symbiose entre les différentes souches améliore notablement le pouvoir acidifiant des cultures mixtes, *Lactococcus lactis ssp lactis* joue un rôle primordial dans l'initiation de l'acidité pour rendre le milieu favorable à la production de diacétyle par le biovar *diacetylactis* (Bassit, 1994).

Le pouvoir acidifiant intéressant des différentes associations testées, nous passe à étudier leur résistance vis-à-vis des conditions extrêmes du tube digestif (pH 2,5, 4,3 et 6,5 en absence et présence de 0,3% de sels biliaires et 3 % de flore intestinale).

## 5. Survie, *in vitro*, des associations bactériennes à différents pH en absence et présence de sels biliaries et de flore intestinale

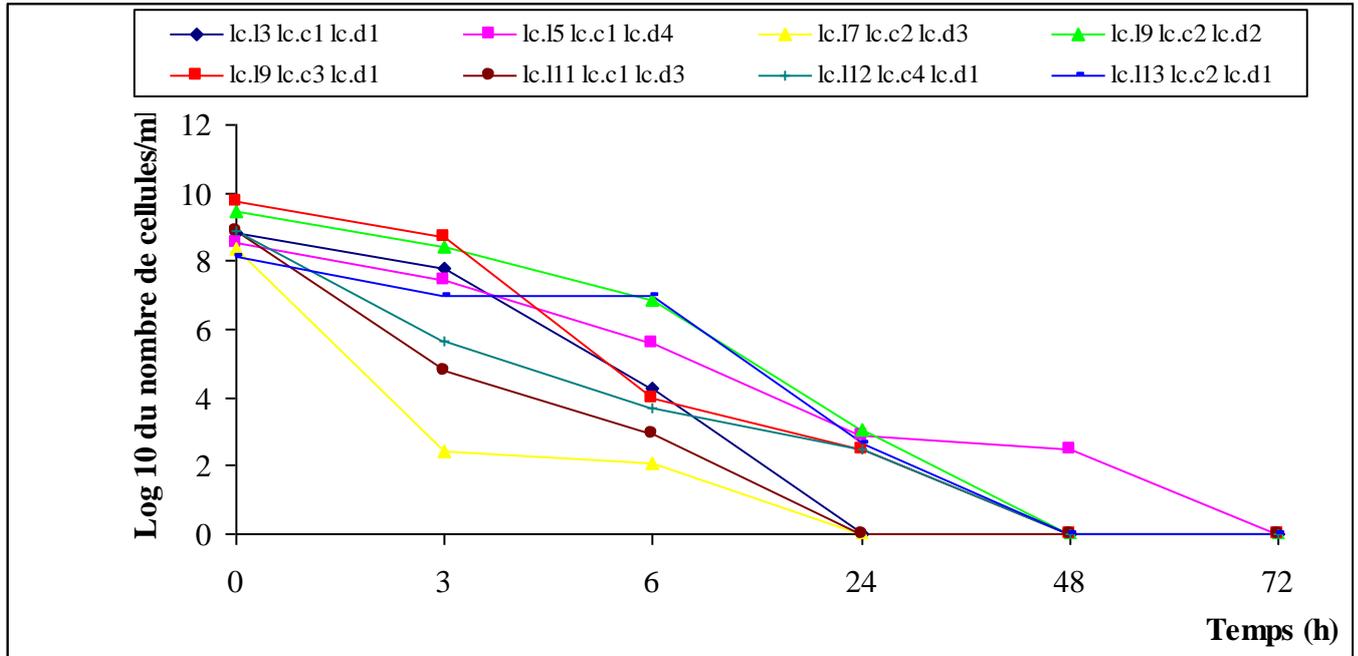
### 5.1. Survie des associations bactériennes à pH 2,5

A pH 2,5 les associations *lc.l3 lc.c1 lc.d1*, *lc.l9 lc.c3 lc.d1*, *lc.l9 lc.c2 lc.d2*, *lc.l11 lc.c1 lc.d3*, *lc.l12 lc.c4 lc.d1*, *lc.l13 lc.c2 lc.d1* et *lc.l13 lc.c1 lc.d2* ont révélé une croissance significative ( $P < 0,05$ ) où le nombre des cellules bactériennes a dépassé  $10^7$  UFC/ml après 3 h d'incubation (figure 20). Toutefois, 6 h d'incubation a provoqué une diminution remarquable dans la biomasse bactérienne et la meilleure croissance a été enregistrée avec l'association *lc.l3lc.c1lc.d1* où le nombre de cellules vivantes reste à  $1,20 \cdot 10^6$  UFC/ml. Le nombre de bactérie continue de diminuer pour s'annuler au bout de 6 h d'incubation pour la souche *lc.l7lc.c2 lc.d3* et 48 h pour autres associations.



**Figure 20** : Evolution de différentes associations bactériennes à pH 2,5 en absence de sels biliaries

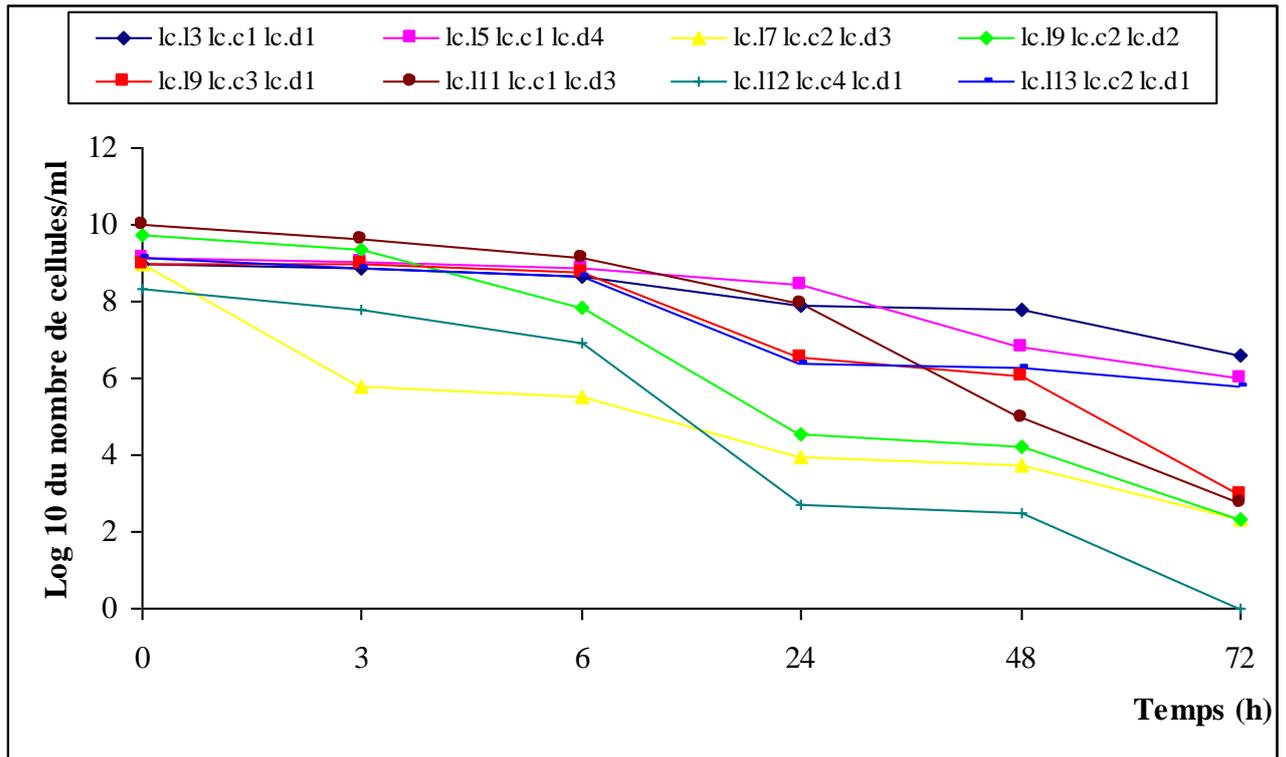
Lorsque 0,3 % de sels biliaries est additionnée au milieu de culture de pH 2,5, les associations bactériennes ayant donné une bonne croissance en absence de sels biliaries restent viables avec des charges moyennes de  $10^7$  UFC/ml après 3h d'incubation. Le nombre de bactéries des différentes associations décroît progressivement en fonction du temps et s'annule au bout de 24 h pour *lc.l3 lc.c1 lc.d1*, *lc.l7 lc.c2 lc.d3* et *lc.l11 lc.c1 lc.d3* et 72 h pour les autres associations (figure 21).



**Figure 21** : Evolution de différentes associations bactériennes à pH 2,5 et en présence de 0,3% de sels biliaries

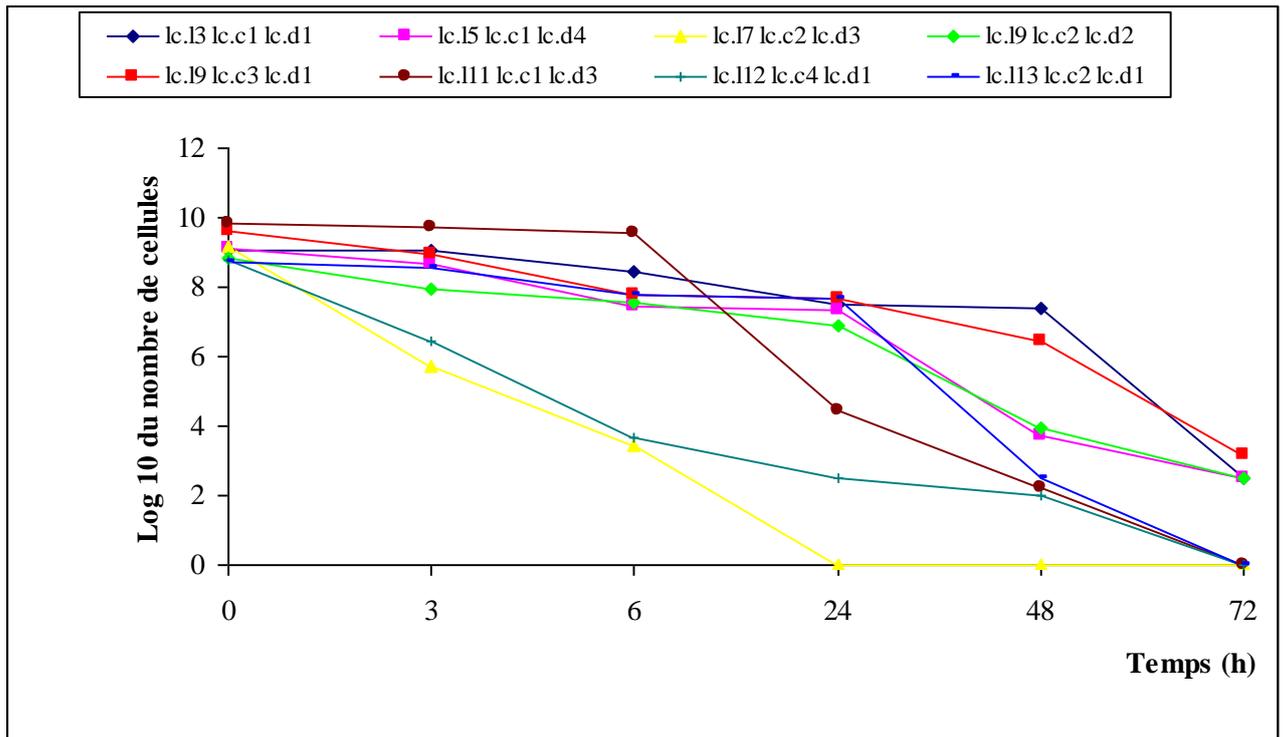
## 5.2. Survie des associations bactériennes à pH 4,3

L'élévation du pH jusqu'à 4,3 a amélioré notablement la croissance de toutes les associations bactériennes. *lc.l3 lc.c1 lc.d1* - *lc.l5 lc.c1 lc.d4* - *lc.l9 lc.c3 lc.d1* - *lc.l9 lc.c2 lc.d2* et *lc.l11 lc.c3 lc.d3*, *lc.l13 lc.c2 lc.d1* et *lc.l13 lc.c1 lc.d2* restent les meilleures avec des charges bactériennes importantes ; à titre d'exemple  $1,08 \cdot 10^9$  UFC/ml pour *lc.l5 lc.c1 lc.d4* et  $9,97 \cdot 10^9$  UFC/ml pour *lc.l11 lc.c1 lc.d3* après 3 h d'incubation ; le nombre de bactéries des différentes associations diminue en fonction du temps mais reste supérieur à  $10^7$  UFC/ml après 6 h pour la plupart des associations. Au bout de 72 h d'incubation, seule l'association *lc.l5 lc.c1 lc.d4* a survécu et avec une charge importante ( $10^6$  UFC/ml) (figure 22).



**Figure 22** : Evolution de différentes associations bactériennes à pH 4,3 en absence de sels biliaires

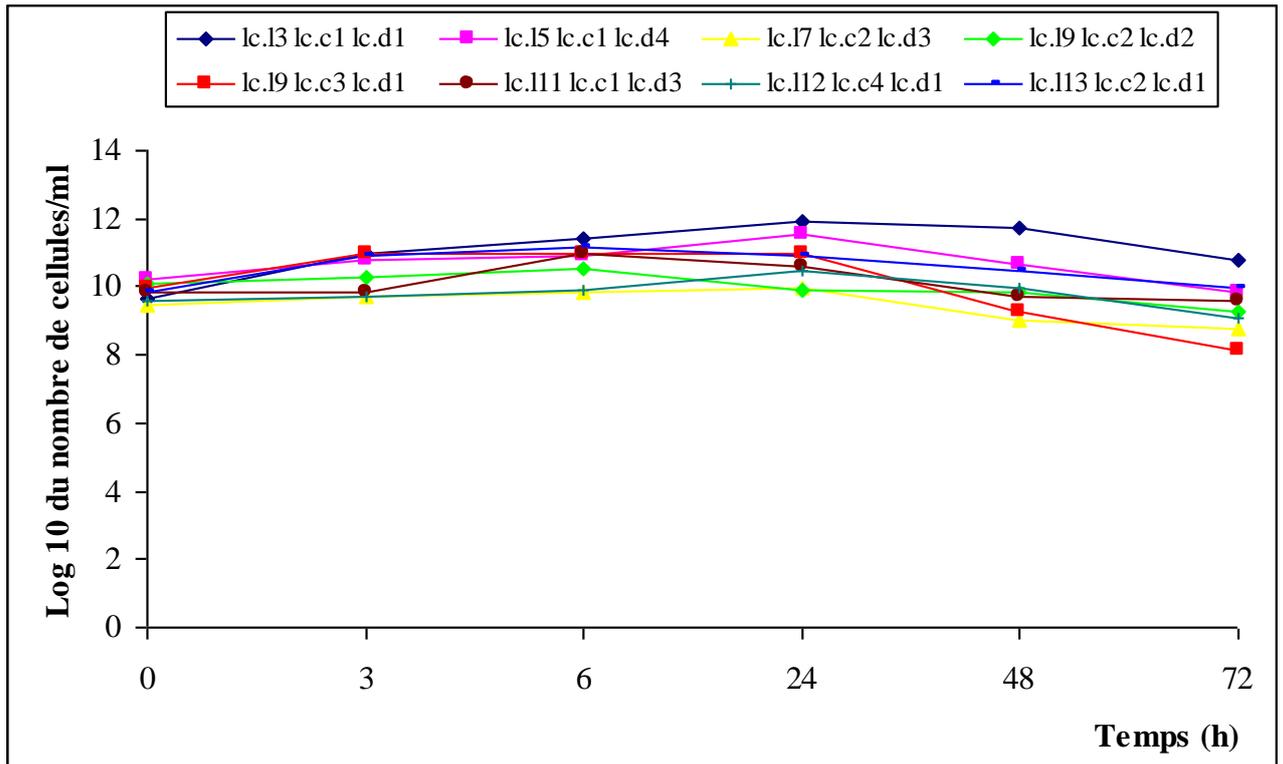
Les différentes associations bactériennes ont montré une sensibilité variable vis-à-vis des sels biliaires. Après l'addition de 0,3 % de sels biliaires à pH 4,3, des valeurs importantes avec des charges qui ont dépassé  $10^7$  UFC/ml pour les associations *lc.l3 lc.c1 lc.d1* - *lc.l5 lc.c1 lc.d4* - *lc.l9 lc.c3 lc.d1*, *lc.l13 lc.c2 lc.d1* et *lc.l13 lc.c1 lc.d2* ont été enregistré après 24h d'incubation. Au-delà de 24 h, on assiste à une diminution du nombre de bactéries pour toutes les associations, et qui s'annule au bout de 72 h d'incubation pour la plupart des associations (figure 23).



**Figure 23** : Evolution de différentes associations bactériennes à pH 4,3 en présence de 0,3% de sels biliaires

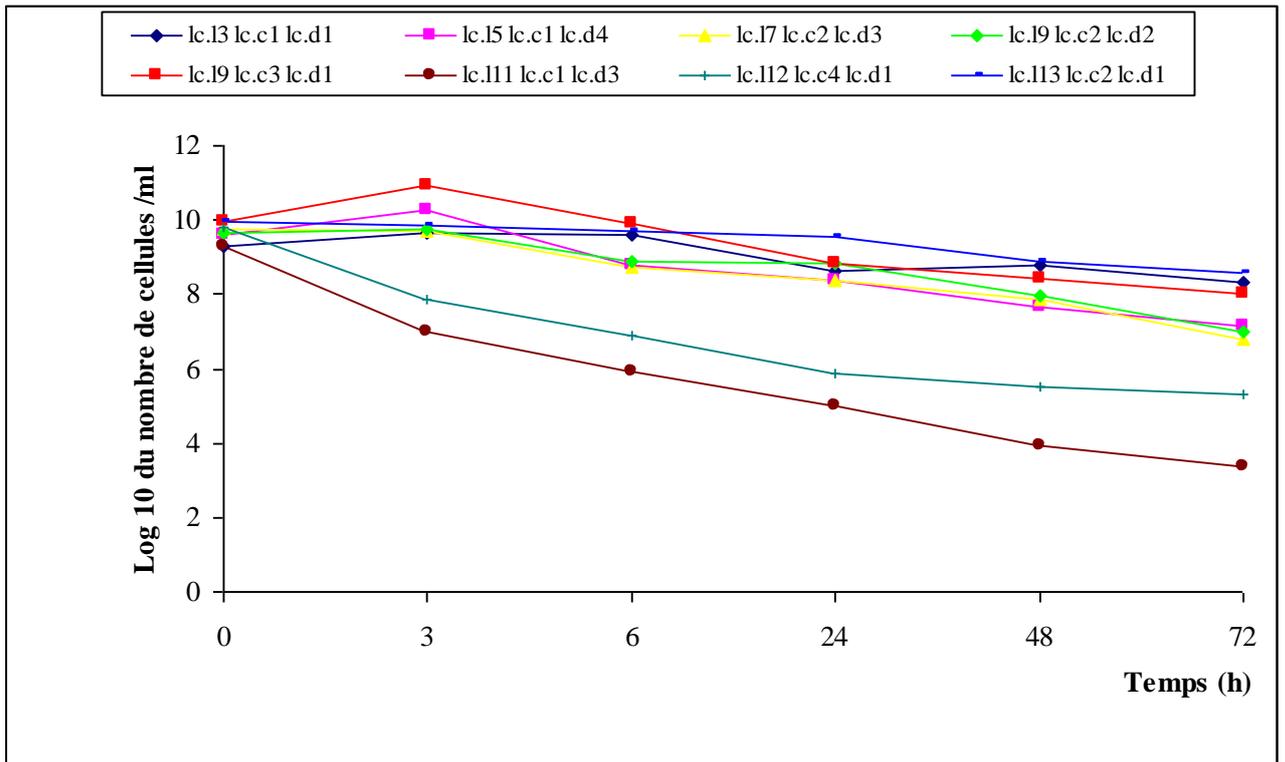
### 5.3. Survie des associations bactériennes à pH 6,5

A ce pH, les différentes associations ont montré une croissance très importante et les charges bactériennes varient entre  $5,60 \cdot 10^{11}$  et  $5,41 \cdot 10^9$  UFC/ml après 3 h d'incubation. Le nombre de bactéries des différentes associations augmente avec le temps d'incubation pour atteindre des valeurs maximales après 24 h ( $8,31 \cdot 10^{11}$  pour l'association *lc.l<sub>3</sub> lc.c<sub>1</sub> lc.d<sub>1</sub>*,  $3,63 \cdot 10^{11}$  pour *lc.l<sub>7</sub> lc.c<sub>2</sub> lc.d<sub>3</sub>* et  $8,90 \cdot 10^{10}$  UFC/ml pour *lc.l<sub>13</sub> lc.c<sub>1</sub> lc.d<sub>2</sub>*. Ce nombre commence à s'abaisser au-delà de 48h d'incubation (figure 24).



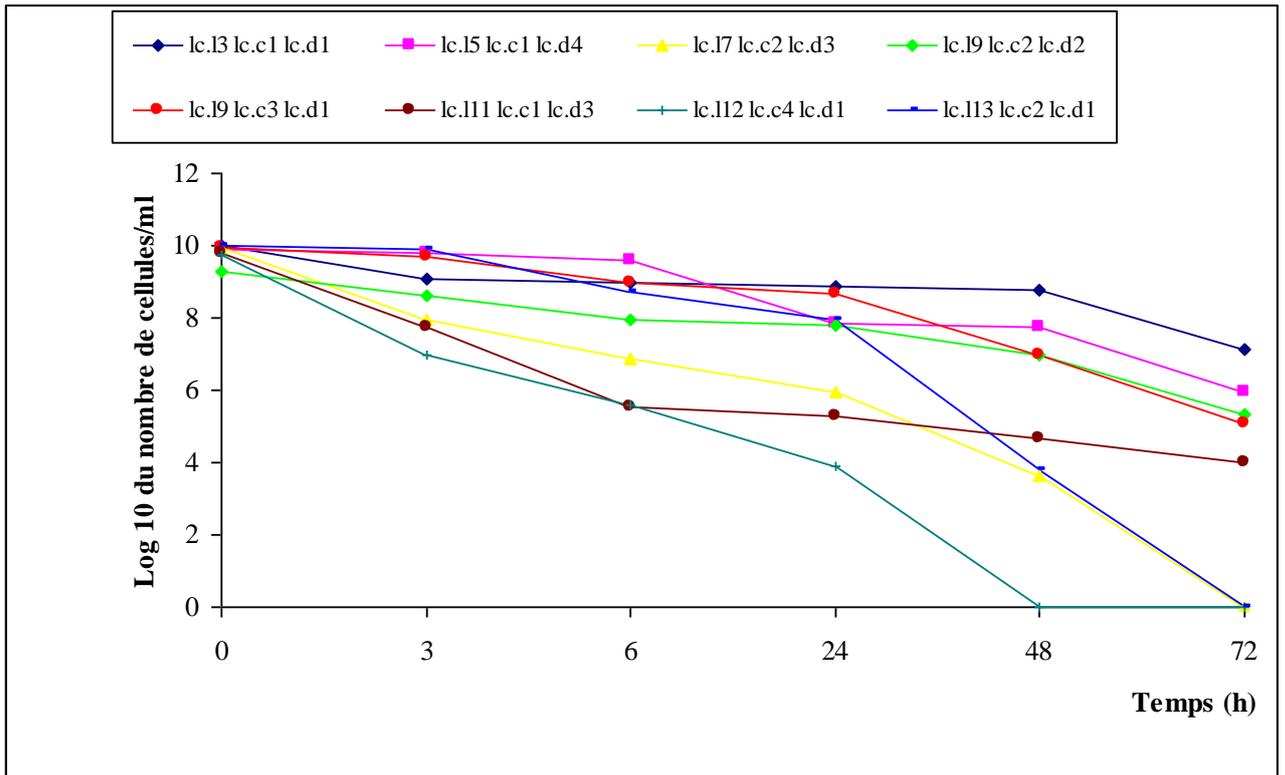
**Figure 24** : Evolution de différentes associations bactériennes à pH 6,5 en absence de 0,3% de sels biliaires

L'addition de 0,3% de sels biliaires à pH 6,5 n'a pas influencé le comportement des associations bactériennes et les charges restent importantes même après 72 h d'incubation (figure 25).



**Figure 25** : Evolution de différentes associations bactériennes à pH 6,5 en présence de 0,3% de sels biliaires

En présence de 3 % de la flore intestinale; nous avons enregistré une diminution de la charge bactérienne en fonction du temps, mais cette diminution n'était pas significative ( $p < 0,05$ ) avant 24 h d'incubation, où les charges bactériennes de *lc.l3 lc.c1 lc.d1* - *lc.l5 lc.c1 lc.d4* - *lc.l9 lc.c3 lc.d1* - *lc.l9 lc.c2 lc.d2* - *lc.l11 lc.c3 lc.d3* - *lc.l13 lc.c2 lc.d1* - *lc.l13 lc.c1 lc.d2* restent au-delà de  $10^7$  UFC/ml (figure 26).



**Figure 26 :** Evolution de différentes associations bactériennes à pH 6,5 en présence de 3% d'une flore intestinale standard.

D'après les résultats trouvés, nous remarquons que parmi les 10 associations bactériennes testées ; 7 ont révélé une bonne résistance à pH faiblement acide (4,3) ou neutre (6,5) en absence et en présence de 0,3% de sels biliaries et de 3% de la flore intestinale. Comme nous avons constaté aussi qu'une bonne relation de symbiose s'y développé entre les sous espèces de chacune des sept associations, où *Lactococcus lactis ssp lactis* initie l'acidification du milieu pour favoriser la production de diacétyle par le biovar *diacetylactis* tandis que cette dernière assure la dégradation du citrate utilisé comme source de carbone par les autres sous espèces (relation de protocoopération) (Hugenholtz et Starrenburg, 1992).

Klijn, (1996) a étudié la survie des espèces de *Lactococcus lactis* dans le tractus digestif et a trouvé que les différentes espèces ingérées dans des produits laitiers survivent au passage à travers le tractus gastro intestinal mais elles ne peuvent pas persister au-delà de trois jours.

Par ailleurs, Wells, (1993) a prouvé que les lactocoques ont une résistance relativement élevée aux sels biliaires comparativement aux espèces intestinales.

La relation de symbiose qui se développe entre les différentes espèces de *Lactococcus lactis* améliore leur résistance aux conditions du tube digestif (Rallu, 1999). Les lactocoques en association se protocoopère pour controverser contre le stress environnemental.

Selon Kim et al. (1999), dans des conditions acides, le niveau létale et sous létal est respectivement de pH 4,5 et 2,5 pour l'espèce *lactis* et de pH 5 et 3 pour *cremoris*, chaque sous espèce possède des mécanismes spécifiques de résistance. *Lactococcus lactis ssp lactis* active les protons H<sup>+</sup> dans la phase exponentielle de sa croissance, ce qui est absent chez *cremoris* qui active le gène deo B codant pour une phosphopentomutase impliqué dans le métabolisme des nucléotides à bases puriques, ces dernières régulent, en partie, le niveau d'induction des réponses à différents stress (Rallu et al., 2000). Alors que les souches de *diacétylactis* possèdent un mécanisme supplémentaire relié au métabolisme du citrate, leur permettant de s'adapter aux conditions acides (Garcia Quintans et al., 1998 ; Magni, 1999).

Il en ressort qu'afin d'assurer un équilibre constant entre les différentes espèce d'un levain multiple, il faut particulièrement veiller au respect des conditions de fabrication des levains et contrôler le plus possible les modifications éventuelles des flores.

Les sept associations extrêmophiles choisi dans les études antérieures sont : *lc.l<sub>3</sub> lc.c<sub>1</sub> lc.d<sub>1</sub>* (A1) - *lc.l<sub>5</sub> lc.c<sub>1</sub> lc.d<sub>4</sub>* (A2) - *lc.l<sub>9</sub> lc.c<sub>2</sub> lc.d<sub>2</sub>* (A3) - *lc.l<sub>9</sub> lc.c<sub>3</sub> lc.d<sub>1</sub>* (A4) - *lc.l<sub>11</sub> lc.c<sub>3</sub> lc.d<sub>3</sub>* (A5) - *lc.l<sub>13</sub> lc.c<sub>1</sub> lc.d<sub>2</sub>* (A6) et *lc.l<sub>13</sub> lc.c<sub>2</sub> lc.d<sub>1</sub>* (A7).

## **Partie 2 : ISOLEMENT, IDENTIFICATION ET DENOMBREMENT DES ESPECES DE LA FLORE INTESTINALE**

### **1. Isolement des espèces aérobies et aéroanaérobies facultatives**

#### **1.1. *E. coli***

*E. coli* est facilement isolée à partir des selles. Les observations sur milieu EMB ont révélé la présence de colonies mauves, légèrement bombées, lisses, à contours réguliers et avec une odeur nauséabonde. Les examens microscopiques ont assuré que les espèces bactériennes isolées sont des bacilles Gram négatif, mobile, catalase positif et oxydase négative, ces résultats sont similaires à ceux d'El-Hamzaoui, (2000).

L'identification biochimique par les galeries API 20 E spécifiques aux Enterobacteries a donné les résultats classés dans le tableau 14.

**Tableau 14** : Résultats de l'identification biochimique d' *E.coli* (par les galeries API 20 E)

<b>Test</b>	<b>Observation</b>	<b>Résultat</b>
ONPG	Apparition de couleur jaune	positif
ADH	Apparition d'une couleur rouge orangé	Positif
LDC	Apparition d'une couleur Rouge orangé	Positif
ODC	Apparition d'une couleur Rouge orangé	Positif
CIT	La couleur reste jaune	négatif
H <sub>2</sub> S	Production d'un dépôt noir	Positif
URE	Apparition d'une couleur rouge orangée	Positif
TDA	La couleur reste jaune	Négatif
IND	Apparition d'une couleur Rose	Positif
VP	La cupule reste incolore	Négatif
GEL	Non diffusion d'un dépôt noir	Négatif
GLU	Apparition d'une couleur jaune	Positif
MAN	Apparition d'une couleur jaune	Positif
INO	Apparition d'une couleur jaune	Positif
SOR	Apparition d'une couleur jaune	Positif
RHA	Apparition d'une couleur jaune	Positif
SAC	Apparition d'une couleur jaune	Positif
MEL	Apparition d'une couleur jaune	Positif
AMY	Apparition d'une couleur jaune	Positif
ARA	Apparition d'une couleur jaune	Positif

Après identification biochimique, on peut déduire que l'espèce isolée est *E. coli*. Le dénombrement sur milieu solide a donné  $9,80.10^6$  UFC/ml.

### *Enterococcus ssp*

Sur milieu Slanetz et Bartely, les examens macroscopiques ont révélé l'apparition de colonies de taille moyenne et de couleur rose ; alors que les examens microscopiques ont confirmé que ces colonies sont des coques regroupées en paires ou en chaînettes et Gram positif. Les caractères biochimiques utilisés pour l'identification de l'espèce sont ceux de la galerie API 20 E et les résultats trouvés sont résumés dans le tableau 15.

**Tableau 15:** Résultats de l'identification biochimique d' *Enterococcus ssp* (par les galeries API 20 E)

Test	Observation	Résultat
ONPG	Apparition d'une couleur jaune	Positif
ADH	Apparition d'une couleur rouge orangé	Positif
LDC	La couleur reste jaune	Négatif
ODC	La couleur reste jaune	Positif
CIT	La couleur reste vert pale	Positif
H <sub>2</sub> S	Production d'un dépôt noir	Négatif
URE	La couleur reste jaune	Positif
TDA	La couleur reste jaune	Négatif
IND	Apparition d'une couleur rose	Positif
VP	Apparition d'une couleur rose	Positif
GEL	Diffusion d'un pigment noir	Positif
GLU	Apparition d'une couleur jaune	Positif
MAN	Apparition d'une couleur jaune	Positif
INO	Apparition d'une couleur jaune	Positif
SOR	Apparition d'une couleur jaune	Positif
RHA	Apparition d'une couleur jaune	Positif
SAC	Apparition d'une couleur jaune	Positif
MEL	Apparition d'une couleur jaune	Positif
AMY	Apparition d'une couleur jaune	Positif
ARA	Apparition d'une couleur jaune	Positif

La charge des Enterocoques trouvés dans 1g de selles est égale à  $1,80.10^7$  UFC/ml.

*Lactobacillus ssp*

Après 24 h d'incubation, plusieurs colonies apparaissent sur le milieu MRS, pour les identifiées, nous avons procédé à la détermination de leurs caractères morphologiques, culturels et biochimiques. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 16.

**Tableau 16** : Résultats de l'étude des caractères culturels, morphologiques et biochimiques des colonies obtenues

Test	Observation	Résultat
Macroscopique	Colonie blanchâtre, légèrement allongées, convexe, de diamètre variable (1 à 2 mm)	Positif
Microscopique	Bacilles, Gram positif	Positif
Catalase	Pas d'effervescence après l'addition du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Négatif
Oxydase	Le disque reste incolore	Négatif
Mobilité	Pas d'envahissement du milieu mannitol	Négatif
Production du gaz à partir des sucres	La cloche reste au fond du tube (ne contient pas de gaz)	Négatif
Dégradation des sucres		
Saccharose	Le milieu reste rouge	Négatif
Galactose	Jaunissement du milieu	Positif
Mannose	Jaunissement du milieu	Positif
Mélibiose	Le milieu reste rouge	Négatif
Arabinose	Le milieu reste rouge	Négatif
Sorbose	Le milieu reste rouge	Négatif
Xylose	Le milieu reste rouge	Négatif
Glucose	Jaunissement du milieu	Positif
Lactose	Jaunissement du milieu	positif
Raffinose	Le milieu reste rouge	Négatif
Sorbitol	Le milieu reste rouge	Négatif
Dégradation de l'esculine	Jaunissement du milieu	Positif

Les résultats obtenus sont conformes aux ceux trouvés par Guiraud, (2003), donc nous pouvons conclure que les espèces isolées sont des *Lactobacilles ssp*.

Le dénombrement des Lactobacilles dans les selles par la méthode de comptage sur milieu solide a révélé la présence de  $2,30.10^6$  UFC/ml.

## 2. Isolement des espèces anaérobies strictes

### 2.1. Bifidobactéries

D'après Sardovi, (1986) l'isolement des bactéries anaérobies strictes comme les Bifidobactéries à partir des selles constitue une étape critique puisqu'il nécessite des conditions assez spécifiques, qui mettent en jeu des systèmes d'anaérobiose ainsi que des milieux riches et spéciaux .

Les examens macroscopiques sur milieu MRS cystéiné révèlent la présence de colonies punctiformes, lisses, à bord régulier de coloration crème. Les examens microscopiques montrent que les colonies ainsi obtenues sont des bâtonnets incurvés et courtes, isolées ou disposées en chaînettes, étoilées en V et en Y, Gram positif . Ces observations sont similaires à celles trouvées par Euzéby, (2002). Après 72 h d'incubation, le dénombrement sur milieu MRS cystéiné a révélé la présence de  $9,60.10^8$  UFC/ml. Les résultats des différents tests physiologiques et biochimiques sont donnés dans le tableau 17.

**Tableau 17** : Résultats des tests d'identification du genre Bifidobacterium

Test	Observation	Résultat
Croissance en aérobiose	Le milieu reste limpide (pas de trouble)	Négatif
Catalase	Pas d'effervescence	Négatif
Mobilité	Pas d'envahissement du milieu mannitol mobilité	Négatif
Production de gaz à partir du glucose	La cloche reste en profondeur	Négatif
Production d'indole	Absence de l'anneau rouge après l'addition du réactif de Kovacs	Négatif
Nitrate réductase	Absence d'une couleur rose après l'addition des réactifs (R1 et R2)	Négatif
La fermentation des sucres - Adonitol - Glycérol - Sorbose	La couleur ne se change pas	Négatif Négatif Négatif
La coagulation du lait cystéiné	Coagulation importante du lait après 24 h d'incubation	Positif

Les observations et résultats donnés dans le tableau précédent confirment que les souches en questions appartiennent au genre *Bifidobacterium* parce que :

Rada et Peter, (2002) montrent que les *Bifidobacteries* sont dépourvues de l'enzyme « catalase » comme elles doivent être selon Kolida et *al.*, (2000) ; RAO, (2002) : nitrate réductase négative, immobile, ne produit pas de l'indole, ne liquéfie pas la gélatine, ne produit pas de gaz à partir du glucose, incapable de fermenter l'adonitol, le glycérol et le sorbose comme il a été démontré par Larpent et Larpent (1990) ; Tamine et *al.* (1995)

Les bifidobacteries possèdent une capacité à coaguler le lait (Gomes et *al.*, 1998 ; Saarela et *al.*, 2002 ; Doleyres, 2003), et nos souches ont montré cette aptitude technologique.

## 2.2. *Bacteroides ssp*

Après 72 h d'incubation en anaérobiose sur la gélose au sang, le dénombrement a révélé la présence de  $9,78.10^8$  UFC/ml. Les examens macroscopiques montrent la présence de colonies circulaires, bombées, lisses à contour régulier, de couleur grisâtre avec un diamètre de 1 à 3 mm apparaissent sur la gélose au sang. Les tests d'identification ainsi que les résultats obtenus sont classés dans le tableau 18.

**Tableau 18:** Résultats des tests d'identification du *Bacteroides ssp*.

Test	Observation	Résultat
Catalase	Pas d'effervescence	Négatif
Oxydase	La couleur des disques ne se change pas	Négatif
Hydrolyse de l'esculine	Le milieu vire vers le jaune	Positif
Production d'hydrogène sulfureux	Pas de noircissement au niveau de l'inoculation	Négatif
Croissance sur milieu bilié	Il y a croissance dans le milieu	Positif
Acidification du glucose	Changement de couleur	Positif
Aspect macroscopique	Bacilles Gram négatif, immobiles	Positif
Hydrolyse de la gélatine	Libération des particules de charbon	Positif
Production d'indole	Absence de l'anneau rouge	Négatif

Les observations et résultats trouvés assurent que les colonies étudiées sont des colonies spécifiques de *Bactéroïdes ssp* parce que plusieurs auteurs (Shah et Collins, 1989; Miyamoto et Ttoh, 2000) définissent les bactéroïdes comme étant des espèces bactériennes anaérobies strictes qui se présentent sous forme de bacille à Gram négatif de 1,6 à 8,0 µm de largeur, immobiles, non sporulés, cultivant en présence de 20% de bile, hydrolysant l'esculine, ne produisant pas d'hydrogène sulfuré, acidifiant le glucose en produisant principalement de l'acide succinique et de l'acide acétique.

### 2.3. *Clostridium ssp*

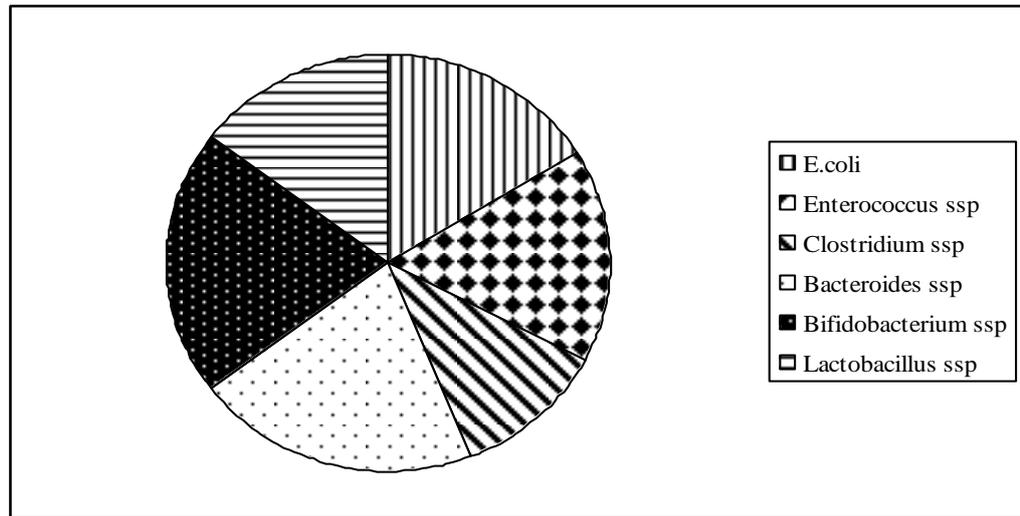
Après 120 h d'incubation à 37°C en anaérobiose sur gélose au sang ; nous avons décelé la présence de colonies brunâtres dégageant une odeur désagréable. Les résultats enregistrés par les tests biochimiques sont mentionnés dans le tableau 19.

**Tableau 19** : Résultats des tests d'identification du *Clostridium ssp*.

Test	Observation	Résultat
Etude microscopique	Bacilles Gram positif	
Catalase	Pas d'effervescence	Négatif
Oxydase	Le disque ne change pas de couleur	Négatif
Production d'indole	Absence d'anneau rouge	Négatif
Nitrate réductase	Apparition d'une couleur rouge	positif
Production d'hydrogène sulfureux	Noircissement du milieu	Positif
Uréase	Alcalinisation du milieu par le virage de l'indicateur coloré au rouge	positif
Recherche de lécithinase	Apparition d'un précipité en halo	Positif
Fermentation du glucose	Apparition d'une couleur rouge	Positif
Fermentation des sucres	Virage de l'indicateur coloré au	
- Maltose	Rouge	Positif
- Saccharose	Rouge	Positif
- Lactose	Rouge	Positif
- Salicine	Jaune	Négatif
- Amidon	Jaune	Positif
Hydrolyse de la gélatine	Libération des particules du charbon	positif

Les résultats obtenus sont en parfaite concordance avec ceux utilisés par la norme AFNOR V08-019 (ISO 7937) pour identifier les *Clostridium*, et nous avons compté environ  $7,80 \cdot 10^4$  UFC/ml dans 1g de selles.

A partir de selles d'un enfant, nous avons pu isoler les principales espèces représentatives de la flore physiologique résidente (spécifique à l'espèce humaine) et qui sont représentés par : *E. coli*, *Enterococcus ssp*, *Bifidobacterium ssp*, *Lactobacillus ssp*, *Clostridium ssp* et *Bacteroides ssp*. avec des concentrations cellulaires bien déterminées. La Répartition des espèces intestinales isolées à partir des selles est donnée par la figure 27.



**Figure 27 :** Répartition des espèces de la flore intestinale dans les selles

Murray, (1999) confirme qu'entre l'âge de 1 à 2 ans, l'enfant acquiert une flore intestinale identique à celle de l'adulte et sa composition demeure relativement stable au cours de la vie.

Les résultats trouvés semblent identiques à ceux utilisés par les normes internationales. Les laboratoires d'analyse Réunis Kutter-Liners – Hastert en France font l'analyse de la flore physiologique comme analyse de routine en se basant sur la table de référence mentionnée dans l'annexe 3.

### **Partie 3 : ETUDE DE L'EFFET ANTAGONISTE DE *LACTOCOCCUS LACTIS* SSP EXTREMOPHILES VIS-A-VIS DES ESPECES DE LA FLORE INTESTINALE**

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet antagoniste des 13 souches pures et 07 associations extrémophiles (qui ont été sélectionné sur la base de leur survie dans les conditions extrêmes du tractus gastro-intestinal), à l'égard des espèces de la flore intestinale isolées dans la deuxième partie.

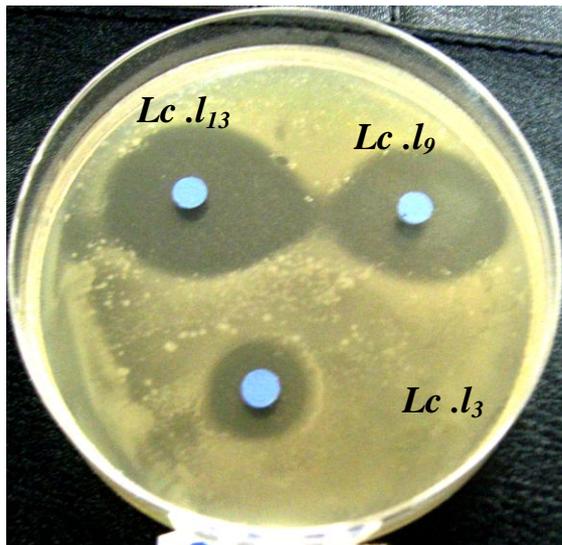
Les souches lactiques ne présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis des espèces intestinales ; elles montrent des variations plus ou moins importantes qui dépendent en premier lieu de la souche intestinale elle-même (indicatrice) et de la souche lactique (cible).

L'évaluation de l'activité antagoniste des lactocoques vis-à-vis des espèces intestinales a été faite par la méthode des disques (diffusion sur gélose) qui reste malgré ses inconvénients (indirecte, peut varier considérablement en fonction de la nature de la souche indicatrice) l'outil analytique le plus adapté pour étudier l'interaction entre deux espèces bactériennes, une est appelée indicatrice et l'autre cible (Daoudi et Fliss, 2000; Lachance, 2000 ).

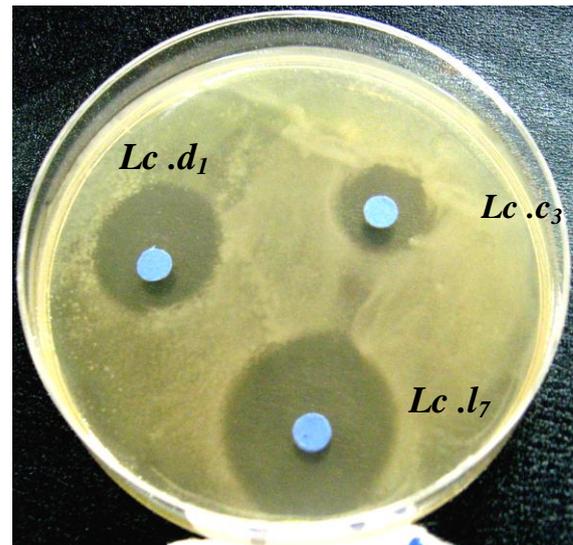
#### **1. Activité antagoniste des souches extrémophiles de *Lactococcus lactis* vis-à-vis des espèces intestinales**

##### **1.1. Vis-à-vis d'*E. coli***

D'après les résultats obtenus, il en ressort que la plupart des souches pures de *Lactococcus lactis ssp lactis* sont à l'origine de zones d'inhibitions importantes contre *E. coli*, à titre d'exemples : 10 mm pour *Lc.l<sub>3</sub>* , 20,2 pour *Lc.l<sub>9</sub>* et 30 mm pour *Lc.l<sub>13</sub>* ( figure 28). Par contre, la sous espèce *cremoris* et le biovar *diacetylactis* n'ont pas d'effet inhibiteur important contre *E. coli* et les diamètres d'inhibition n'ont pas dépassé 7 mm pour *Lc.d<sub>1</sub>* et *Lc.c<sub>3</sub>* (figure 29).

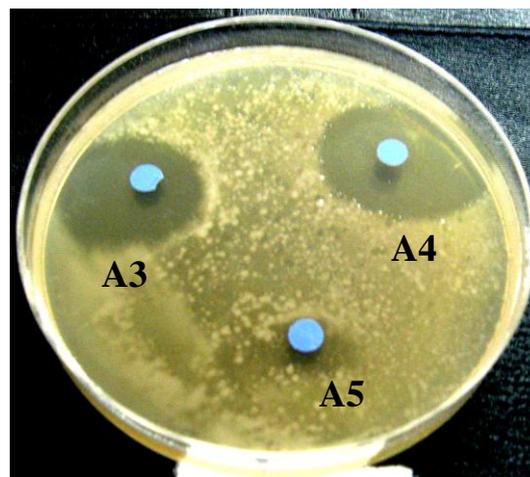


**Figure 28:** Activité inhibitrice de *Lc .l3*, *Lc .l9* et *Lc .l13* sur *E. coli*.



**Figure 29 :** Activité inhibitrice de *Lc .l7*, *Lc .d1* et *Lc .c3* sur *E. coli*.

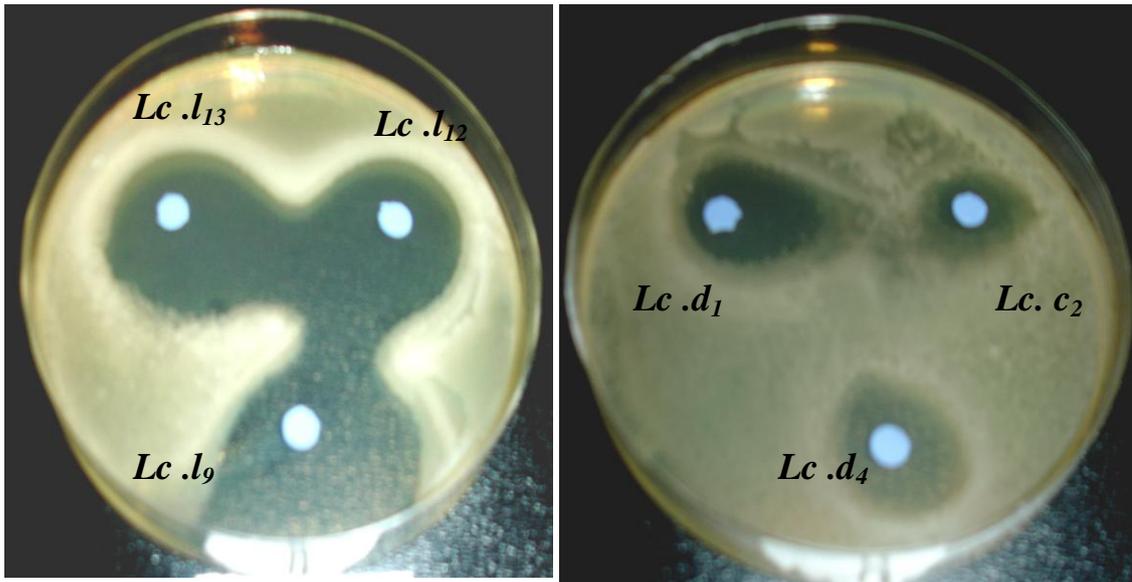
Parmi les associations testées, trois ont révélé une activité antagoniste importante vis-à-vis d' *E. coli* intestinale et sont représentées par : A1 ( $Z_i = 12$  mm), A3 ( $Z_i = 20$  mm) et A4 ( $Z_i = 20,5$  mm) alors que les autres associations n'ont montré qu'une très faible activité antagoniste, par exemple : A5 a induit une inhibition de 3,9 mm (figure 30).



**Figure 30:** Activité inhibitrice des associations A3, A4 et A5 sur *E. coli*.

### 1.2. Vis-à-vis d' *Enterococcus ssp*

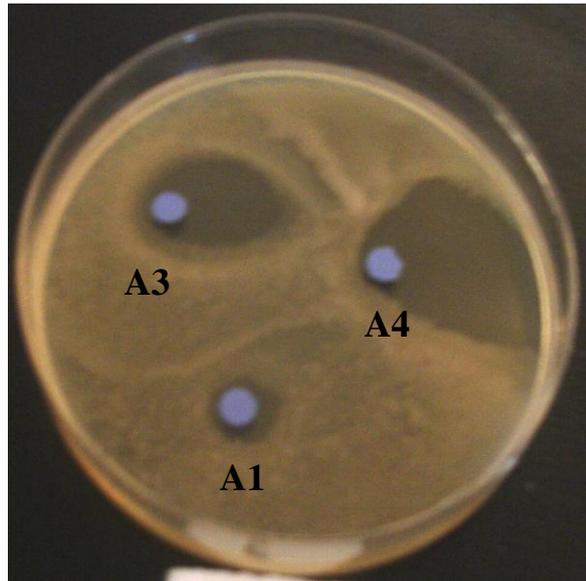
Le diamètre des zones d'inhibition vis-à-vis d' *Enterococcus ssp* est plus important que celui trouvé envers *E. coli*. A titre d'exemples les souches *Lc.l<sub>3</sub>*, *Lc.l<sub>7</sub>*, *Lc.l<sub>9</sub>*, *Lc.l<sub>11</sub>*, *Lc.l<sub>12</sub>* et *Lc.l<sub>13</sub>* ont donné des diamètres d'inhibition qui varient entre 25 et 37 mm (figure 31). De même certaines sous espèces de *cremoris* et *diacetylactis* ont montré une inhibition importante de l'ordre de 24 mm pour *Lc.d<sub>1</sub>*, 18 mm pour *Lc.d<sub>4</sub>* et 12 mm pour *Lc.c<sub>2</sub>* (Figure 32).



**Figure 31** : Activité inhibitrice de, *Lc.l<sub>9</sub>*, *Lc.l<sub>12</sub>* et *Lc.l<sub>13</sub>* sur *Enterococcus ssp*.

**Figure 32** : Activité inhibitrice de, *Lc.d<sub>1</sub>*, *Lc.d<sub>4</sub>* et *Lc.c<sub>2</sub>* sur *Enterococcus ssp*.

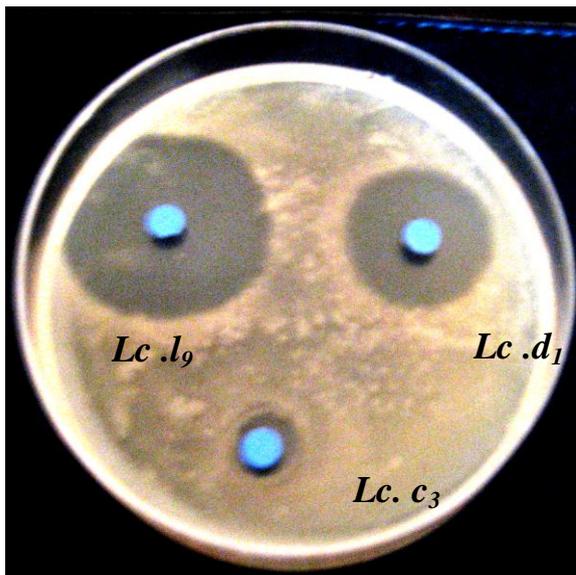
Les associations A3 et A4 ont provoqué une très bonne inhibition de l'espèce *Enterococcus ssp*. avec des diamètres de 20,2 et 30 mm respectivement (figure 33) alors que les autres n'ont révélé qu'une faible inhibition ( $Z_i < 6$  mm) comme l'association A1.



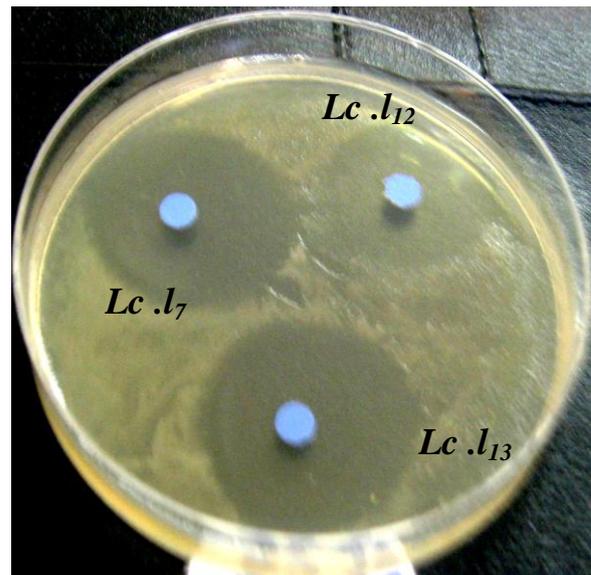
**Figure 33:** Activité inhibitrice des combinaisons A1, A3 et A4 sur *Enterococcus ssp.*

### 1.3. Vis-à-vis de *Clostridium ssp*

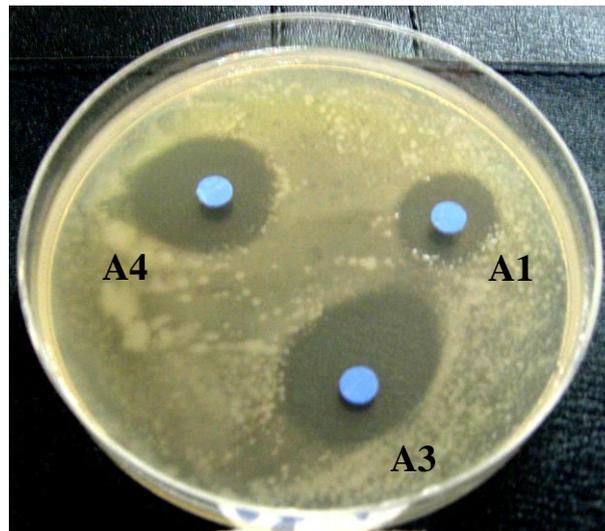
Les espèces lactiques pures ont provoqué une inhibition importante de *Clostridium ssp.* où le diamètre des zones oscille entre 29 et 32 mm pour les sous espèces *lactis*, 15 et 0 pour les sous espèces de *cremoris* et *diacetylactis* (figures 34 et 35) mais nous avons détecté que les associations testées ont donné des diamètres qui varient de 25 mm à 0,00 mm (figure 36).



**Figure 34:** Activité inhibitrice de *Lc.l9*, *Lc.d1* et *Lc.c3* sur *Clostridium ssp.*



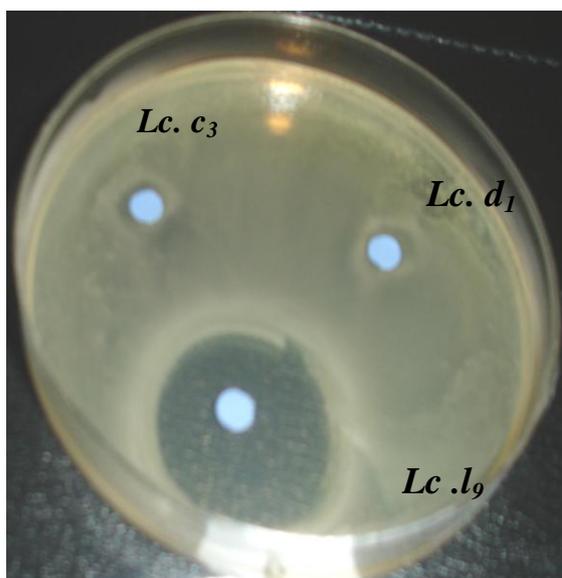
**Figure 35:** Activité inhibitrice de *Lc.l7*, *Lc.l12* et *Lc.l13* sur *Clostridium ssp.*



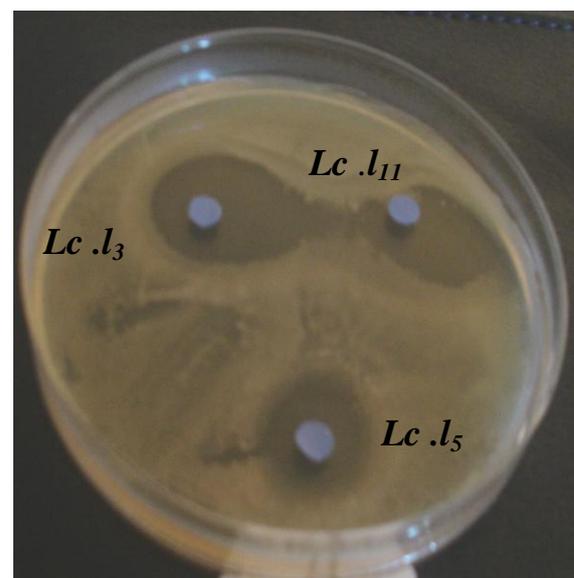
**Figure 36:** Activité inhibitrice des combinaisons A1, A3 et A4 sur *Clostridium ssp.*

#### 1.4. Vis-à-vis de *Bacteroides ssp.*

Les mêmes observations ont été tirées à partir des résultats trouvés avec les bacteroides, les diamètres des zones d'inhibition sont proches de ceux trouvés avec *E. coli* et ils varient entre 00 et 28 mm, (figures 37 et 38). Nous avons noté aussi que les faibles diamètres ont été enregistrés avec les sous espèces *cremoris* et *diacetylactis*.

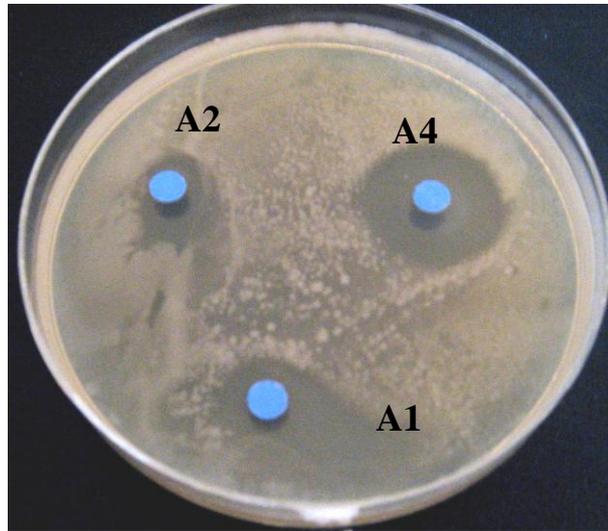


**Figure 37 :** Activité inhibitrice de *Lc .l9*, *Lc .d1* et *Lc .c3* sur *Bacteroides ssp.*



**Figure 38 :** Activité inhibitrice de *Lc .l3*, *Lc .l5* et *Lc .l11* sur *Bacteroides ssp.*

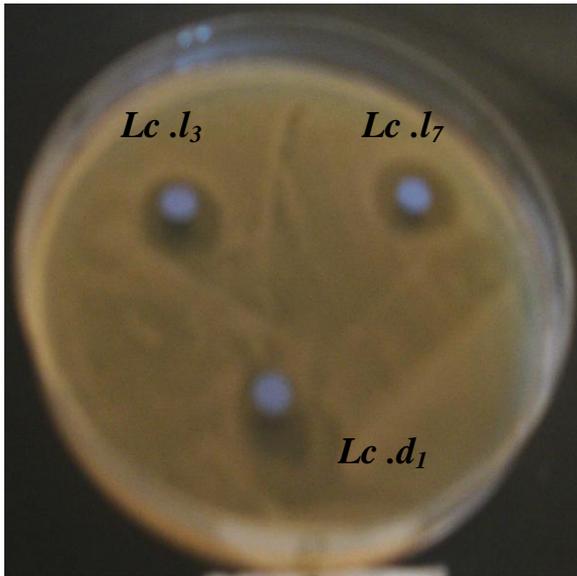
Les associations testées ont donné des inhibitions variables de *Bacteroides ssp.*, A1 a provoqué une zone de 7,9 mm, A2 de 4,4 mm et A4 de 15 mm (figure 39). D'autres n'ont révélé pas d'inhibition et le diamètre des zones a été nulle (exemple A5, A6 et A7).



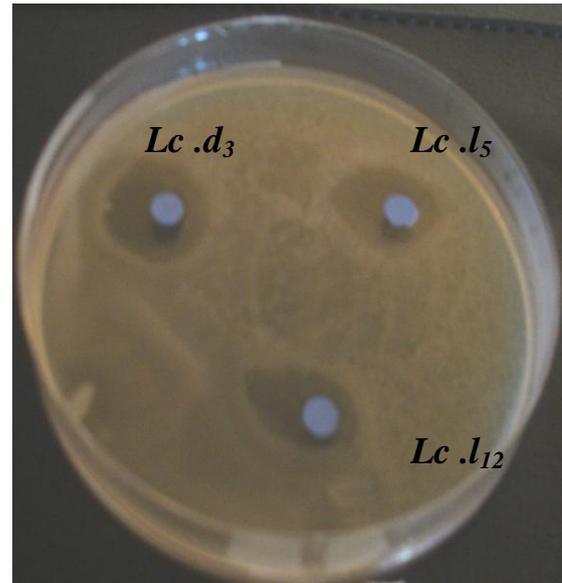
**Figure 39:** Activité inhibitrice des combinaisons A1, A2 et A4 sur *Bacteroides ssp.*

### 1.5. Vis-à-vis de Bifidobacteries et Lactobacillus

Contrairement aux résultats trouvés avec les autres espèces, les souches lactiques pures ou en association n'ont pas d'effet inhibiteur contre les Bifidobactéries ou les Lactobacilles. Nous avons enregistré des zones d'inhibitions avec des diamètres faibles voire nulle pour toutes les espèces testées (figures 40 et 41).



**Figure 40:** Activité inhibitrice de, *Lc .l3*, *Lc .l7* et *Lc .d1* sur *Bifidobacterium ssp.*



**Figure 41:** Activité inhibitrice de *Lc .l5*, *Lc .l12* et *Lc .d3* sur *Lactobacillus ssp.*

Les treize souches lactiques pures testées présentent une activité antagoniste importante vis-à-vis des espèces Gram positif et Gram négatif de la flore intestinale humaine tandis qu'aucun effet n'a été observé sur *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus*, cela est due à la capacité de ces deux dernières espèces à produire des substances antagonistes vis-à-vis de *Lactococcus lactis*. Ces substances sont des bactériocines dont le spectre d'action touche des espèces taxinomiquement proches d'eux (Garnaux et al., 2002).

Nous avons remarqué aussi que la sous espèce *lactis* est plus active que les autres sous espèces avec toutes les souches, et que les associations bactériennes n'ont pas montré une action importante vis-à-vis des espèces intestinales à l'exception de A4, ceci est due à l'effet antagoniste entre les souches de la même combinaison. Kojic et al. (1991) montrent que *Lactococcus lactis ssp lactis* biovar *diacetylactis* peut produire des substances inhibitrices de la croissance de plusieurs espèces du genre *Lactococcus*. De même Van Belkum et al. (1992) assurent que les souches de *Lactococcus lactis ssp cremoris* ont la capacité de synthétiser des substances actives contre *Lactococcus lactis ssp cremoris* et *diacetylactis* et même contre d'autres bactéries lactiques.

La différence dans l'activité inhibitrice entre les souches d'une même espèce est due à une faible homologie de leurs acides nucléiques responsables des caractères héréditaires (Sutra et al., 1998).

## 2. Localisation des substances inhibitrices

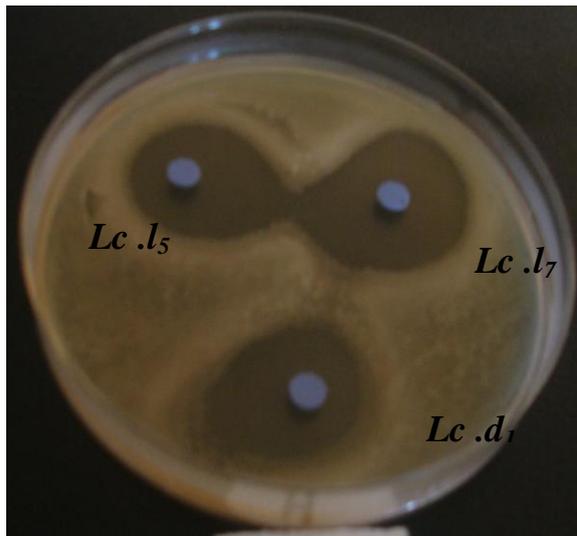
L'activité inhibitrice des lactocoques vis-à-vis des espèces de la flore intestinale est provoqué soit par les cellules elles même, soit par des substances extracellulaires produites par les souches (Labioui, 2005).

A partir des meilleures zones d'inhibition, nous avons sélectionné sept souches pures de *Lactococcus lactis ssp lactis* (*Lc .l<sub>3</sub>*, *Lc .l<sub>5</sub>*, *Lc .l<sub>7</sub>*, *Lc .l<sub>9</sub>*, *Lc .l<sub>11</sub>*, *Lc .l<sub>12</sub>* et *Lc .l<sub>13</sub>*), une de biovar *diacetylactis* (*Lc .d<sub>1</sub>*) et la combinaison A4 pour localiser la ou les substance (s) responsable (s) de l'interaction.

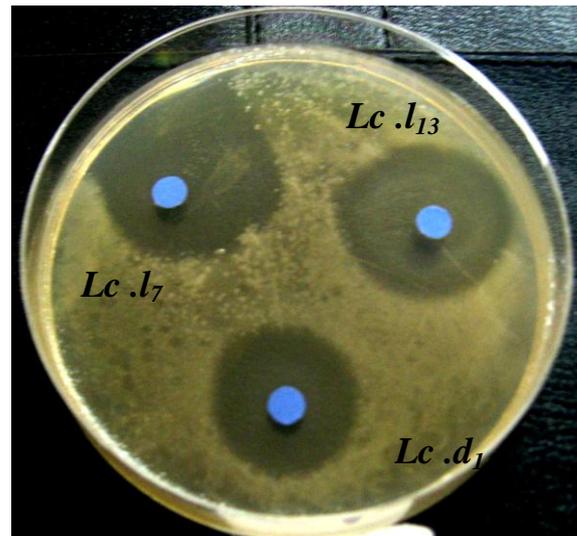
Les diamètres des zones d'inhibition trouvées lors de l'interaction des souches cibles avec les culots bactériens sont pratiquement nulles, cela assure que les fractions cellulaires ne présentent aucun effet sur la croissance des souches cibles (tableau 20), par contre, les fractions extracellulaires (surnageants) présentent un fort pouvoir antibactériens contre *Enterococcus ssp* (figure 42), *Clostridium ssp* (figure 43) et *Bacteroides ssp* (figure 44) et *E. coli* (figure 45).

**Tableau 20** : Diamètre des zones d'inhibitions (en mm) causées par les extraits cellulaires (culots) et les fractions extracellulaires (surnageants).

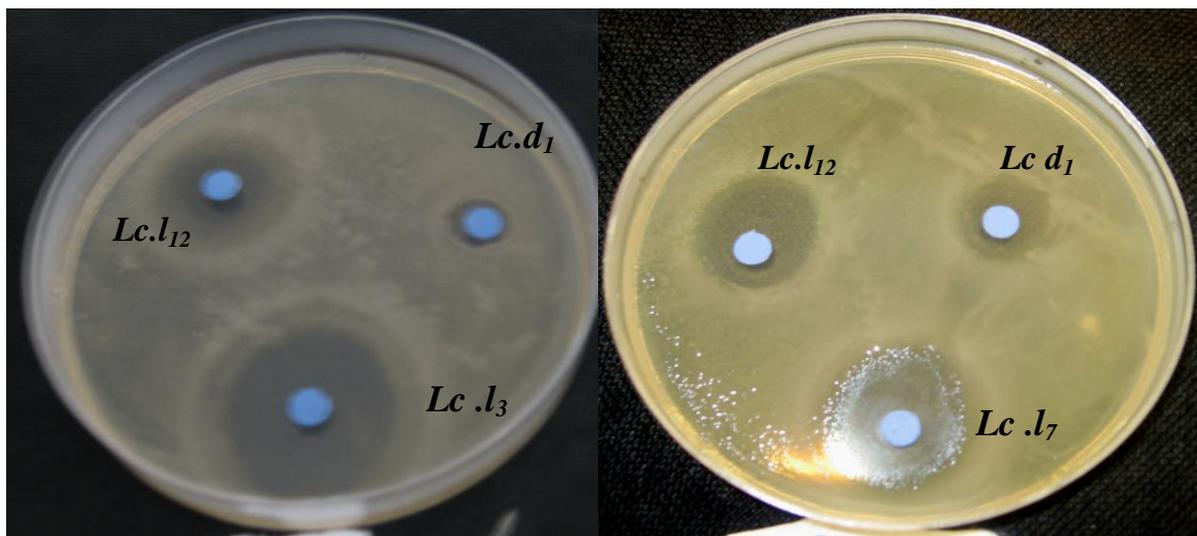
	<i>E. coli</i>		<i>Enterococcus ssp</i>		<i>Clostridium ssp</i>		<i>Bacteroides ssp</i>		<i>Bifidobacterium ssp</i>		<i>Lactobacillus ssp</i>	
	Surnageant	Culot	Surnageant	Culot	Surnageant	Culot	Surnageant	Culot	Surnageant	Culot	Surnageant	Culot
<i>Lc .l<sub>3</sub></i>	18,4 ± 1,0	0,0	25,0 ± 0,7	0,0	30,0 ± 0,0	0,0	28,0 ± 0,2	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0
<i>Lc .l<sub>5</sub></i>	21,0 ± 0,9	0,0	21,2 ± 0,1	0,0	31,1 ± 0,9	0,0	15,0 ± 0,5	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0
<i>Lc .l<sub>7</sub></i>	18,0 ± 0,0	0,0	30,1 ± 0,7	0,0	32,0 ± 0,1	0,0	28,0 ± 0,4	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0
<i>Lc .l<sub>9</sub></i>	27,3 ± 0,3	0,0	34,5 ± 0,9	0,0	35,0 ± 0,8	0,0	21,0 ± 0,4	0,0	1,0 ± 0,8	0,0	7,5 ± 0,5	0,0
<i>Lc .l<sub>11</sub></i>	20,5 ± 0,8	0,0	25,1 ± 0,3	0,0	25,0 ± 0,4	0,0	28,0 ± 0,1	0,0	2,9 ± 0,2	0,0	8,7 ± 0,1	0,0
<i>Lc .l<sub>12</sub></i>	12,0 ± 0,2	0,0	34,4 ± 0,1	0,0	12,0 ± 0,3	0,0	13,9 ± 0,9	0,0	4,2 ± 0,0	0,0	3,9 ± 0,2	0,0
<i>Lc .l<sub>13</sub></i>	24,0 ± 0,5	0,0	33,0 ± 0,3	0,0	29,9 ± 0,7	0,0	18,5 ± 0,6	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0
<i>Lc .d<sub>1</sub></i>	7,9 ± 0,2	0,0	15,1 ± 0,5	0,0	21,0 ± 0,2	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0
A4	20,5 ± 0,2	0,0	30,5 ± 0,5	0,0	18,9 ± 0,2	0,0	10,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0	0,0



**Figure 42:** Activité inhibitrice des surnageants de *Lc.l5*, *Lc.l7* et *Lc.d1* sur *Enterococcus ssp.*



**Figure 43:** Activité inhibitrice des surnageants de *Lc.l7*, *Lc.l13* et *Lc.d1* sur *Clostridium ssp.*



**Figure 44:** Activité inhibitrice des surnageants de *Lc.l3*, *Lc.l12* et *Lc.d1* sur *Bacteroides ssp.*

**Figure 45:** Activité inhibitrice des surnageants de *Lc.l7*, *Lc.l12* et *Lc.d1* sur *E.coli*.

Plusieurs études actuelles assurent que les fractions bactériennes cellulaires n'ont aucun effet sur la croissance des souches cibles, par contre la fraction extracellulaire contient des substances responsables de cette interaction (Achemchem et Abrini, 1997 ; Labioui et *al.* 2005). Les lactocoques sont capables de produire deux substances majeurs (acide lactique et bactériocines) responsables de l'effet antagoniste vis-à-vis des espèces intestinales.

### 3. Effet de l'acide lactique

Après élimination de l'effet des substances protéiques (bactériocines et autres) ; l'activité de l'acide lactique sur les espèces intestinales, étudiée par la méthode de diffusion sur gel, se traduit par l'apparition de zones d'inhibitions dont les diamètres sont négligeables voire nulle dans la plupart des cas (tableau 21).

**Tableau 21:** Diamètres d'inhibition trouvés par l'utilisation de l'acide lactique (en mm).

	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus</i> <i>ssp</i>	<i>Clostridium</i> <i>ssp</i>	<i>Bacteroides</i> <i>ssp</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>ssp</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>ssp</i>
<i>Lc .I<sub>3</sub></i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Lc .I<sub>5</sub></i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Lc .I<sub>7</sub></i>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Lc .I<sub>9</sub></i>	7,0 ± 0,4	1,0 ± 0,8	0,0 ± 0,8	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Lc .I<sub>11</sub></i>	0,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1	2,0 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Lc .I<sub>12</sub></i>	1,5 ± 0,1	0,8 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Lc .I<sub>13</sub></i>	0,0 ± 0,8	2,0 ± 0,3	0,0 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Lc .dI</i>	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>A4</b>	0,0 ± 0,3	1,1 ± 0,9	0,5 ± 0,9	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Les lactocoques produisent majoritairement de l'acide lactique L (+) (Duwat et al., 2001) ; alors que plusieurs études ont montré que l'effet antagoniste de l'acide lactique est provoqué par l'acide L (-) ou D (+).

Dans ce cadre, les travaux de Sutra et al. (1998) confirment que l'inhibition des bactéries pathogènes ne dépend pas de la quantité d'acide lactique produite par les bactéries lactiques, mais elle est liée au type (L (-), D (+) ou les deux) et à la forme dissociée ou non de l'acide lactique. L'effet du pH est renforcé par la forme sous laquelle se trouve l'acide lactique et produit lors de la fermentation. En effet, c'est la forme non dissociée de l'acide lactique qui prédomine à pH acide, elle est généralement plus toxique pour les cellules microbiennes intestinales.

A ce titre, s'inscrit également l'étude réalisée par Guitarni, (2005) qui a révélé que la nature de l'acide lactique est la seule responsable de son activité inhibitrice mais pas de sa quantité dans le milieu.

#### 4. Effet des bactériocines

La lecture de l'activité bactériocinogénique des souches lactiques testées se fait par la mesure des diamètres d'inhibition en mm après la neutralisation du surnageant et l'élimination des parties protéiques.

De l'ensemble des résultats résumés dans le tableau 22, il en ressort que les diamètres des zones d'inhibitions restent toujours très importants ; ce qui nous assure que les souches lactiques testées ont produit des bactériocines qui ont fortement inhibé la croissance des Enterocoques (à titre d'exemple *Lc .l<sub>9</sub>* a provoqué une inhibition de 24 mm) et de *Clostridium* avec un diamètre de 32 mm. Par contre, le diamètre des zones observées à l'égard d'*E. coli* et des *bacteroides ssp* est faible à l'exception de *Lc.l<sub>9</sub>* et *Lc.l<sub>13</sub>* qui ont provoqué des inhibitions respectives de :

- 18 et 25 mm de diamètre envers *E. coli* ;
- 9 mm et 15 mm envers *Bacteroides ssp.*,
- négligeables vis-à-vis de *Lactobacillus ssp.*,
- et nuls vis-à-vis de *Bifidobacterium ssp.*

**Tableau 22 :** Diamètres des zones d'inhibitions (mm) provoquées par les bactériocines des souches lactiques vis-à-vis des espèces intestinales.

	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus ssp</i>	<i>Clostridium ssp</i>	<i>Bacteroides ssp</i>	<i>Bifidobacterium ssp</i>	<i>Lactobacillus ssp</i>
<i>Lc .l<sub>3</sub></i>	8,0 ± 0,2	4,0 ± 0,9	9,0 ± 0,8	8,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Lc .l<sub>5</sub></i>	2,6 ± 0,6	6,1 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,4 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Lc .l<sub>7</sub></i>	4,0 ± 0,9	8,8 ± 0,5	10,0 ± 0,3	4,9 ± 0,1	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,2
<i>Lc .l<sub>9</sub></i>	18,0 ± 0,2	24,0 ± 0,9	32,0 ± 0,2	9,8 ± 0,5	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,9
<i>Lc .l<sub>11</sub></i>	7,3 ± 0,6	15,6 ± 0,1	19,0 ± 0,1	12,0 ± 0,4	0,0 ± 0,0	6,6 ± 0,6
<i>Lc .l<sub>12</sub></i>	4,6 ± 0,0	22,9 ± 0,4	31,0 ± 0,7	7,9 ± 0,9	0,0 ± 0,0	2,9 ± 0,1
<i>Lc .l<sub>13</sub></i>	25,5 ± 0,4	30,0 ± 0,5	21,9 ± 0,4	15,0 ± 0,3	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,9
<i>Lc .d<sub>1</sub></i>	0,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	12,0 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>A4</b>	9,0 ± 0,5	30,0 ± 0,0	14,0 ± 0,9	4,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que les bactériocines produites par les différentes espèces lactiques exercent :

- un effet fortement inhibiteur de la croissance des bactéries Gram positif (*Enterococcus ssp* et *Clostridium ssp*) ;
- un effet modéré « selon les souches » vis-à-vis des espèces Gram négatif (*E. coli* et *Bacteroides*) ;
- et un effet négligeable à l'égard des bactéries lactiques (*Lactobacillus*) et pseudo- lactiques (bifidobactéries).

Effectivement, Thauhault et *al.* (1991) ; Jack (1995) ; Onda et *al.* (2003) confirment que les bactéries gram positif sont plus sensibles à l'effet bactéricide ou bactériostatique des bactéries lactiques où les bactériocines produites par ces dernières agissent sur les bactéries gram positif en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires. De même Song et Richard, (1997) ont montré chez certaines bactéries Gram positif que les cellules résistantes aux bactériocines ont une membrane de composition différente de celle des cellules sensibles.

Achemchem et Abrini, ( 1997) ont isolé aussi des souches lactiques actives vis-à-vis des bactéries gram positifs ( diamètre variable entre 15 et 20 mm) mais inactives contre des bactéries Gram négatif tel que *E. coli* où les zones d'inhibition ont été nulles.

Dans le même contexte, d'autres études assurent que le spectre d'action des bactériocines, qui se définit comme étant la diversité des bactéries sensibles à l'action bactéricide ou bactériostatique du peptide peut toucher des bactéries gram négatif, par exemple Labioui, (2005) a trouvé que parmi trois souches de *Lactobacillus* productrices de bactériocines, une était active contre des bactéries gram négatif tandis que les trois sont actives contre des bactéries gram positif.

Les résultats que nous avons trouvé vont dans le même sens que ceux trouvés par Vinod Kumar et *al.* (2006) qui ont isolé du radis, une souche de *Lactococcus lactis* qui possède une activité antimicrobienne contre plusieurs espèces Gram négatif.

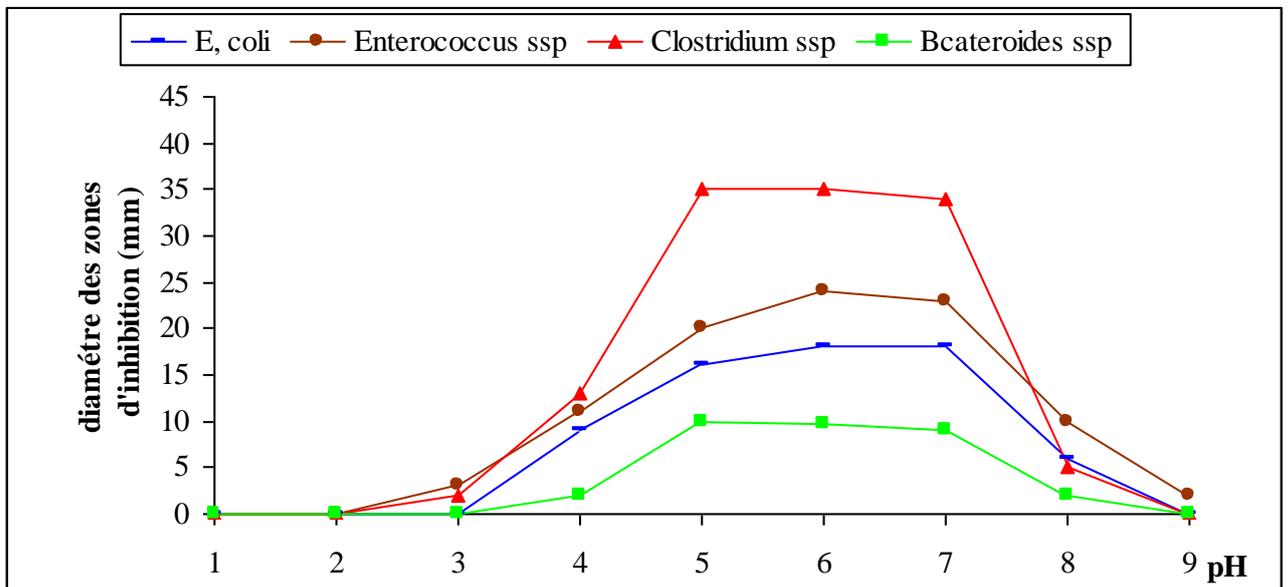
## 5. Etude de l'influence des barrières physiologiques du tube digestif sur l'action des bactériocines

Les barrières physiologiques qui peuvent influencer l'action des bactériocines sont représentées principalement par le pH et les enzymes digestives protéolytiques.

Afin d'étudier l'action de ces dernières sur l'activité des bactériocines dans le tube digestif, nous avons sélectionné la souche *Lc.l<sub>9</sub>* qui a donné des zones d'inhibitions maximales dans tout les cas.

### 5.1. Action du pH

Le pH du tractus digestif n'est pas stable et il varie considérablement d'un compartiment à un autre (de 2 à 4,5 au niveau de l'estomac jusqu'à 6 à 6,5 au niveau des intestins). Pour déterminer l'action de ce pH sur l'activité des bactériocines, nous avons testé, par la méthode de diffusion sur gélose, l'activité des surnageants ajustés à différents pH (de 1 à 9) vis-à-vis des souches intestinales sensibles (*E. coli*, *Enterococcus ssp*, *Clostridium ssp* et *Bacteroides ssp*) et les résultats trouvés sont portés dans la figure 46.



**Figure 46:** Effet du pH sur l'activité inhibitrice des bactériocines produites par la souche *Lc.l<sub>9</sub>* vis-à-vis des espèces intestinales sensibles

L'activité des bactériocines ne se manifeste significativement qu'à des pH supérieurs à 4. Les activités maximales sont observées à pH compris entre 5 et 7. Au-delà du pH 7, l'activité des bactériocines diminue rapidement pour s'annuler au pH 9.

Des arguments de plus en plus majeurs s'accroissent en faveur de ce résultat ; Bogovic – Matijasic et Rogel, (1998) ; Gomes et *al.*, (1998); Frenandez – Murga et *al.* (2000) ; Vinod Kumar et *al.* (2006) ont démontré que le pH optimal de production des bactériocines par les bactéries lactiques est 6,5, de plus, ils ont confirmé que l'action de ces bactériocines est maximale au même pH (6,5).

A travers ces résultats, nous pouvons conclure que le pH intestinal est optimal pour la production de bactériocines et pour l'expression de son activité.

### **5.2. Action des enzymes digestives**

Après neutralisation du surnageant (pH 6,5) et son traitement par la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine A, son activité inhibitrice a disparu et les diamètres des zones d'inhibition ont été nulle, ce qui assure que les enzymes protéolytiques ont détruit ces bactériocines.

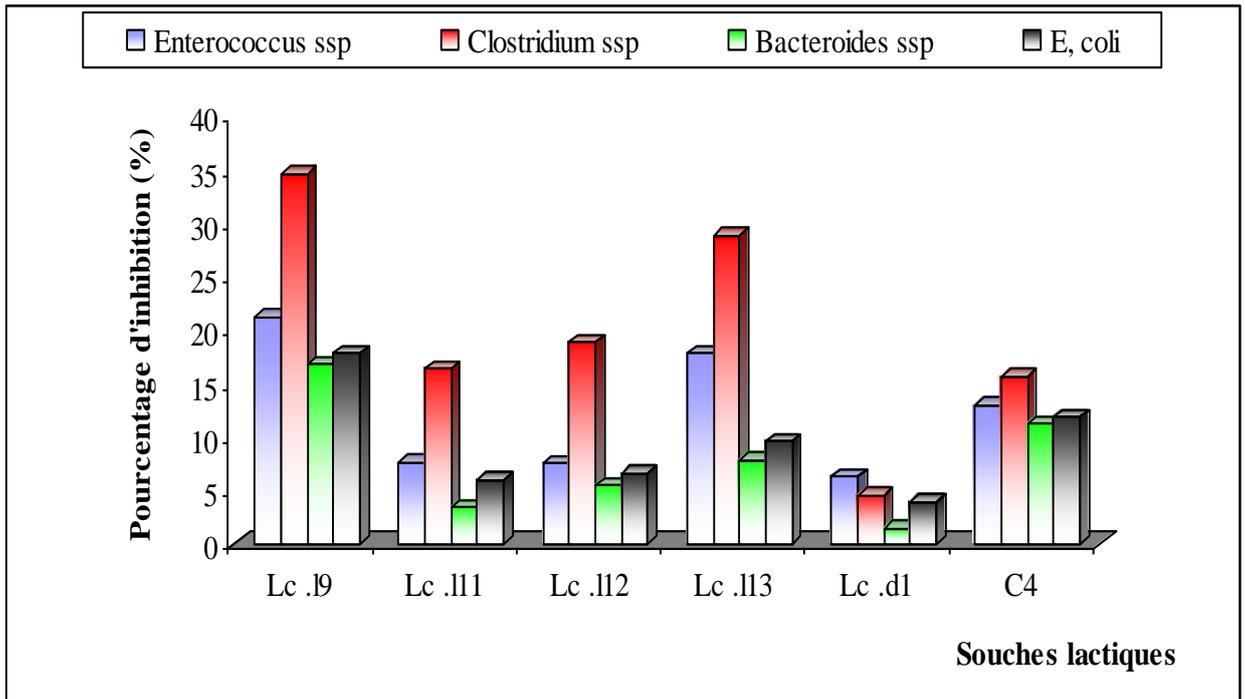
Ce résultat confirme celui de Achemchem et Abrini, (1997) qui ont trouvé, sur 100 isolats de bactéries lactiques 31 ont une activité inhibitrice sensible au moins à l'une des 3 enzymes digestives (trypsine, chymotrypsine et pepsine A), La partie biologiquement active de la bactériocine est donc de nature protéique.

A partir de cette étude, nous pouvons conclure que l'intestin est un milieu favorable pour la production et le fonctionnement des bactériocines, mais cette production est en stricte relation avec la présence des souches lactiques au niveau colique, ce qui renforce l'obligation de sélectionner des souches extrémophiles qui peuvent survivre dans le tube digestif et exprimer leur activités.

### **6. Détermination du pourcentage d'inhibition par les bactériocines**

Afin de déterminer le pourcentage d'inhibition des bactériocines, nous avons sélectionné les souches qui ont donné de meilleures zones d'inhibition (les diamètres les plus importants) et qui sont représentées par : *Lc.l<sub>9</sub>*, *L.l<sub>11</sub>*, *L.l<sub>12</sub>*, *L.l<sub>13</sub>*, *Lc.d<sub>1</sub>* et la combinaison A4.

L'examen spectrophotométrique des tubes contenant la souche cible et la bactériocine incubée pendant 24 h à 37°C, a donné des résultats très discordant et variables selon les souches utilisées (figure 47).

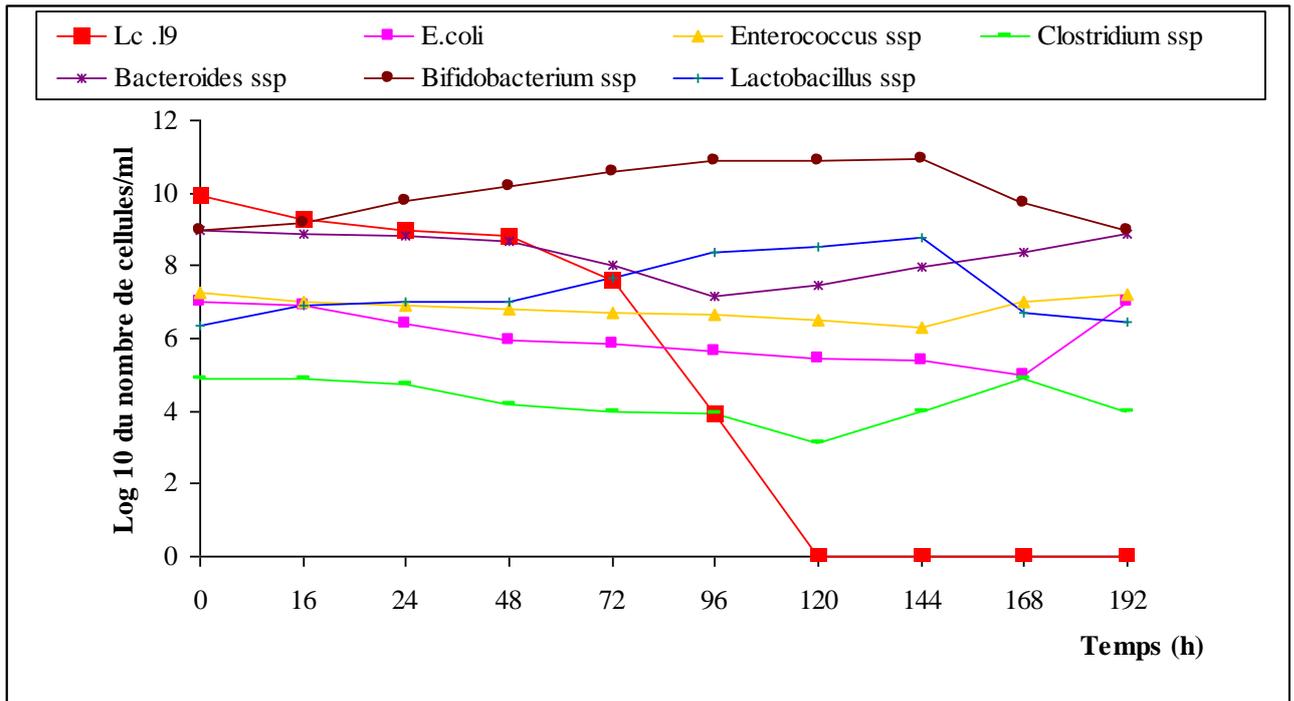


**Figure 47:** Pourcentage d'inhibition Des souches intestinales par les bactériocines des souches lactiques extremophiles

Les résultats nous indiquent que le pourcentage d'inhibition des bactéries gram positifs (*Enterococcus* et *Clostridium*) est plus élevé que celui des Gram négatif (*E.coli* et *Bacteroides ssp*) comme nous avons élucidé que la souche *Lc.l9* a donné le meilleur pourcentage d'inhibition.

### 7. Détermination de la charge des espèces intestinales après l'interaction

La souche *Lc.l9* a donné le meilleur pourcentage d'inhibition vis à vis des espèces de la flore intestinale donc, elle a été utilisée pour déterminer les charges bactériennes des différentes espèces pendant 192 h (8 jours) d'incubation par la méthode de co-culture.



**Figure 48:** Evaluation du nombre des espèces intestinales et de la souche *Lc.l<sub>9</sub>* après 192 h d'incubation

Le nombre de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* a connu une augmentation de deux unités logarithmiques soit  $10^2$  cellules/ml après 144 h d'incubation, le nombre de bactéries reste important même après la disparition de l'espèce lactique, ce qui assure que l'activité antagoniste de *Lactococcus lactis ssp lactis* est due aux produits bactériens qui peuvent exercer leur effets même en absence des souches productrices.

Au contraire, une diminution remarquable de la charge bactérienne de *Clostridium ssp.*, *Enterococcus ssp.*, *E. coli* et *Bacteroides ssp.* a été observé après 6 jours de contact avec les lactocoques. La charge des espèces intestinales revient aux valeurs initiales après 7 jours d'incubation, ce qui assure que la substance produite par *Lc.l<sub>9</sub>* a exercé un effet transitoire sur les espèces intestinales (figure 48).

Collin et al. (2003) ont trouvé, chez 80 volontaires ayant reçu pendant 21 jours un lait fermenté contenant  $10^{10}$  UFC/ml de bactéries lactiques en comparaison avec un lait frais, une élévation significative mais transitoire des comptes de *Lactobacillus* alors que les *Bifidobacterium*, les *Bacteroides* et les *Enterobacteries* n'ont été pas significativement modifiés.

Par ailleurs, Bernbom et *al.* (2005) ont étudié l'influence de *Lactococcus lactis* sur les espèces de la flore intestinale chez des rats xénobiotiques (colonisés par des espèces intestinales d'origine humaine), les résultats trouvés montrent une augmentation significative du nombre de Bifidobacterium et Lactobacillus dans les selles des rats et une diminution du nombre d'Enterocoques dans l'ilioen, le caecum et le colon dans une période de 8 jours a été observée.

A partir de cette étude, il ressort que les bactériocines produites par les lactocoques sont capables de modifier la répartition des espèces intestinales dans le colon même en absence de la souche productrice, donc l'adhésion et la persistance de cette dernière pendant une lente durée dans le colon n'est pas obligatoire pour que les bactériocines exercent leurs effets, il suffit que les souches lactiques existent un certains temps dans l'intestin pour produire et sécrété ces substances.

Plusieurs études confirment que les bactériocines des espèces lactiques sont produites à la fin de la phase exponentielle de croissance (après 7 à 8 h chez *Lactococcus lactis*), Ten Brink et *al.* (1994) assurent que la sécrétion de la bactériocine acidocine B a été observée chez la souche *Lactobacillus acidophilus* M 46 à la fin de la croissance pour atteindre le maximum de sécrétion en phase stationnaire. Amrouche, (2003) a trouvé aussi que les bactériocines de *Lactococcus lactis* (qui ont une activité antagonistes vis-à-vis d'autres espèces bactériennes) sont produites durant la phase exponentielle de croissance lorsque la moitié de biomasse formée est dépassée.

## **Conclusion**

Un microorganisme probiotique est connu par sa capacité d'atteindre et de survivre dans l'environnement dans lequel il doit agir, c'est pourquoi de nombreuses études visent à sélectionner des souches capables de tolérer l'acidité gastrique, les sels biliaries, d'adhérer temporairement aux cellules épithéliales et de produire des substances antagonistes.

Dans la première partie, l'étude de la survie de vingt souches de *Lactococcus lactis* pure et de dix associations bactériennes nous a permis de sélectionner treize souches pures (*Lc.l3*, *Lc.l5*, *Lc.l7*, *Lc.l9*, *Lc.l11*, *Lc.l12*, *Lc.l13*, *Lc.d1*, *Lc.d3*, *Lc.d4*, *Lc.c1*, *Lc.c2*, *Lc.c3*) et sept associations (*lc.l3 lc.c1 lc.d1* - *lc.l5 lc.c1 lc.d4* - *lc.l9 lc.c3 lc.d1* - *lc.l9 lc.c2 lc.d2* - *lc.l11 lc.c3 lc.d3* - *lc.l13 lc.c2 lc.d1* - *lc.l13 lc.c1 lc.d2*) résistantes aux conditions extrêmes du tube digestifs et qu'on les a qualifié d'extrémophiles.

Dans la deuxième partie, nous avons pu isoler à partir des selles d'un enfant âgé de huit ans en bonne santé, des espèces représentatives de la flore intestinale humaine dont nous avons isolé deux espèces aérobies strictes (*E. coli* et *Enterococcus ssp.*), une espèce micro-aérophile (*Lactobacillus ssp.*) et trois espèces anaérobies strictes (*Bifidobacterium ssp.*, *Clostridium ssp* et *Bacteroides ssp.*).

L'étude de l'activité antagoniste des souches extrémophiles sélectionnées et des espèces isolées de la flore intestinale a donné les résultats suivants :

❖ Les espèces de *Lactococcus lactis* en général et de *Lactococcus lactis ssp lactis* spécialement ont révélé une activité inhibitrice très importante à l'égard des espèces intestinales Gram positif (*Clostridium ssp* et *Enterococcus ssp*), importante vis-à-vis des Gram négatif (*E. coli* et *Bacteroides ssp.*), alors que cette activité est négligeable vis-à-vis de *Bifidobacterium ssp.* et *Lactobacillus ssp.* ;

❖ La ou les substance (s) responsable (s) de l'activité inhibitrice se localise (ent) dans les fractions extracellulaires parce que les zones d'inhibitions ont été détectées lors de traitement, après centrifugation, des souches avec les surnageants lactiques et n'ont pas avec les culots bactériens ;

❖ L'identification des substances responsables de l'activité des lactocoques vis-à-vis des espèces intestinales a montré que l'acide lactique produit par ces dernières ne joue aucun effet antagoniste alors que des substances de nature protéique appelés bactériocines ont provoqué des zones d'inhibition importante. Ces substances existent dans les surnageants bactériens ;

❖ Les bactériocines se sont montrées sensibles aux variations du pH, aucune activité n'a été détectée à pH acide (de 1 jusqu'à 4) ou basique (8 et 9), un pH compris entre 5 et 7 semblerait optimum pour le fonctionnement des bactériocines (le pH intestinale = 6,5). Les enzymes protéolytiques (pepsine A, trypsine et chymotrypsine) ont altéré complètement l'activité antagoniste des bactériocines;

❖ Les souches qui ont possédé des activités inhibitrices importantes représentées par *Lc.l<sub>9</sub>*, *Lc.l<sub>11</sub>*, *Lc.l<sub>12</sub>*, *Lc.l<sub>13</sub>* et *Lc.d<sub>1</sub>* et l'association *lc.l<sub>9</sub> lc.c<sub>2</sub> lc.d<sub>2</sub>* ont donné des pourcentages d'inhibition variables vis-à-vis des espèces intestinales. Le pourcentage d'inhibition des bactéries gram positif (*Enterococcus* et *Clostridium*) est plus élevé que celui des Gram négatif (*E.coli* et *Bacteroides ssp.*). Comme nous avons trouvé que la souche *Lc.l<sub>9</sub>* a donné le meilleur pourcentage d'inhibition, elle a été sélectionnée pour déterminer les charges bactériennes des espèces intestinales après l'interaction.

❖ Le nombre de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* augmente avec le temps d'incubation même après la disparition de l'espèce lactique. Au contraire, une diminution remarquable de la charge bactérienne de *Clostridium ssp.*, *Enterococcus ssp.*, *E. coli* et de *Bacteroides ssp.* a été notée au bout de 6 jours de contact avec les lactocoques. La charge des espèces intestinales revient aux valeurs initiales après 7 jours d'incubation, ce qui assure que la substance produite par *Lc.l<sub>9</sub>* a exercé un effet transitoire sur les espèces intestinales.

Les résultats obtenus montrent que les espèces de *Lactococcus lactis* survivent en harmonie avec les espèces banales de la flore intestinale (*Lactobacillus ssp.* et *Bifidobacterium ssp.*) tandis qu'elles limitent la propagation des souches qui peuvent toucher la santé de l'homme (spécialement : *Clostridium ssp.* et *Bacteroides ssp.*) mais d'une façon transitoire. Cette présence transitoire a deux corollaires : d'une part, les effets ne sont durables et observables que lors de consommation prolongées de bactéries lactiques, d'autre part, le consommateur reste libre d'avoir ou non des lactocoques dans son tube digestif et cela pour le laps de temps qu'il désire.

En perspective, il serait intéressant d'envisager les études suivantes :

- ❖ Elargir la gamme des souches testées par l'introduction d'autres espèces intestinales ;
- ❖ Suivre l'effet des bactériocines sur les espèces de la flore intestinale *in vivo* ;
- ❖ Identification et purification des bactériocines produites ;
- ❖ Essai d'application des bactériocines pour contrôler les charges des espèces intestinales.

Références bibliographiques

1. **ACHEMCHEM F. et ABRINI J., (1997).** Production de bactériocines par des bactéries lactiques à partir du jben de chèvre du Nord du Maroc. *Journal of Applied Microbiology*, 70: 660-669.
2. **ALAIS C., (1984).** Sciences du lait : principes des techniques laitières, 4<sup>ème</sup> Edition, Paris, 814 p.
3. **ALBANO H., OLIVEIRA M., AROSO R., CUBERO N., HOGG T. et TEIXEIRA P., (2007).** Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from “Alheiras” (traditional portuguese fermented sausages) *In situ* assays. *Meat Science*, 76: 796-800.
4. **ALVES V.F., MARTINEZ R. C. R., LAVRADOR M. A. S. et DE MARTINIS E. C. P., (2006).**, Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham, *Meat Science* , 74: 623-627.
5. **AMMOR S., TAUVERON G., DUFOUR E. et CHEVALLIER I., (2006).** Antimicrobiol activity lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control*, 17: 454-461.
6. **AMROUCHE Loubna., (2003).** Purification et caractérisation d’une bactériocine produite par des Streptocoques lactiques mésophiles (Lactocoques) isolés localement. *Mémoire de magister*, Université INA, Elherrache, Alger. PP : 1- 59.
7. **AMROUCHE T., (2005).** Contribution à l’étude du pouvoir immunomodulateur des bifidobactéries : analyse *in vitro* et étude *in vivo* des mécanismes moléculaires impliqués. *Thèse de Doctorat*. Université. Laval Québec : 155 p.
8. **AYMERICH M.T., GARRIGA M., MONFORT J. M., NES I. et HUGAS M., (2000).** Bacteriocin producing Lactobacilli in spanish-style fermented sausages, characterization of bacteriocins. *Food Microbiology*, 17: 33-45.
9. **BALLANGUE J., (1993).** Bifidobacteria and probiotic action. Lactic acid bacteria. Ed : Salminen, A and Von wright .
10. **BARREFOOT S. F. et KLAENHAMMER T. R., (1984).** Purification and characterization of *lactobacillus acidophilus* bacteriocin Lacticin B. *Antimicrobiology Agent Chemather*, 26(3).

- 11. BASSIT N., LATRIELLE E., BOAUIEU C.Y., PIEAUEB D. et CORRIEU G., (1994).** Effet combiné de l'oxygène et de la température sur l'acidification et la production de diacétyl et de l'acétoïne par *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis*. *Lait*, 74.
  
- 12. BAUMGART D. C. et DIGNASS A. U., (2002).** Intestinal barrier function. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 5: 685-94.
  
- 13. BELLIARD E., THAULT D. et MATHOT A. G., (1996).** Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques In microbiologie alimentaire. *Tome : 01*. Coordinateurs : BOURGEOIS C. M et LARPENT J. P. Ed : Techniques et Documentations. Lavoisier. Paris.
  
- 14. BERNARD J. et REYNAUD A., (2003).** Les Entérobactéries, systématiques et méthodes de diagnostic. Ed : Techniques et Documentations. Lavoisier ; paris: 349 p.
  
- 15. BERNBOM N., RASK LICHT T., BROGREN C. H., BIRTHE J., JOHANSEN ANETTE., BADIOLA I., VOGENSEN K. et NORRUNG B., (2005).** Effects of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota : Role of Nisin. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (1) : 239-244.
  
- 16. BIAVATI B., VESCOVO M., TORRIANI S. et BOTTAZI V., (2000).** Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annal of Microbiology*, 39: 43-48.
  
- 17. BJORKSTEN B., (2004).** Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer Seminras in Immunopathology*, 25: 257-270.
  
- 18. BLUM S., DELNESTE Y., ALVAREZ S., HALLER D., PEREZ P. F., BODE C.H. HAMMES W. P., PFEIR A.M. A. et SCHIFFRIN E. J., (1999).** Interactions between commensal bacteria and mucosal immunocompetent cells. *International Dairy Journal*, 9: 63-68.
  
- 19. BOGOVIC-MATIJSIC B. et ROGELJ I., (1998).** Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF 221, production studies in MRS-media at different pH- values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Process in Biochemistry*, 33 : 345 – 352.
  
- 20. BOUHNİK B.Y., (1993).** Survie et effets chez l'homme des bactéries ingérées dans les laits fermentés. *Lait*, 73.
  
- 21. BOURGEOIS C. M., MESCLE J. F. et ZOUCCA., (1996).** Microbiologie alimentaire : aspects microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed : Techniques et Documentations, Lavoisier Paris.

- 22. BOURLIOUX P., (2007).** Composition et rôles de la flore intestinale. *Institut Danone pour la nutrition et la santé* n°41.
- 23. BRADLEY D. E., (1967).** Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological reviews*, 31(4): 230-314.
- 24. BROADBENT J. R., BARNES M., BRENNAND C., STRICKLAND M., HOUCK K., JOHNSON M. E. et STEELE J. L., (2002).** Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat Cheddar cheese. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 1778-1785.
- 25. CATHY, J. et SALOFF-COSTE, C. J., (2005).** Microflore gastrointestinale et laits fermentés. DANONE newsletter N° 14. [http : // www. Danone vitapol.com/ nutria views/newsletter/fr/news 14 intro. html](http://www.Danonevitapol.com/nutria_views/newsletter/fr/news_14_intro.html).
- 26. CHAMPAGNE C. P., (1998).** Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière. Ed : Maloine, Paris.
- 27. CHARTERIS W. P., KELLY P. M., MORTELL I. I. et COLLIN J. K., (2000).** Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolated. *Journal of Food Protection*, 63(10).
- 28. CHERBUT C. H., (2001).** Yaourt et laits fermentés. *Lettre N° 04, INRA*
- 29. CHUNG H. T., MONTEVILLE J. J. et CHIKINDAS M. L., (2000).** Nisin depletes ATP and proton motive force in mycobacteria. *Letter of Applied Microbiology*, 31(6).
- 30. CLEVELAND J., MONTVILLE T. J., NES I. F. et CHIKINDAS M.L., (2001).** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1-20.
- 31. COAIGN-BOUSQUET M., EVEN S., LINDLEY N. D. et LOUBIÈRE L., (2002).** Anaerobic sugar catabolism in *Lactococcus lactis*: genetic regulation and enzyme control over pathway flux. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 24-32.
- 32. COCONNIER M. E., BERNET M. F., KERNEIS S., CHAUVIERE G., FOURNIAT J. et SERVIN A. L., (1993).** Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion, *FEMS. Microbiology Letter*, 110: 299-306.

- 33. COGAN T. M., (1980).** Les levains lactiques mésophiles. *Lait*, 60(598): 397-425.
- 34. COLLINS Y. F., MC SWEENEY P. L. H. et WILKINSON M. G., (2003).** Evidence of a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 70: 105-113.
- 35. CONWAY C., (1995).** Microbioal ecology of the human large intestine. In Gibson, G.R. and Macfarlane, G.T. (eds.), *Human colonic bacteria : role in nutrition, physiology and pathology*. *CRC Press* , 1 - 24.
- 36. CORTIER G., (2007).** Flore intestinale et santé : quels enjeux ? *Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas Cedex*, 1-13.
- 37. CORTIER G. et DROUAULT SOPHIE., (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *INRA, EDP Science, 2001. Veterinaire Research*, 32: 101-117.
- 38. DACOSTA Y., (2001).** Probiotiques et prébiotiques en alimentation humaine. Ed : Techniques et Documentations. Lavoisier. Paris.
- 39. DAOUDI L., (2000).** Purification, développement d'anticorps monoclonaux spécifiques et détection immunoenzymatique de la nisine Z, une bactériocine par *Lactococcus lactis ssp lactis biovar Diacetylactis UL 719*. *Thèse de Doctorat*. Université. Laval Québec, 61p.
- 40. DAVEY G. P. et RICHARDSON B. C., (1981).** Purification and some properties of diplococci from *Streptococcus cremoris* 346. *Applied and Environmental Microbiology*, 141, 84-89.
- 41. DELLAGLIO F., (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Ed : LORICA Lavoisier, Paris.
- 42. DEROISSART H. B., (1986).** Les bactéries lactiques : lait et produits laitiers vaches, brebis, chèvres .vol : III. Ed : APRIA.
- 43. DEROISSART H. B et LUQUET M., (1994).** Bactéries lactiques ; vol : I. Ed : LORICA, 605 p.
- 44. DESMAZEAUD M., (1996).** Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine: utilisation et innocuité. *Cahier Agriculture*, 5: 331-343.

- 45. DE VOS W. M., HUGENHOLTZ J., (2004).** Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria. *Trends Biotechnology*, 22: 72-79.
- 46. DEVOYOD J. J. et POUILLAIN F., (1988).** Les Leuconostocs propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Lait*, 68(3): 249-280.
- 47. DEVIS C., FREY L., HUBERT J. C. et DEROISSART H., (1994).** Métabolismes d'autres substrats carbonés par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques. Ed : Loriga. Vol I : 169-207.
- 48. DE VUYST L. et VANDAMME E. J., (1993).** Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis subsp lactis* batch fermentation using a complex medium . *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 40 : 17-22.
- 49. DILMI - BOURAS A., (1991).** Assimilation du cholestérol par les bactéries lactiques .*Thèse de Magistère*, INA .El -Harrach, Alger : 149 p.
- 50. DILMI BOURAS A., (2002)** .Survie de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* et leur action sur la métabolisme du cholestérol. *Thèse de doctorat d'état*, INA, El Harrach, Alger.
- 51. DILMI- BOURAS A. et SADOUN D., (2002b).** Survie des ferments du yaourt dans le tube digestif du lapin. *Lait*, 82(2).
- 52. DILMI BOURAS A., (2006).** Assimilation in vitro of cholesterol by yogurt bacteria. *Annals of agricultural and Environmental Medicine AAEM*, 13: 49-53.
- 53. DILMI BOURAS A., KOÏCHE M. et TABTI M. (2007).** The effect of *Lactobacillus paracasei* on the rabbit's cholesterolemia. *African Journal of Biotechnology*, 6(24) : 2840-2845.
- 54. DOLEYRES Y., (2003).** La production en continu des ferments lactiques Probiotiques par la culture des cellules immobilisées .*Thèse de doctorat* .Université .Laval Québec.
- 55. DORE D., (1994).** Biochimie clinique. Ed : Maloinés, pp : 150-180.
- 56. DRIDER D., BEKAL S. et PRÉVOST H., (2004).** Genetic organization and expression of citrate permease in lactic acid bacteria. *Genetic Molecular Research*, 3: 273-281.

- 57. DUPONT I., ROY D. et LAPOINTE G., (2000).** Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 24: 251-255.
- 58. DUPUY C. P., (2004),** Accidents alimentaires d'origine bactérienne liés à la consommation de laits et produits laitiers. *Thèse de doctorat vétérinaire*, Université Claude Bernard, Lyon.47.
- 59. DUWAT P., SOURICE S., CESSÉLIN B., LAMBERET G., VIDO K., GAUDU P., LE LOIR Y., VIOLET F., LOUBIERE P. et GRUSS A., (2001).** Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *Journal of Bacteriology*, 183(15): 4509-4516.
- 60. EL-HAMZAOUI A., CHANI M., DIKOUMBA A., AZOUADELLE E., MBOUMBA I. C., HAZOUME N., MOUSSOUNDA j., BAAJ A. J. et NEJMI S.(2000).** Analyses bactériologiques des selles. *biologie infectiologie*, 4 (2) : 21-33.
- 61. EUZÉBY J. P., (2002).** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Ed : Dunod. Paris.
- 62. EVEN S., LINDLEY U. D., LOUBIERE P., COCAIGN-BOUSQUET., (2002).** Dynamic response of catabolic pathway of autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation of metabolic and energetic constraints. *Mol. Microbiol.* 45: 1143 – 1152.
- 63. FERNANDEZ MURGA M. L., CABRERA G. M., FONT DE VALDEZ G., DISALVO V. et SELDES A. M., (2000).** Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 342-348.
- 64. FRANS C. M. A. P., TOIT M., OLASUPO N. A., SCHLINGER U. et HOLZAPFEL W. H., (1998).** Plantaricin D a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BEF-905 ready to eat salad. *Letter of Applied Microbiology*, 26(3): 231-235.
- 65. FUJITA Y., OKAMOTO T. et IRIE R., (1984).** Plasmid distribution in lactic streptococci. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48: 2103-2105.
- 66. GAGNON M., KHEADR E. E., LE BLAYA G. et FLISSA I., (2004) .** *In vitro* inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *International Journal of Food Microbiology*, 92: 69-78.

- 67. GARCIA-QUINTANS N., MAGNI C., DE MENDOZA D. et LOPEZ P., (1998).** The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis is induced by acid stress. *Applied Environmental Microbiology*, 64: 850-857.
- 68. GARNAU S., MARTIS N. et VEDERAS J. C., (2002).** Two peptides bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84: 577-592.
- 69. GARRIGUES C., MERCADE MYRIAM, LOUBIERE PASCAL, LINDLEY D. et COCAIGN-BOUSQUET M., (1998).** Comportement métabolique de *Lactococcus lactis* en réponse à l'environnement. *Lait*, 78 : 145-155.
- 70. GIBSON G. R. et ROBERFROID M. B., (1995).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125: 1401-1412.
- 71. GILL H. S., (1998).** Stimulation of the immune system by lactic cultures. *International Dairy Journal*, 8: 535-44.
- 72. GOMES A. M., MALCATA Y. F. et CLAVER F. A. (1998).** Growth enhancement of bifidobacterium . *Journal of Dairy Science*. 81:1817-2825.
- 73. GOSSELINK M. P, SCHOUTEN W. R., VAN LIESHOUT L. M., HOP W. C., LAMAN J. D. et RUSELERVAN EMBDEN J. G., (2004).** Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Disease of Colon and Rectum*, 47: 876-884.
- 74. GOURNIER-CHATEAU N., LARPENT J. P., CASTILLANOS M. I. et LARPENT J. L., (1994).** Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Ed : Techniques et documentations. Lavoisier, Paris, France. pp. 1-192.
- 75. GRATTEPANCHE F., (2005).** Étude d'un système de préfermentation en continu du lait par une culture mixte immobilisée fonctionnelle. *Thèse de Doctorat*. Université Laval. Quebec : 134p.
- 76. GREWAL J. S., TIWARI R. P. et SINGH G., (1998).** Effect of nutrition on antimicrobial activity of selected preservatives. *Journal of Food Science Technology*. 35(6): 486-492.
- 77. GUIRAUD J. P., (1998).** Microbiologie alimentaire. Ed : Dunod, Paris : 13 – 520.
- 78. GUIRAUD J. P., (2003).** Microbiologie alimentaire. Ed: Dunod. Paris.

- 79. GUITARNI H., (2007).** Effet des bactéries lactiques sur les bactéries impliquées dans la physiopathologie digestive, *in vitro*. *Mémoire de magister*. Université de Chlef.
- 80. HAINES W. C. et HARMON L. G., (1973).** Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Journal of Applied Microbiology*, 25: 436-441.
- 81. HARKE A., BOUCHE C., GIARD C., BENACHOUR A., BOUTIBOONES P. et AUFFRAY Y., (1996).** The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis cremoris subsp lactis*. *Current Microbiology*, 33: 194-199.
- 82. HOLZAPFEL W. H., HABERER P., SNEL J. et SCHILLINGER U., (1998).** Overview of gut flora and Probiotiques. *International Journal of Food Microbiology* 41(2).
- 83. HOPKINS M. J., SHARP R. et MACFARLANE G. T., (2002).** Variation in human intestinal microbiota with age. *Digestive and Liver Diseases*, 34: 12-18.
- 84. HUGENHOLTZ J. et STARRENBURG M. J. C., (1992).** diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis subsp. lactis var. diacetylaetis* and *Leuconostoc ssp.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38:17-22.
- 85. HUGENHOLTZ J., (1993).** Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology* ,12:165-178.
- 86. ISOLAURI E., KIRJAVAINEN P. V. et SALMINEN S., (2002).** Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut*, 50: 54-59.
- 87. ISOLAURI E., SALMINEN S. et OUWEHAND A. C., (2004).** Probiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 18: 299-313.
- 88. JACK R. W., TAGG R. J. et RAY B., (1995).** Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiology Revue*, 59 (2): 171-200.
- 89. JANSEN G. J., WILDEBOER-VELOO A. C., TONK R. H., FRANKS A. H. et WELLING, G. W., (1999).** Development and validation of an automated, microscopy-based method for enumeration of groups of intestinal bacteria. *Journal of Microbiology Methods*. 37, 215-221.
- 90. JEHANO, D. et LEGUERN J., (1996).** Les légumes fermentés. In : microbiologie alimentaire tome : 01. Coordinateurs : BOURGEOIS CM et LARPENT JP .Ed : Techniques et Documentation. Lavoisier Paris.

- 91. JIMENEZ-DIAZ R., RIOS-SANCHEZ R. M., DESMAZEAUD M., RUIZ-BARBA J. L. et PIARD J. C ., (1993).** Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5): 1416-1424.
- 92. JONES D., (1978).** Composition and differentiation of the genus *Streptococcus*. In : *Streptococci*. Ed. Academic Press, London, 1-49.
- 93. KAILASAPATHY K., (2002).** Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3: 39-48.
- 94. KALTA T., MORETRO T., AESSEN I. M., HOLCH A., AXELSSON L. et NATERSTARD K., (2001).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of satanic P and /or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiology*, 18(4): 431-439.
- 95. KIM W. S. et DUNN N. W., (1999).** Differentiation of *Lactococcus lactis subsp lactis* and *subsp cremoris* strains by their adaptative reponse to stress. *FEMS Microbiology Letter*, 171: 57-65.
- 96. KLAENHAMMER T. R., (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Biological Revue*, 12.
- 97. KLIJN N., ANTON H. et WILLEM M., (1996).** Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7): 2771 - 2774.
- 98. KOJIC M., SVIRCEVIC J., BANINA A. L. et TOPISIROVIC L., (1991).** Bacteriocin producing strain of *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* S50. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1835-1837.
- 99. KOLIDA S., TUOHY K. et GIBSON G. R., (2000).** The flora of the human gut in nutrition and approaches for her dietary modulation protective. *Journal of Food*. <http://www.blackwell-synergy.com>.
- 100. KOSTINEK M., SPECHT I., EDWARD V. A., PINTO C., EGOUNLETY M., SOSSA C., MBUGUA S., DORTU C., THONART P., TALJAARD L., MENGU M., FRANZ C. M. A. P. et HOLZAPFEL W. H., (2007).** Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 342-351.

- 101. KUNJI E. R. S., FANG G., JERONIMUS-STRATINGH C. M., BRUINS A. P., POOLMAN B. et KONINGS W. N., (1998).** Reconstruction of the proteolytic pathway for use of  $\kappa$ -casein by *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology* 27: 1107-1118.
- 102. LABIOUI H., LAROUSSE E., EL YACHIOUI M. et OUHSSINE M., (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin Soc Pharm. Bourdeaux*, 144 : 237-250.
- 103. LACHANCE M., (2000).** Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lactococcus lactis ssp. lactis* MJC15. *Thèse de doctorat*. Université. Laval Québec.
- 104. LANCEFIELD R. C., (1993).** A serological differentiation of human and other groups hemolytic streptococci. *Journal of Experimental Medicine*, 57: 571-575.
- 105. LANGELLA P., SEBASTIEN N., COMMISSAIRE J., BOLOTINE A., GRUSS A. et LE LOIR Y., (2001).** Caractérisation des facteurs d'hôtes affectant la sécrétion des protéines hétérologues chez *Lactococcus lactis*, *Lait*, 81 : 19-28.
- 106. LARPENT J. P. et LARPENT G. M., (1990).** Mémento techniques de microbiologie. 2<sup>ème</sup> édition : Technique et Documentation. Lavoisier. Paris.
- 107. LARPENT J. P., (2000).** Introduction à la nouvelle classification. Ed : Techniques et Documentation. Lavoisier Paris.
- 108. LEE N. K. et PAIK H. D., (2001).** Partial characterization of lactacin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK 24 molted from jeat, gal. *Food Microbiology*, 18(1): 17-24.
- 109. LEE K. et MOON S. H., (2003).** Growth kinetics of *Lactococcus lactis ssp. Diacetylactis* harboring different plasmid content. *Current Microbiology*, 47: 17-21.
- 110. LELOIR Y., NOUAILLE S., RIBEIRO L., COMMISSAIRE J., CORTIER G., GLBERT S., CHATEL J. M., L'HARIDON R., GRUSS A. et LANGELLA P., (2001).** Sécrétion des protéines d'intérêt thérapeutique chez *Lactococcus lactis*. *Lait*: 81.217-226.
- 111. LEVEAU J. P., BOUIX M., (1993).** Microbiologie industrielle .Ed : Techniques et Documentations. Lavoisier Paris.
- 112. LIN H. C., SU B. H., CHEN A. C., LIN T. W., TSAI C. H., YEH T. F. et OH W., (2005).** Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birthweight infants. *Pediatrics*, 115: 1-4.

113. LUQUET F. M. et CORRIEU G., (2005). Bactéries lactiques et probiotiques. Ed : Techniques et Documentations. Lavoisier Paris
114. MACFARLANE G.T., HAY S., MACFARLANE S. et GIBSON G. R., (1990). Effect of different carbohydrates on growth, polysaccharidase and glycosidase production by *Bacteroides ovatus*, in batch and continuous culture. *Journal of Applied Bacteriology*, 68: 179- 187.
115. MACFARLANE G. T. et MACFARLANE S., (1997) Human colonic microbiota: ecology physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *American Journal of Gastroenterology*, 222: S3-S9.
116. MAGNI C., DE MANDOZA D., KONINGS W. N. et LOLKMAN J. S., (1999). Mecanism of citrate metabolism in *Lactococcus cremoris*: resistance against lactate toxicity at low pH. *Journal of Bacteriology*, 181: 1451 – 1457.
117. MAJAMAA H. et ISOLAURI E., (1997) .Probiotics : a navel management of food allergy *Journal of Allergy clinical Immunology*,99.
118. MARTEAU P. H., POCHART P. H., BOUHNİK Y. et RAMBAULT J. C., (1994). Ecologie microbienne, survie et effets de lactobacillus acidophilus et bifidobacéries de produits laitiers fermentés dans le tube digestif de l’homme. CATH. Nutr, Diet XXIX, 1994.
119. MARTEAU P. et SHANAHAN F., (2003). Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side effects. *Best Practices and Research Clinical Gastroenterology*, 17: 725-740.
120. MATSUMOTO M. et BENNO Y., (2004). Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutation Research*, 568: 147-153.
121. MELCHIORSEN C. R., JOKUMSEN K. V., VILLADSEN J., ISRAELSEN H. et ARNAU J., (2002). The level of pyruvate-formate lyase controls the shift from homolactic to mixed-acid product formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 338-344.
122. MERCENIER A., PAVAN S. et POT B., (2002). Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 99-110.
123. METCHNIKOFF E., (1907). The prolongation of life. In *Optimistic Studies* (Heinemann W., Ed.), pp. 1-100. G. P. Putnam and Sons, London, UK.

- 124. MITSUOKA T., (1989).** Microbes in the intestine. Ed. Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan.
- 125. MITSOUKA T., (1996).** Intestinal flora and human health Asia Pacific. *International Journal of Dairy*, 10.
- 126. MIYAMOTO Y. et TTOH K., (2000).** Bacteroides acidifaciens ssp. isolated from the caecum of mice. *International Journal of Systematic Microbiology*, 50: 145-148.
- 127. MOSERSCOTT A. et SAVAGE DWAYNE C., (2001).** Bile salt hydrolase. Activity and resistance of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Applied and Environmental microbiology* .
- 128. MOREAU M. C., (2001).** Les probiotiques : des microorganismes bénéfiques pour notre système immunitaire? *CHOLE -DOC* , 63(1) : 8p.
- 129. MURRAY P. R., (1999).** Manuel of Clinical Microbiology. *American society for Microbiology*, Ed: Washington DC : 7.
- 130. NEHAL F., (2006).** Isolement et caractérisation de souches de *Lactococcus lactis* à partir de différents laits dans le périmètre du moyen Cheliff. *Mémoire de magister*. Université de Chlef : 99p.
- 131. NES I. F., DIEP D. B., HAVARSTEIN L. S., BRURBERG M. B., EIJSINK V. et HOLO H., (1996).** Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 2-4.
- 132. NOVEL G., (1993).** Les bactéries lactiques in « Microbiologie industrielle » les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. LEVEAU, G. V., BOUIX, M. Techniques et Documentation Lavoisier. Paris. PP. 171-215.
- 133. ONDA T., YANAGIDA F., TSUJI M., SHINOHARA T. et YOKOTSUKA K. (2003).** Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. *International Journal of Food and Microbiology*.87 (1-2): 153-159.
- 134. ORLA-JENSEN S., (1924).** La classification des bactéries lactiques. *Lait* : 4, 468-474.
- 135. OUWEHAND A. C., ISOLAURI E., KIRAJAVAINEN P. V. et SALMINEN S. J., (1999).** Adhesion of four Bifidobacterium strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *Journal of Dairy Science*, 172: 61-64.

- 136. OUWEHAND A. C. et VESTERLUND S., (2003).** Health aspects of probiotics. *Drugs*, 6: 573-580
- 137. PATHMAKANTHAN S., MEANCE S. et EDWARDS C., (2000).** Probiotics: review of human studies to date and methodological approaches. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2: 10- 30.
- 138. PERLEMUTER L., QUEVANVILLIERO G., PERLEMUTER G., AMER B. et AUBERT L. C., (1998).** Anatomie et physiologie pour les souris infirmiers. Ed : MASSON, Paris.
- 139. PHILIPPON A. et DUBREUIL L., (2007).** Cours de bactériologie médicale, Ed : faculté de médecine, Paris. V.
- 140. PIARD J. C. et DESMASEAUD M., (1992).** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria .2- bacteriocins and other antibavterial substances. *Lait* ,72: 113-142.
- 141. PLUMMER S., WEAVER M. A., HARRIS J. C., DEE P. et HUNTER J., (2004).** *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. *International Microbiology*, 7: 59-62.
- 142. PRITCHARD G. G. et COOLBEAR T., (1993).** The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbioliogy Letter* 12: 179-206.
- 143. PROBERT H. M. et GIBSON G. R., (2002).** Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Current Issues Intestinal Microbiology*, 3: 23-27.
- 144. RADA V. et PETER J., (2002).** Enumeration of Bifidobacteria in animal intestinal samples Vet .Med .Czech, 1: 1-4.
- 145. RALLU F., (1999).** Etude de la résistance au stress acide de *Lactobacillus lactis*. *Thèse de doctorat*, Université Paris VI, France.
- 146. RALLU F., GRUSS A., ERLISH S. D. et MAGNI E., (2000).** Acid and multi-stress res7stant mutants of *Lactococcus cremoris*: identification of intracellulaire stress signal . *Mol. Microbiol.* 35: 517 – 528.
- 147. RAMOS P., NOVEL M., LEMOSQUET M. et NOVEL G., (1983).** Fragmentation du plasmide lactose-protéase chez des dérivés lactose-négatifs de *Streptococcus lactis* et de *S. lactis ssp. diacetylactis*. *Analyse Microbiologique. (Ins.Pasteur)*, 143 B : 387-399.

- 148. RAO A.V., (2002).** New concepts in nutrition and health. *Probiotics and Prebiotics* , 19 (1) :1-6.
- 149. RASTALL R. A., (2004).** Bacteria in the gut: Friends and foes and how to alter the balance. *Journal of Nutrition*, 134: 2022-2026.
- 150. RAY B., (1992).** Pediocin of pediococcus acidilactici as food biopreservatives in food preservatives of microbial origin. Ed: RAY B. and Daeschel M.A .BOCA Raton , CRC press 265-322.
- 151. RICHARD J., (1996).** Utilisation des bactériocines pour la production des aliments plus sûrs : mythe ou réalité ? *Lait*, 76 : 269-274.
- 152. RIGOTTIER-GOIS L., LE BOURHIS A. G., GRAMET G., ROCHET V. et DORE J. (2003).** Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 237-245.
- 153. ROMEO Y., BOUVIE R. J. et GUTEIRREZ C., (2001).** La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum*, *Lait*, 81 : 49-55.
- 154. ROSENFELDT V., BENFELDT E., VALERIUS N. H., PAERREGAARD A. et MICHAELSEN K. F., (2004).** Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *Journal of Pediatrics*, 145: 612-616.
- 155. RULLIER B., (1995).** L'hygiène alimentaire. Ed: Nathan. Paris, 160 p.
- 156. SAARELA M., MAGENSEN G., FONDEN R., MATTO J. et LASANDHOLM T. M., (2000).** Probiotic bacteria: safety: functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84: 197-215.
- 157. SAARELA M., LAHTENMAKI L., CRITTENDEN, R., SALMINEN S. et SANDOLM M. J., (2002).** Gut bacteria and health foods-the european perspective. *Journal of International Food Microbiology* , 78 : 99-117.
- 158. SAINT LAURENT A., (2002).** Les principes fondamentaux de gastro-entérologie : flore normale de l'intestin grêle : 208-295.

- 159. SANDERS M. E. et HUIS INT'VELD J., (1999).** Bringing a probiotic- containing functional food to the market: microbiological product, regulatory and labelling issues. *Antonie Leeuwenhoek*, 76: 293-315.
- 160. SANDINE W. E., (1985).** The streptococci : milk products. In : Bacterial Starter Cultures for Foods. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2-23.
- 161. SANDINE W. E., (1988).** New nomenclature of the rod-shaped lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 519-522.
- 162. SARDOVI V., (1986).** Bifidobacterium .Bergy's manual of determinative Bacteriology. 9<sup>ème</sup> edition: 377-387.
- 163. SAXELIN M., PESSI T. et SALMINEN S., (1995).** Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *International Journal of Food Microbiology*, 25: 199-203.
- 164. SCHIFFRIN E. J. et BLUM S., (2002).** Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56: 60-64.
- 165. SCHLEIFER K. H., KRAUS J., DVORAK C., KILPPER-BÄLZ R., COLLINS M. D. et FISCHER W., (1985).** Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. *Applied microbiology*, 6: 183-195.
- 166. SCHULTSZ C., VAN DEN BERG F. M., TEN KATE F. W., TYTGAT G. N. et DANKERT J., (1999).** The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* 117: 1089-1097.
- 167. SCHVED F., LAIZAR A., LINDNER P. et JUVEN B. J., (1994).** Interaction of the bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactis* SJI with the cell envelope of *Lactobacillus* ssp . *Applied Microbiology*, 19: 281-283.
- 168. SEKSIK P., RIGOTTIER-GOIS L., GRAMET G., SUTREN M., POCHART P., MARTEAU P., JIAN R. et DORE J., (2003).** Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, 52: 237-242.
- 169. SGHIR A., GRAMET G., SUAUA A., ROCHET V., POCHART P. et DORE J. (2000).** Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 : 2263-2266.

- 170. SHAH H. N. et COLLINS M. D., (1989).** Proposal to restrict the genus *Bacteroides* to *Bacteroides fragilis* and closely related species. *International Journal of Systematic Microbiology*, 39: 85-87.
- 171. SHERMAN J. M., (1937).** The streptococci. *Bacteriological Review* 1: 3-97.
- 172. SONG H. J. et RICHARD J. (1997).** Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *International Journal of Food Microbiology*, 36(2), 155-161.
- 173. STANTON C., GARDINER G., MEEHAN H., COLLINS K., FITZGERALD G., LYNCH P. B., & ROSS R. P., (2001).** Market potential for probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 476- 483.
- 174. SUTRA L., FEDERIGHI M. et JOUVE J. L., (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. Ed : POLYTECHNICA, Paris, 308(6) : 31-249.
- 175. TADESSE G., EPHRAIM E. et ASHENAFI M., (2004).** Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from border of Shamita, traditional Ethiopian fermented beverage, on some food borne pathogens and effect of growth medium in the inhibitory activity. *Food Safety*, 5: 13-20.
- 176. TAGG J. R., DAJONI A. S. et WANNAMBER L. W., (1976).** Bacteriocin of gram positive bacteria. *Bacteriological review*, 40: 722-756.
- 177. TAGLANG S., (2005).** Cours de physiologie de l'appareil digestif. [http : // frank paillard.chez.tixali.fr/infirmier digestif.htm](http://frankpaillard.chez.tixali.fr/infirmier_digestif.htm).
- 178. TAMINE A. Y., (1981).** Microbiology of « Starter Cultures ». In : Dairy Microbiology. Vol. 2. Ed. Applied Science Publ., London et New Jersey.
- 179. TAMINE A.Y., MADSHALL V. M. E. et ROBINSON R. K., (1995).** Microbiological and technological aspects of milk fermented by bifidobacteria. *Journal of dairy Research*. 65:151-187.
- 180. TEN BRINK B., MINEKUS M., VAN DER VOSSSEN J. M., LEER R. J. et HUIS IN'T VELD J. H., (1994).** Antimicrobial activity of Lactobacilli, preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M 46. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(2): 140-148.

- 181. THUAULT D., BELIARD E., LE GUERN J. et BOURGEOIS C. M. (1991).** Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by Bacteriocin-Like Substances Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 74(4): 1145-1150.
- 182. THUHAULT D. et QUIMPER A., (1997).** Interactions microbiennes : si leur maîtrise n'était conté. *Food Technology*, 17: 18-19.
- 183. TUNGJAROENCHAI W, WHITE C. H, HOLMES W. E. et DRAKE M. A., (2004).** Influence of adjunct cultures on volatile free fatty acids in reduced-fat Edam cheese. *Journal of Dairy Science*, 87: 3225-3234.
- 184. TURCHET P., LAURENZANO M., AUBOIRON S. et ANTOINE J. M., ( 2003).** Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *Journal of Nutrition and Health Aging*, 7: 75-77.
- 185. TURSI A., BRANDIMARTE G., GIORGETTI G. M. et MODEO M. E.,(2004).** Effect of *Lactobacillus casei* supplementation on the effectiveness and tolerability of a new second-line 10-day quadruple therapy after failure of a first attempt to cure *Helicobacter pylori* infection. *Medical Science Monitor*, 10: 662-666.
- 186. VAN BELKUM M. J., KOK J. et VENEMA G., (1992).** The bacteriocin lactococcin A specifically increases the permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *Journal of bacteriology*, 173: 7934-7941.
- 187. VAN DEN BERG D. J. C., ROBIJN G. W., JANSSEN A. C., GUISEPPIN M. L. F., VREEKER R, KAMERLING J. P.,Vliegenthart J. F. G., LEDEBOER A. M. et VERRIPS C. T., (1995).** Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2840-2844.
- 188. VENTURA M., VAN SINDEREN D., FITZGERALD G. F. et ZINK R., (2004).** Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86: 205-223.
- 189. VIGNOLA C. L., MICHEL J. C., PAQUIN P., MOINNEAU M., POULIOT M. et SIMPSON R., (2002).**, Sciences et technologie du lait : Transformation du lait. Ed : Techniques et Documentation Lavoisier. 600 p.

- 190. VINOD KUMAR J., SOMESH S. et NEERJA S., (2006).** Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables. *Food technology and Biotechnology*, 44(3): 435- 439.
- 191. WANG M. F., LIN H. C., WANG Y. Y. et HSU C. H., (2004).**, Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatric Allergy and Immunology*, 15: 152-158.
- 192. WELLS J.M., WILSON P. W., NORTON P. M., GASSON M. J. ET LEPAGE R. W.F., (1993).** *Lactococcus lactis*, high level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *MOL.microbiology*, 8: 1135 – 1162.
- 193. ZOETENDAL E. G., COLLIER C. T., KOIKE S., MACKIE R. I. et ASKINS H. R., (2004).** Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *Journal of Nutrition*, 134: 465-472.

**ANNEXE 1 : Composition des milieux de culture****Tableau 1 : Composition du milieu M 17 (Terzaghi et Sandine, 1975 ).**

Peptone tryptique de caséine.....	2,5 g
Peptone pepsique de viande.....	2,5 g
Peptone papainique de soja.....	5 g
Extrait de levure déshydraté.....	2,5 g
Extrait de viande.....	5 g
Glycérophosphate de sodium.....	19 g
Sulfate de magnésium, 7 H <sub>2</sub> O.....	0,25 g
Acide ascorbique .....	0,5 g
Lactose .....	5 g
Agar .....	15 g
Eau distillée .....	950 ml.

**Tableau 2 : Composition de la Gélose semi- solide VF : Milieu viande – Foie gélosé à 6 % (pour mille)**

Extrait de viande – Foie .....	30 g
Glucose .....	2 g
Gélose .....	6 g

Répartir en tubes minces sur 12 cm de hauteur ou en tubes à essai ordinaires. Autoclaver à 120 °C pendant 20 minutes.

**Tableau 3: Composition du Lait de Sherman :**

- 9 ml de lait écrémé stérile en tubes.
- 1 ml de bleu de méthylène à 1 % stérilisé 20 minutes à 120 °C.

**Tableau 4: Composition du Lait tournesolé :**

- Lait écrémé .....	1000 ml
- Teinture de tournesol à 4 % .....	10 ml.

**Tableau 5: Composition du Milieu Gibson et Abd El Malek :**

Extrait de levure .....	2,5 g
Glucose .....	50 g
Jus de tomate à pH 6,5 .....	100 ml
Lait .....	800 ml
Gélose nutritive ordinaire .....	200 ml

pH 6,5 ; répartir en tubes à essai (8 à 10 ml). Stériliser par tyndallisation, 3 fois 30 minutes à 100 °C, à 24 heures d'intervalle.

**Tableau 6: Composition du Milieu MRS (MAN ROGOSA et SHARP)**

Glucose.....	20 g
Peptone .....	10 g
Extrait de viande de boeuf.....	8 g
Acétate de sodium, 3 H <sub>2</sub> O .....	5 g
Extrait de levure .....	4 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,2 g
Citrate d'ammonium .....	2 g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O .....	0,2 g
MnSO <sub>4</sub> .4 H <sub>2</sub> O .....	0,05 g
Tween 80.....	1 ml
Eau distillée .....	950 ml.

pH ajusté à 6,8 à 7, autoclaver à 120°C/15 mn.

➤ **Milieu MRS cystéiné:**

Milieu MRS + cystéine à raison de 0,1 %

pH ajuster à 6,4 additionné de 15 µg / ml d'acide nalidixique

**Tableau 7: Composition de la Gélose nutritive**

Peptone .....	5 g
Glucose .....	5 g
Extrait de levure .....	3 g
Agar agar .....	15 g
Eau distillée .....	1000 ml

**Tableau 8: Composition du milieu Mueller – Hinton agar**

Extrait de viande .....	2 g
Hydrolysate acide de caséine .....	17,5 g
Amidon .....	1,5 g
Gélose .....	10 g

pH ajuster 4,7, autoclaver à 115°C/15 mn.

**Tableau 9: Composition du Milieu Slanetz et Bartley**

Tryptose .....	20 g
Extrait de levure .....	5 g
Glucose .....	2 g
Phosphate disodique .....	4 g
Azide de sodium .....	0,4 g
Chlorure de tétrazolium .....	0,1 g
Gélose .....	10 g

pH ajuster à 7,2 , porter à ébullition et ne pas autoclaver.

**Tableau 10: Composition du Milieu Hecktoen**

Protéase de peptone .....	12
Extrait de levure .....	3
Chlorure de sodium .....	5
Thiosulfate de sodium .....	5
Sels biliaires .....	9
Citrate de fer ammoniacal .....	1,5
Salicine .....	2
Lactose .....	12
Saccharose .....	12
Fuchine acide .....	0,1
Bleu de bromotymol .....	0,065
Agar .....	13 g

**Tableau 11: Composition du Bouillon nutritif**

Macération de viande .....	1 litre
Peptone trypsique .....	15
NaCl ou KCl .....	5

**Tableau 12: Composition de la Gélose EMB (éosine méthyle bilié)**

peptone .....	10
Lactose .....	10
Phosphate bipotassique .....	2
Eosine .....	0,4
Bleu de méthylène .....	65 mg
Gélose .....	15

pH ajuster 7,1, autoclaver à 120 °C/15 mn.

**Tableau 13: Composition du Bouillon TSB (Tryptone Soja Broth)**

Tryptone .....	17
Peptone de soja .....	3
Glucose	2,5
Chlorure de sodium	5
Phosphate dipotassique	2,5

pH ajuster à 7,3 , autoclaver 120 °C /15 mn.

## ANNEXE 2 :

**Tableau 1 :** Evolution de l'acidité des souches lactiques pures en fonction du temps d'incubation.

temps Souches	0h	2h	6h	18h	24h	48h
<i>Lc .l<sub>1</sub></i>	16	20	37	51	81	83
<i>Lc .l<sub>2</sub></i>	19	22	37	60	77	76
<i>Lc .l<sub>3</sub></i>	16	21	32	58	78	85
<i>Lc .l<sub>4</sub></i>	19	25	45	39	80	88
<i>Lc .l<sub>5</sub></i>	17	19	43	50	76	79
<i>Lc .l<sub>6</sub></i>	16	22	41	50	72	77
<i>Lc .l<sub>7</sub></i>	18	21	38	56	85	78
<i>Lc .l<sub>8</sub></i>	17	24	48	54	55	55
<i>Lc .l<sub>9</sub></i>	19	25	50	67	85	89
<i>Lc .l<sub>10</sub></i>	19	25	38	53	66	71
<i>Lc .l<sub>11</sub></i>	18	22	39	52	74	75
<i>Lc .l<sub>12</sub></i>	18	21	40	50	81	83
<i>Lc .l<sub>13</sub></i>	17	23	44	77	83	88
<i>Lc .c<sub>1</sub></i>	19	24	45	55	58	62
<i>Lc .c<sub>2</sub></i>	17	20	32	53	60	66
<i>Lc .c<sub>3</sub></i>	17	19	41	50	85	99
<i>Lc .d<sub>1</sub></i>	18	23	32	42	43	47
<i>Lc .d<sub>2</sub></i>	19	23	42	45	43	50
<i>Lc .d<sub>3</sub></i>	18	20	25	34	38	40
<i>Lc .d<sub>4</sub></i>	17	21	30	32	35	40

**Tableau 2 :** Evolution de l'acidité des association bactériennes en fonction du temps d'incubation.

temps Souches	0h	2h	6h	18h	24h	48h
<i>lc.l<sub>3</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	16	20	47	51	81	89
<i>lc.l<sub>5</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>4</sub></i>	19	22	47	60	77	86
<i>lc.l<sub>7</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	16	23	42	58	78	85
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	19	25	45	39	80	88
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	17	19	43	50	76	90
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	16	22	41	50	72	77
<i>lc.l<sub>12</sub>lc.c<sub>4</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	18	21	48	56	85	92
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	17	24	47	54	55	92
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	19	25	55	67	85	89
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	19	25	48	53	66	71

**Tableau 3 :** Survie des souches lactiques pure à pH 2,5 sans sels biliaries.

temps Souches	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.l</i> <sub>1</sub>	8,98. 10 <sup>8</sup>	6,00. 10 <sup>4</sup>	2,50. 10 <sup>4</sup>	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>2</sub>	6,88. 10 <sup>8</sup>	3,34. 10 <sup>4</sup>	00	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>3</sub>	2,50. 10 <sup>8</sup>	4,70. 10 <sup>5</sup>	4,08. 10 <sup>4</sup>	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>4</sub>	5,55. 10 <sup>8</sup>	9,00. 10 <sup>4</sup>	00	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>5</sub>	8,70. 10 <sup>8</sup>	00	00	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>6</sub>	5,60. 10 <sup>8</sup>	1,96. 10 <sup>7</sup>	9,66. 10 <sup>6</sup>	2,70. 10 <sup>4</sup>	4,30.10 <sup>3</sup>	4,00. 10 <sup>3</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>7</sub>	5,50. 10 <sup>8</sup>	00	00	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>8</sub>	9,04. 10 <sup>8</sup>	3,00. 10 <sup>4</sup>	00	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>9</sub>	7,89. 10 <sup>8</sup>	1,04. 10 <sup>7</sup>	3,94. 10 <sup>6</sup>	3,80. 10 <sup>5</sup>	8. 10 <sup>2</sup>	26
<i>Lc.l</i> <sub>10</sub>	2,67. 10 <sup>8</sup>	8,20. 10 <sup>5</sup>	7,98. 10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>11</sub>	9,98. 10 <sup>8</sup>	10 <sup>5</sup>	9,80. 10 <sup>4</sup>	5. 10 <sup>4</sup>	2,40. 10 <sup>2</sup>	00
<i>Lc.l</i> <sub>12</sub>	4,80. 10 <sup>8</sup>	00	00	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>13</sub>	4,80. 10 <sup>8</sup>	00	00	00	00	00
<i>Lc.c</i> <sub>1</sub>	6,04. 10 <sup>8</sup>	5,50. 10 <sup>4</sup>	3,65. 10 <sup>4</sup>	5,50. 10 <sup>3</sup>	10	00
<i>Lc.c</i> <sub>2</sub>	9,00. 10 <sup>8</sup>	7,00. 10 <sup>4</sup>	00	00	00	00
<i>Lc.c</i> <sub>3</sub>	5,66. 10 <sup>8</sup>	2,00. 10 <sup>4</sup>	1,2. 10 <sup>3</sup>	7,4. 10 <sup>2</sup>	10,00	3
<i>Lc.d</i> <sub>1</sub>	4,44. 10 <sup>8</sup>	8,00. 10 <sup>2</sup>	00	00	00	00
<i>Lc.d</i> <sub>2</sub>	9,90. 10 <sup>8</sup>	2,30. 10 <sup>5</sup>	3,86. 10 <sup>3</sup>	5. 10 <sup>2</sup>	8,00	00
<i>Lc.d</i> <sub>3</sub>	9,80. 10 <sup>8</sup>	1,56. 10 <sup>6</sup>	9,58. 10 <sup>5</sup>	4,20. 10 <sup>4</sup>	00	00
<i>Lc.d</i> <sub>4</sub>	8,90. 10 <sup>8</sup>	9,20. 10 <sup>5</sup>	1,20. 10 <sup>5</sup>	4. 10 <sup>4</sup>	6,90. 10 <sup>3</sup>	9

**Tableau 4:** Survie des souches lactiques pure à pH 4,3 sans sels biliaries.

temps Souches	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.l</i> <sub>1</sub>	6,20. 10 <sup>8</sup>	6. 10 <sup>9</sup>	1,02. 10 <sup>7</sup>	6,10. 10 <sup>4</sup>	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>2</sub>	2,36. 10 <sup>8</sup>	6,44. 10 <sup>9</sup>	5,04. 10 <sup>6</sup>	1,88. 10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	00
<i>Lc.l</i> <sub>3</sub>	7,76. 10 <sup>8</sup>	3,20. 10 <sup>9</sup>	3,03. 10 <sup>5</sup>	2. 10 <sup>4</sup>	5,5. 10 <sup>3</sup>	2,10. 10 <sup>2</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>4</sub>	2,20. 10 <sup>8</sup>	1,06. 10 <sup>9</sup>	1. 10 <sup>7</sup>	1,14. 10 <sup>6</sup>	2,25. 10 <sup>5</sup>	1,76. 10 <sup>3</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>5</sub>	9,06. 10 <sup>8</sup>	9,80. 10 <sup>9</sup>	6,78. 10 <sup>9</sup>	5,80. 10 <sup>6</sup>	6,50. 10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>6</sub>	5. 10 <sup>8</sup>	2,50. 10 <sup>9</sup>	8,70. 10 <sup>9</sup>	1,66. 10 <sup>7</sup>	1,84. 10 <sup>6</sup>	1,60. 10 <sup>6</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>7</sub>	1,94. 10 <sup>8</sup>	4,32. 10 <sup>9</sup>	7,58. 10 <sup>9</sup>	7,94. 10 <sup>4</sup>	1,33. 10 <sup>4</sup>	9,77. 10 <sup>3</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>8</sub>	8,51. 10 <sup>8</sup>	6,30. 10 <sup>9</sup>	5,12. 10 <sup>9</sup>	2,18. 10 <sup>6</sup>	2,60. 10 <sup>5</sup>	5. 10 <sup>3</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>9</sub>	6,30. 10 <sup>8</sup>	8,31. 10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	9,33. 10 <sup>4</sup>	3,20. 10 <sup>6</sup>	1,30. 10 <sup>4</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>10</sub>	9,95. 10 <sup>8</sup>	4,60. 10 <sup>9</sup>	2,10. 10 <sup>4</sup>	102	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>11</sub>	8,85.10 <sup>8</sup>	1,69.10 <sup>9</sup>	10 <sup>7</sup>	1,4. 10 <sup>6</sup>	7,78. 10 <sup>5</sup>	2,5. 10 <sup>4</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>12</sub>	10 <sup>8</sup>	7,07. 10 <sup>9</sup>	9,12. 10 <sup>9</sup>	89	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>13</sub>	7,20. 10 <sup>8</sup>	2,40. 10 <sup>9</sup>	6,70. 10 <sup>5</sup>	1,31. 10 <sup>4</sup>	1,10. 10 <sup>3</sup>	1,17. 10 <sup>2</sup>
<i>Lc.c</i> <sub>1</sub>	2,75.10 <sup>8</sup>	2,08.10 <sup>9</sup>	2,39. 10 <sup>9</sup>	1,7. 10 <sup>7</sup>	9,99. 10 <sup>6</sup>	3,6. 10 <sup>4</sup>
<i>Lc.c</i> <sub>2</sub>	9,88. 10 <sup>8</sup>	1,13. 10 <sup>9</sup>	1,04. 10 <sup>7</sup>	9,40. 10 <sup>4</sup>	3,30. 10 <sup>3</sup>	9,70. 10 <sup>2</sup>
<i>Lc.c</i> <sub>3</sub>	9,30. 10 <sup>8</sup>	3,84. 10 <sup>9</sup>	8,80. 10 <sup>5</sup>	6,40. 10 <sup>4</sup>	8. 10 <sup>3</sup>	00
<i>Lc.d</i> <sub>1</sub>	4,90. 10 <sup>8</sup>	1,12. 10 <sup>9</sup>	6,16. 10 <sup>9</sup>	40	00	00
<i>Lc.d</i> <sub>2</sub>	7,77. 10 <sup>8</sup>	9,28. 10 <sup>9</sup>	2. 10 <sup>7</sup>	1,27. 10 <sup>6</sup>	2,90. 10 <sup>4</sup>	00
<i>Lc.d</i> <sub>3</sub>	5,02. 10 <sup>8</sup>	3,84. 10 <sup>9</sup>	9,04. 10 <sup>6</sup>	4. 10 <sup>6</sup>	5,80. 10 <sup>4</sup>	00
<i>Lc.d</i> <sub>4</sub>	1,92. 10 <sup>8</sup>	2,20. 10 <sup>9</sup>	1,29. 10 <sup>6</sup>	4,22. 10 <sup>4</sup>	4,58. 10 <sup>3</sup>	00

**Tableau 5 :** Survie des souches lactiques pure à pH 6,5 sans sels biliaries.

temps Souches	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.l</i> <sub>1</sub>	1,2.10 <sup>8</sup>	4,3.10 <sup>9</sup>	7,34.10 <sup>9</sup>	4,16.10 <sup>10</sup>	9,10.10 <sup>10</sup>	5,1.10 <sup>10</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>2</sub>	2,36.10 <sup>8</sup>	2,83.10 <sup>9</sup>	3,62.10 <sup>9</sup>	1,98.10 <sup>10</sup>	5,68.10 <sup>10</sup>	3,03.10 <sup>10</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>3</sub>	1,76.10 <sup>8</sup>	2,95.10 <sup>8</sup>	8,04.10 <sup>8</sup>	1,63.10 <sup>10</sup>	2,5.10 <sup>10</sup>	8,9.10 <sup>9</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>4</sub>	2,20.10 <sup>8</sup>	2,38.10 <sup>10</sup>	3,04.10 <sup>10</sup>	3,55.10 <sup>10</sup>	4,83.10 <sup>10</sup>	2.10 <sup>10</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>5</sub>	9,56.10 <sup>8</sup>	9,78.10 <sup>8</sup>	6,34.10 <sup>9</sup>	1,47.10 <sup>10</sup>	1,44.10 <sup>10</sup>	5,88.10 <sup>9</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>6</sub>	6,02.10 <sup>8</sup>	7.10 <sup>8</sup>	8,12.10 <sup>8</sup>	1,20.10 <sup>10</sup>	8,70.10 <sup>10</sup>	2,18.10 <sup>10</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>7</sub>	1,10.10 <sup>8</sup>	1,70.10 <sup>9</sup>	2,14.10 <sup>9</sup>	1,60.10 <sup>10</sup>	3,20.10 <sup>10</sup>	1,47.10 <sup>10</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>8</sub>	1,34.10 <sup>8</sup>	2,88.10 <sup>9</sup>	7,76.10 <sup>9</sup>	1,52.10 <sup>10</sup>	3,16.10 <sup>10</sup>	4,90.10 <sup>10</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>9</sub>	7,24.10 <sup>8</sup>	2,62.10 <sup>9</sup>	2,70.10 <sup>9</sup>	5,2.10 <sup>9</sup>	7,58.10 <sup>9</sup>	.10 <sup>10</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>10</sub>	3,90.10 <sup>8</sup>	4,01.10 <sup>9</sup>	4,91.10 <sup>9</sup>	6,63.10 <sup>9</sup>	7,78.10 <sup>9</sup>	2,18.10 <sup>9</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>11</sub>	2,03.10 <sup>8</sup>	2,29.10 <sup>9</sup>	2,60.10 <sup>9</sup>	1,36.10 <sup>10</sup>	1,44.10 <sup>10</sup>	1,18.10 <sup>9</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>12</sub>	9,33.10 <sup>8</sup>	9,33.10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	3,00.10 <sup>10</sup>	8,12.10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>13</sub>	8,2.10 <sup>8</sup>	9,94.10 <sup>8</sup>	1,04.10 <sup>9</sup>	1,58.10 <sup>10</sup>	3,4.10 <sup>10</sup>	7,9.10 <sup>9</sup>
<i>Lc.c</i> <sub>1</sub>	2,80.10 <sup>8</sup>	8,56.10 <sup>8</sup>	5,37.10 <sup>9</sup>	1,92.10 <sup>10</sup>	9,30.10 <sup>10</sup>	4,40.10 <sup>10</sup>
<i>Lc.c</i> <sub>2</sub>	1,30.10 <sup>8</sup>	7,97.10 <sup>8</sup>	7,8.10 <sup>9</sup>	1,44.10 <sup>10</sup>	4,5.10 <sup>10</sup>	5,6.10 <sup>9</sup>
<i>Lc.c</i> <sub>3</sub>	1,20.10 <sup>9</sup>	5,40.10 <sup>9</sup>	7,77.10 <sup>9</sup>	2,08.10 <sup>10</sup>	4,41.10 <sup>10</sup>	9,7.10 <sup>9</sup>
<i>Lc.d</i> <sub>1</sub>	2,90.10 <sup>8</sup>	4,02.10 <sup>8</sup>	5,12.10 <sup>8</sup>	8,90.10 <sup>8</sup>	5,88.10 <sup>9</sup>	7,60.10 <sup>9</sup>
<i>Lc.d</i> <sub>2</sub>	7,70.10 <sup>8</sup>	7,77.10 <sup>9</sup>	9,98.10 <sup>9</sup>	1,12.10 <sup>10</sup>	2,10.10 <sup>10</sup>	4,60.10 <sup>9</sup>
<i>Lc.d</i> <sub>3</sub>	5,12.10 <sup>8</sup>	6,02.10 <sup>9</sup>	6,03.10 <sup>9</sup>	9,20.10 <sup>9</sup>	9,80.10 <sup>9</sup>	9,90.10 <sup>8</sup>
<i>Lc.d</i> <sub>4</sub>	1,92.10 <sup>8</sup>	8.10 <sup>8</sup>	8,90.10 <sup>8</sup>	7,60.10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	4,3.10 <sup>9</sup>

**Tableau 6** : Survie des souches lactiques pure à pH 2,5 +0,3 % de sels biliaries.

temps Souches	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.l</i> <sub>1</sub>	9,60.10 <sup>8</sup>	8,30.10 <sup>5</sup>	3,01.10 <sup>5</sup>	30	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>2</sub>	4,50.10 <sup>8</sup>	4,48.10 <sup>7</sup>	2.10 <sup>6</sup>	8,80.10 <sup>4</sup>	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>3</sub>	2,55.10 <sup>8</sup>	5,52.10 <sup>6</sup>	.10 <sup>3</sup>	20	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>4</sub>	9,88.10 <sup>8</sup>	6,80.10 <sup>6</sup>	1,08.10 <sup>3</sup>	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>5</sub>	6,82.10 <sup>8</sup>	2,68.10 <sup>7</sup>	9,33.10 <sup>6</sup>	19	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>6</sub>	4,10.10 <sup>8</sup>	.10 <sup>5</sup>	1,40.10 <sup>3</sup>	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>7</sub>	5,40.10 <sup>8</sup>	2,45.10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>8</sub>	5,90.10 <sup>8</sup>	4.10 <sup>2</sup>	02	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>9</sub>	2,08.10 <sup>8</sup>	9,19.10 <sup>9</sup>	04	00	70	00
<i>Lc.l</i> <sub>10</sub>	9,20.10 <sup>8</sup>	.10 <sup>3</sup>	00	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>11</sub>	8,83.10 <sup>8</sup>	3,52.10 <sup>5</sup>	6,88.10 <sup>4</sup>	2,63.10 <sup>2</sup>	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>12</sub>	9,77.10 <sup>8</sup>	7,08.10 <sup>5</sup>	10	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>13</sub>	4,16.10 <sup>8</sup>	4,02.10 <sup>7</sup>	10	00	00	00
<i>Lc.c</i> <sub>1</sub>	3,60.10 <sup>8</sup>	3,01.10 <sup>7</sup>	2,40.10 <sup>6</sup>	00	00	00
<i>Lc.c</i> <sub>2</sub>	4,80.10 <sup>8</sup>	2,30.10 <sup>4</sup>	00	00	00	00
<i>Lc.c</i> <sub>3</sub>	6,32.10 <sup>8</sup>	3,16.10 <sup>7</sup>	9,50.10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	00	00
<i>Lc.d</i> <sub>1</sub>	6,02.10 <sup>8</sup>	1,34.10 <sup>7</sup>	5,01.10 <sup>5</sup>	3,89.10 <sup>2</sup>	69	00
<i>Lc.d</i> <sub>2</sub>	2,67.10 <sup>8</sup>	8,80.10 <sup>6</sup>	6,60.10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	00	00
<i>Lc.d</i> <sub>3</sub>	6,68.10 <sup>8</sup>	3,32.10 <sup>6</sup>	00	00	00	00
<i>Lc.d</i> <sub>4</sub>	9.10 <sup>8</sup>	2.10 <sup>5</sup>	1,8.10 <sup>3</sup>	22	00	00

**Tableau 7** : Survie des souches lactiques pure à pH 4,3 +0,3 % de sels biliaires.

temps Souches	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.l</i> <sub>1</sub>	9,50.10 <sup>8</sup>	00	00	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>2</sub>	9,06.10 <sup>8</sup>	1,42.10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	4,08.10 <sup>7</sup>	1,88.10 <sup>2</sup>	00
<i>Lc.l</i> <sub>3</sub>	1,5.10 <sup>8</sup>	4,10.10 <sup>9</sup>	6,01.10 <sup>9</sup>	9,60.10 <sup>7</sup>	7,65. 10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>4</sub>	1,01.10 <sup>8</sup>	4,90.10 <sup>8</sup>	10 <sup>2</sup>	00	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>5</sub>	8,97.10 <sup>8</sup>	3,80.10 <sup>8</sup>	1,09.10 <sup>6</sup>	4,40.10 <sup>3</sup>	1,01.10 <sup>2</sup>	2
<i>Lc.l</i> <sub>6</sub>	6,89.10 <sup>8</sup>	7,80.10 <sup>9</sup>	7,76.10 <sup>9</sup>	5,12.10 <sup>9</sup>	6,88.10 <sup>7</sup>	3,16.10 <sup>7</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>7</sub>	5,37.10 <sup>8</sup>	1,40.10 <sup>5</sup>	3,06.10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	5	00
<i>Lc.l</i> <sub>8</sub>	4,77.10 <sup>8</sup>	7,94.10 <sup>7</sup>	6,76.10 <sup>7</sup>	5,75.10 <sup>7</sup>	3,16. 10 <sup>4</sup>	3,09. 10 <sup>2</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>9</sub>	3,98.10 <sup>8</sup>	7,79.10 <sup>8</sup>	3,60.10 <sup>7</sup>	1,25.10 <sup>7</sup>	.10 <sup>5</sup>	2.10 <sup>3</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>10</sub>	4,59.10 <sup>8</sup>	5,50.10 <sup>6</sup>	3,10.10 <sup>5</sup>	1,08.10 <sup>2</sup>	1,03.10 <sup>2</sup>	9
<i>Lc.l</i> <sub>11</sub>	5,49.10 <sup>8</sup>	5,44.10 <sup>9</sup>	4,02.10 <sup>9</sup>	2.10 <sup>9</sup>	1,40.10 <sup>8</sup>	3,40.10 <sup>7</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>12</sub>	3,34.10 <sup>8</sup>	2,23.10 <sup>9</sup>	3,16.10 <sup>6</sup>	79	9	00
<i>Lc.l</i> <sub>13</sub>	2,90.10 <sup>8</sup>	2,44.10 <sup>9</sup>	6,98.10 <sup>8</sup>	4,96.10 <sup>8</sup>	7,04.10 <sup>5</sup>	00
<i>Lc.c</i> <sub>1</sub>	1,47.10 <sup>8</sup>	7,94.10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	1,85.10 <sup>5</sup>	00	00
<i>Lc.c</i> <sub>2</sub>	1,20.10 <sup>8</sup>	9,70.10 <sup>7</sup>	5,02.10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	1,50.10 <sup>2</sup>	10
<i>Lc.c</i> <sub>3</sub>	5,66.10 <sup>8</sup>	8,50.10 <sup>6</sup>	5,50.10 <sup>5</sup>	2.10 <sup>5</sup>	7,60.10 <sup>3</sup>	96
<i>Lc.d</i> <sub>1</sub>	4,30.10 <sup>8</sup>	2,00.10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	.10 <sup>2</sup>	15	00
<i>Lc.d</i> <sub>2</sub>	1,08.10 <sup>8</sup>	8.10 <sup>7</sup>	6,80.10 <sup>7</sup>	5,88.10 <sup>6</sup>	3,10.10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>
<i>Lc.d</i> <sub>3</sub>	9,90.10 <sup>8</sup>	9,40.10 <sup>8</sup>	00	00	00	00
<i>Lc.d</i> <sub>4</sub>	10 <sup>8</sup>	7,20.10 <sup>8</sup>	6,50.10 <sup>8</sup>	6,16.10 <sup>7</sup>	3,50.10 <sup>7</sup>	1,84.10 <sup>7</sup>

**Tableau 8 :** Survie des souches lactiques pure à pH 6,5 + 0,3 % de sels biliaires.

temps Souches	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.l</i> <sub>1</sub>	2,08. 10 <sup>8</sup>	2. 10 <sup>9</sup>	9. 10 <sup>9</sup>	6,8. 10 <sup>10</sup>	5,44. 10 <sup>10</sup>	2,08. 10 <sup>9</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>2</sub>	1,44. 10 <sup>8</sup>	1,44. 10 <sup>9</sup>	1. 10 <sup>10</sup>	9,88. 10 <sup>10</sup>	4. 10 <sup>9</sup>	1,76. 10 <sup>9</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>3</sub>	7,40. 10 <sup>8</sup>	9,50. 10 <sup>8</sup>	9,03. 10 <sup>9</sup>	1,36. 10 <sup>10</sup>	2,68. 10 <sup>10</sup>	9,04. 10 <sup>9</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>4</sub>	5,88. 10 <sup>8</sup>	4,64. 10 <sup>9</sup>	8,56. 10 <sup>9</sup>	9,98. 10 <sup>10</sup>	2,40. 10 <sup>8</sup>	6,40. 10 <sup>6</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>5</sub>	4,40. 10 <sup>8</sup>	6,20. 10 <sup>8</sup>	9,60. 10 <sup>9</sup>	1,04. 10 <sup>10</sup>	7,80. 10 <sup>9</sup>	5,42. 10 <sup>9</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>6</sub>	8,00. 10 <sup>8</sup>	9,77. 10 <sup>9</sup>	1,20. 10 <sup>10</sup>	7,76. 10 <sup>10</sup>	2,36. 10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>7</sub>	1,18. 10 <sup>8</sup>	9,62. 10 <sup>8</sup>	9,62. 10 <sup>8</sup>	9,69. 10 <sup>9</sup>	4,06. 10 <sup>10</sup>	2,60. 10 <sup>8</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>8</sub>	7,41. 10 <sup>8</sup>	3,60. 10 <sup>9</sup>	7,60. 10 <sup>9</sup>	7,77. 10 <sup>9</sup>	5,10. 10 <sup>10</sup>	6,70. 10 <sup>8</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>9</sub>	7,76. 10 <sup>8</sup>	9,4. 10 <sup>9</sup>	9,6. 10 <sup>9</sup>	2,04. 10 <sup>10</sup>	4,87. 10 <sup>10</sup>	5,36. 10 <sup>9</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>10</sub>	1,20. 10 <sup>8</sup>	6,62. 10 <sup>9</sup>	6,74. 10 <sup>9</sup>	7,84. 10 <sup>9</sup>	1,02. 10 <sup>10</sup>	2,16. 10 <sup>7</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>11</sub>	3,44. 10 <sup>8</sup>	3,49. 10 <sup>9</sup>	8,04. 10 <sup>8</sup>	2. 10 <sup>9</sup>	1,44. 10 <sup>6</sup>	5,70. 10 <sup>4</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>12</sub>	1,75. 10 <sup>8</sup>	8,88. 10 <sup>8</sup>	3,76. 10 <sup>9</sup>	9,10. 10 <sup>9</sup>	7,12. 10 <sup>8</sup>	2,16. 10 <sup>6</sup>
<i>Lc.l</i> <sub>13</sub>	1,56. 10 <sup>8</sup>	1,53. 10 <sup>9</sup>	4,14. 10 <sup>9</sup>	9,54. 10 <sup>9</sup>	1,10. 10 <sup>9</sup>	7,20. 10 <sup>8</sup>
<i>Lc.c</i> <sub>1</sub>	1,90. 10 <sup>8</sup>	4,60. 10 <sup>8</sup>	1,09. 10 <sup>9</sup>	3,10. 10 <sup>6</sup>	7. 10 <sup>5</sup>	4. 10 <sup>5</sup>
<i>Lc.c</i> <sub>2</sub>	3,50. 10 <sup>8</sup>	9,50. 10 <sup>9</sup>	5,89. 10 <sup>10</sup>	9,62. 10 <sup>10</sup>	8,28. 10 <sup>9</sup>	1,50. 10 <sup>8</sup>
<i>Lc.c</i> <sub>3</sub>	4,56. 10 <sup>8</sup>	7,96. 10 <sup>9</sup>	3,99. 10 <sup>10</sup>	4,10. 10 <sup>10</sup>	2,36. 10 <sup>9</sup>	3. 10 <sup>7</sup>
<i>Lc.d</i> <sub>1</sub>	7,24. 10 <sup>8</sup>	1,18. 10 <sup>9</sup>	1,90. 10 <sup>9</sup>	5,96. 10 <sup>9</sup>	1,09. 10 <sup>10</sup>	1,12. 10 <sup>9</sup>
<i>Lc.d</i> <sub>2</sub>	7,76. 10 <sup>8</sup>	5,04. 10 <sup>9</sup>	5,80. 10 <sup>9</sup>	4,68. 10 <sup>10</sup>	4,80. 10 <sup>7</sup>	3,10. 10 <sup>6</sup>
<i>Lc.d</i> <sub>3</sub>	3. 10 <sup>8</sup>	1,3. 10 <sup>8</sup>	5,08. 10 <sup>8</sup>	2,30. 10 <sup>9</sup>	8,40. 10 <sup>8</sup>	8,89. 10 <sup>7</sup>
<i>Lc.d</i> <sub>4</sub>	2. 10 <sup>8</sup>	1,82. 10 <sup>9</sup>	6,76. 10 <sup>9</sup>	1,6. 10 <sup>10</sup>	2,92. 10 <sup>10</sup>	9,02. 10 <sup>10</sup>

**Tableau 9** : Survie des souches lactiques pure à pH 6,5 + 3 % de flore intestinale.

temps Souches	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.l</i> <sub>1</sub>	$1,2 \cdot 10^9$	$4,3 \cdot 10^8$	$7,34 \cdot 10^9$	$4,16 \cdot 10^7$	$5,10 \cdot 10^5$	$9,10 \cdot 10^2$
<i>Lc.l</i> <sub>2</sub>	$2,36 \cdot 10^9$	$2,83 \cdot 10^8$	$7,41 \cdot 10^3$	$10^2$	00	00
<i>Lc.l</i> <sub>3</sub>	$1,76 \cdot 10^8$	$10^8$	$8,04 \cdot 10^7$	$1,63 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^5$	$8,90 \cdot 10^3$
<i>Lc.l</i> <sub>4</sub>	$2,38 \cdot 10^9$	$2,20 \cdot 10^9$	$3,04 \cdot 10^7$	$3,55 \cdot 10^5$	$4,83 \cdot 10^3$	$5,00 \cdot 10^2$
<i>Lc.l</i> <sub>5</sub>	$5,75 \cdot 10^9$	$2,13 \cdot 10^9$	$4,89 \cdot 10^8$	$7,76 \cdot 10^7$	$9,54 \cdot 10^5$	$2,18 \cdot 10^2$
<i>Lc.l</i> <sub>6</sub>	$2,51 \cdot 10^7$	$3,89 \cdot 10^8$	$1,77 \cdot 10^8$	$5,01 \cdot 10^6$	$7,24 \cdot 10^5$	$4,07 \cdot 10^4$
<i>Lc.l</i> <sub>7</sub>	$2,18 \cdot 10^9$	$7,94 \cdot 10^8$	$9,77 \cdot 10^7$	$6,60 \cdot 10^7$	$7,89 \cdot 10^7$	00
<i>Lc.l</i> <sub>8</sub>	$9,54 \cdot 10^9$	$3,63 \cdot 10^9$	$4,36 \cdot 10^7$	$9,12 \cdot 10^5$	$7,07 \cdot 10^2$	5,37
<i>Lc.l</i> <sub>9</sub>	$8,31 \cdot 10^9$	$5,01 \cdot 10^9$	$2,08 \cdot 10^9$	$9,77 \cdot 10^8$	$6,02 \cdot 10^8$	$9,77 \cdot 10^7$
<i>Lc.l</i> <sub>10</sub>	$3,90 \cdot 10^9$	$4,01 \cdot 10^8$	$4,91 \cdot 10^7$	$6,63 \cdot 10^5$	$7,20 \cdot 10^3$	$7,78 \cdot 10^2$
<i>Lc.l</i> <sub>11</sub>	$2,29 \cdot 10^9$	$2,03 \cdot 10^9$	$2,60 \cdot 10^8$	$1,36 \cdot 10^7$	$1,44 \cdot 10^6$	$1,18 \cdot 10^4$
<i>Lc.l</i> <sub>12</sub>	$7,07 \cdot 10^9$	$5,37 \cdot 10^9$	$6,45 \cdot 10^7$	$2,45 \cdot 10^7$	$6,30 \cdot 10^6$	$1,65 \cdot 10^4$
<i>Lc.l</i> <sub>13</sub>	$9,94 \cdot 10^8$	$8,2 \cdot 10^8$	$1,04 \cdot 10^8$	$1,58 \cdot 10^7$	$3,40 \cdot 10^5$	$7,90 \cdot 10^3$
<i>Lc.c</i> <sub>1</sub>	$9,32 \cdot 10^9$	$1,23 \cdot 10^8$	$2,95 \cdot 10^8$	$6,16 \cdot 10^7$	$5,12 \cdot 10^7$	$3,23 \cdot 10^7$
<i>Lc.c</i> <sub>2</sub>	$1,30 \cdot 10^9$	$7,97 \cdot 10^8$	$7,8 \cdot 10^7$	$1,44 \cdot 10^5$	$4,5 \cdot 10^3$	$5,60 \cdot 10^2$
<i>Lc.c</i> <sub>3</sub>	$1,29 \cdot 10^9$	$5,40 \cdot 10^9$	$7,77 \cdot 10^7$	$2,08 \cdot 10^6$	$4,41 \cdot 10^4$	$9,7 \cdot 10^2$
<i>Lc.d</i> <sub>1</sub>	$3,16 \cdot 10^8$	$7,76 \cdot 10^8$	$2,95 \cdot 10^7$	$6,16 \cdot 10^5$	$8,91 \cdot 10^3$	2,29
<i>Lc.d</i> <sub>2</sub>	$7,70 \cdot 10^9$	$7,77 \cdot 10^9$	$9,98 \cdot 10^7$	$1,12 \cdot 10^6$	$2,10 \cdot 10^3$	4,60
<i>Lc.d</i> <sub>3</sub>	$8,10 \cdot 10^9$	$3,12 \cdot 10^9$	$3,14 \cdot 10^4$	$9,14 \cdot 10^3$	$2,15 \cdot 10^2$	00
<i>Lc.d</i> <sub>4</sub>	$9,04 \cdot 10^9$	$5,12 \cdot 10^9$	$3,54 \cdot 10^8$	$3,54 \cdot 10^8$	$8,19 \cdot 10^7$	$2,58 \cdot 10^5$

**Tableau 10** : Survie des associations bactériennes à pH 2,5 en absence de sels biliaires.

temps Souches	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>lc.l<sub>3</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	9,70.10 <sup>8</sup>	3,05.10 <sup>7</sup>	1,20.10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup>	50,00	00
<i>lc.l<sub>5</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>4</sub></i>	1,80.10 <sup>8</sup>	4,50.10 <sup>6</sup>	7,99.10 <sup>4</sup>	6,36.10 <sup>4</sup>	00	00
<i>lc.l<sub>7</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	5,60.10 <sup>8</sup>	3,01.10 <sup>4</sup>	00	00	00	00
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	8,12.10 <sup>8</sup>	1,10.10 <sup>8</sup>	5,20.10 <sup>3</sup>	00	00	00
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	2,00.10 <sup>8</sup>	5,07.10 <sup>7</sup>	8,00.10 <sup>3</sup>	6,20.10 <sup>2</sup>	00	00
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	8,11.10 <sup>8</sup>	7,46.10 <sup>5</sup>	1,20.10 <sup>2</sup>	00	00	00
<i>lc.l<sub>12</sub>lc.c<sub>4</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	9,64.10 <sup>8</sup>	6,00.10 <sup>7</sup>	3,50.10 <sup>3</sup>	1,80.10 <sup>2</sup>	00	00
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	4,09.10 <sup>8</sup>	7,70.10 <sup>7</sup>	2,13.10 <sup>3</sup>	00	00	00
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	7,10.10 <sup>8</sup>	8,80.10 <sup>7</sup>	6,10.10 <sup>4</sup>	2,20.10 <sup>2</sup>	00	00
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	1,16.10 <sup>8</sup>	8,38.10 <sup>7</sup>	2,03.10 <sup>5</sup>	2,90.10 <sup>2</sup>	00	00

**Tableau 11** : Survie des associations bactériennes à pH 2,5 en présence de 0,3 % de sels biliaires.

temps Souches	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>lc.l<sub>3</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	6,70.10 <sup>8</sup>	6,20.10 <sup>7</sup>	1,90.10 <sup>4</sup>	00	00	00
<i>lc.l<sub>5</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>4</sub></i>	3,60.10 <sup>8</sup>	2,98.10 <sup>7</sup>	4,10.10 <sup>5</sup>	8,26.10 <sup>2</sup>	3,20.10 <sup>2</sup>	00
<i>lc.l<sub>7</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	2,30.10 <sup>7</sup>	2,80.10 <sup>2</sup>	1,50.10 <sup>2</sup>	00	00	00
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	5,40.10 <sup>9</sup>	5,36.10 <sup>8</sup>	1,20.10 <sup>4</sup>	3,05.10 <sup>2</sup>	00	00
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	3,10.10 <sup>8</sup>	2,56.10 <sup>8</sup>	7,00.10 <sup>6</sup>	1,18.10 <sup>3</sup>	77	24
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	3,52.10 <sup>8</sup>	3,94.10 <sup>7</sup>	2,02.10 <sup>5</sup>	5,70.10 <sup>2</sup>	00	00
<i>lc.l<sub>12</sub>lc.c<sub>4</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	7,90.10 <sup>8</sup>	4,32.10 <sup>5</sup>	4,70.10 <sup>3</sup>	3,00.10 <sup>2</sup>	10	00
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	1,40.10 <sup>8</sup>	1,01.10 <sup>7</sup>	9,80.10 <sup>6</sup>	4,80.10 <sup>2</sup>	95	00
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	7,80.10 <sup>8</sup>	6,10.10 <sup>4</sup>	8,40.10 <sup>2</sup>	00	00	00
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	7,13.10 <sup>7</sup>	7,50.10 <sup>7</sup>	9,10.10 <sup>5</sup>	1,99.10 <sup>2</sup>	00	00

**Tableau 12 :** Survie des associations bactériennes à pH 4,3 en absence de sels biliaries.

temps Souches	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>lc.l<sub>3</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	9,77.10 <sup>8</sup>	7,04.10 <sup>8</sup>	4,45.10 <sup>8</sup>	7,92.10 <sup>7</sup>	6,54.10 <sup>7</sup>	4,17. 10 <sup>6</sup>
<i>lc.l<sub>5</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>4</sub></i>	1,47.10 <sup>9</sup>	1,08.10 <sup>9</sup>	7,16.10 <sup>8</sup>	2,88.10 <sup>8</sup>	6,70.10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
<i>lc.l<sub>7</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	9,15.10 <sup>8</sup>	6,10.10 <sup>5</sup>	3,32.10 <sup>8</sup>	5,74.10 <sup>3</sup>	8,45.10 <sup>3</sup>	2,00. 10 <sup>2</sup>
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	10 <sup>9</sup>	9,95.10 <sup>9</sup>	5,63.10 <sup>8</sup>	3,32.10 <sup>6</sup>	1,12.10 <sup>6</sup>	4,12. 10 <sup>2</sup>
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	10 <sup>9</sup>	9,77.10 <sup>8</sup>	5,62.10 <sup>8</sup>	3,44.10 <sup>6</sup>	1,63.10 <sup>4</sup>	2. 10 <sup>2</sup>
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	4,02.10 <sup>7</sup>	4,32.10 <sup>6</sup>	7,19.10 <sup>4</sup>	2,30.10 <sup>4</sup>	9,80.10 <sup>2</sup>	5,00. 10 <sup>2</sup>
<i>lc.l<sub>12</sub>lc.c<sub>4</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	2,20.10 <sup>8</sup>	5,93.10 <sup>7</sup>	8,54.10 <sup>6</sup>	4,80.10 <sup>2</sup>	2,98.10 <sup>2</sup>	09
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	1,31.10 <sup>9</sup>	7,40.10 <sup>8</sup>	4,58.10 <sup>8</sup>	2,10.10 <sup>6</sup>	2,60.10 <sup>6</sup>	6,02. 10 <sup>5</sup>
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	4,00.10 <sup>9</sup>	9,97.10 <sup>9</sup>	4,40.10 <sup>9</sup>	8,90.10 <sup>7</sup>	9,70.10 <sup>4</sup>	6,16. 10 <sup>2</sup>
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	5,33.10 <sup>9</sup>	4,58.10 <sup>9</sup>	7,40.10 <sup>8</sup>	9,10.10 <sup>6</sup>	2,60.10 <sup>6</sup>	3,28. 10 <sup>5</sup>

**Tableau 13 :** Survie des associations bactériennes à pH 4,3 en présence de 0,3 % de sels biliaries.

temps Souches	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>lc.l<sub>3</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	3,98.10 <sup>9</sup>	1,99.10 <sup>9</sup>	2,75.10 <sup>7</sup>	3,09.10 <sup>7</sup>	2,51.10 <sup>7</sup>	3,16. 10 <sup>2</sup>
<i>lc.l<sub>5</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>4</sub></i>	1,25.10 <sup>9</sup>	4,54.10 <sup>8</sup>	2,30.10 <sup>7</sup>	2,30.10 <sup>7</sup>	5,75.10 <sup>3</sup>	3,22.10 <sup>2</sup>
<i>lc.l<sub>7</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	1,40.10 <sup>9</sup>	5,47.10 <sup>5</sup>	00	00	00	00
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	4,20.10 <sup>9</sup>	8,79.10 <sup>8</sup>	4,42.10 <sup>7</sup>	4,42.10 <sup>7</sup>	2,70.10 <sup>6</sup>	1,50. 10 <sup>3</sup>
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	7,10.10 <sup>9</sup>	8,90.10 <sup>7</sup>	7,70.10 <sup>6</sup>	7,70.10 <sup>6</sup>	8,79.10 <sup>3</sup>	3,20. 10 <sup>2</sup>
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	2,55.10 <sup>7</sup>	5,76.10 <sup>4</sup>	2,50.10 <sup>4</sup>	3,00.10 <sup>2</sup>	00	00
<i>lc.l<sub>12</sub>lc.c<sub>4</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	6,20.10 <sup>8</sup>	2,97.10 <sup>6</sup>	4,48.10 <sup>3</sup>	3,25.10 <sup>2</sup>	2,00	00
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	5,11.10 <sup>9</sup>	3,53.10 <sup>8</sup>	6,10.10 <sup>7</sup>	4,48.10 <sup>7</sup>	3,25.10 <sup>2</sup>	00
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	6,98.10 <sup>9</sup>	5,70.10 <sup>9</sup>	3,60.10 <sup>9</sup>	3,00.10 <sup>4</sup>	1,80.10 <sup>2</sup>	00
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	2,13.10 <sup>9</sup>	1,88.10 <sup>9</sup>	9,14.10 <sup>7</sup>	9,14.10 <sup>7</sup>	4,10.10 <sup>3</sup>	2,75. 10 <sup>3</sup>

**Tableau 14** : Survie des associations bactériennes à pH 6,5 en absence de sels biliaires.

temps Souches	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>lc.l<sub>3</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	4,70.10 <sup>9</sup>	9,99.10 <sup>10</sup>	2,60.10 <sup>11</sup>	8,31.10 <sup>11</sup>	5,88.10 <sup>11</sup>	6,18. 10 <sup>10</sup>
<i>lc.l<sub>5</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>4</sub></i>	1,60.10 <sup>10</sup>	5,80.10 <sup>10</sup>	8,12.10 <sup>10</sup>	3,48.10 <sup>11</sup>	4,50.10 <sup>10</sup>	6,81.10 <sup>9</sup>
<i>lc.l<sub>7</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	3,11.10 <sup>9</sup>	4,86.10 <sup>9</sup>	7,07.10 <sup>9</sup>	9,77.10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	5,62. 10 <sup>8</sup>
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	9,38.10 <sup>9</sup>	9,50.10 <sup>10</sup>	9,76.10 <sup>10</sup>	9,90.10 <sup>10</sup>	2,00.10 <sup>9</sup>	1,31. 10 <sup>8</sup>
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	1,20.10 <sup>10</sup>	1,90.10 <sup>10</sup>	3,50.10 <sup>10</sup>	8,59.10 <sup>9</sup>	6,79.10 <sup>9</sup>	2,00. 10 <sup>9</sup>
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	3,99.10 <sup>9</sup>	5,60.10 <sup>11</sup>	7,10.10 <sup>11</sup>	7,30.10 <sup>10</sup>	6,09. 10 <sup>9</sup>	8,80. 10 <sup>8</sup>
<i>lc.l<sub>12</sub>lc.c<sub>4</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	3,64.10 <sup>9</sup>	5,41.10 <sup>9</sup>	8,05.10 <sup>9</sup>	2,80.10 <sup>10</sup>	9,90. 10 <sup>9</sup>	1,30. 10 <sup>9</sup>
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	9,99.10 <sup>9</sup>	1,40.10 <sup>11</sup>	3,87.10 <sup>11</sup>	9,18.10 <sup>11</sup>	7,98.10 <sup>10</sup>	2,00. 10 <sup>8</sup>
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	6,72.10 <sup>9</sup>	6,58.10 <sup>9</sup>	9,00.10 <sup>10</sup>	4,20.10 <sup>10</sup>	5,40.10 <sup>9</sup>	4,00. 10 <sup>9</sup>
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	7,10.10 <sup>9</sup>	7,70.10 <sup>10</sup>	1,50.10 <sup>11</sup>	8,90.10 <sup>10</sup>	3,04.10 <sup>10</sup>	9,77. 10 <sup>9</sup>

**Tableau 15** : Survie des associations bactériennes à pH 6,5 en présence de 0,3 % de sels biliaires.

temps Souches	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>lc.l<sub>3</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	1,94.10 <sup>9</sup>	4,56.10 <sup>9</sup>	4,14.10 <sup>9</sup>	4,44.10 <sup>8</sup>	5,83.10 <sup>8</sup>	1,70. 10 <sup>8</sup>
<i>lc.l<sub>5</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>4</sub></i>	4,22.10 <sup>9</sup>	1,78.10 <sup>10</sup>	6,09.10 <sup>8</sup>	2,25.10 <sup>10</sup>	4,42.10 <sup>7</sup>	1,50.10 <sup>7</sup>
<i>lc.l<sub>7</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	5,70.10 <sup>9</sup>	4,88.10 <sup>9</sup>	2,55. 10 <sup>8</sup>	5,20. 10 <sup>8</sup>	6,98.10 <sup>7</sup>	6,20. 10 <sup>6</sup>
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	9,76.10 <sup>9</sup>	9,08.10 <sup>10</sup>	7,98.10 <sup>9</sup>	6,66.10 <sup>8</sup>	2,80. 10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	4,74.10 <sup>9</sup>	5,60.10 <sup>9</sup>	7,80.10 <sup>8</sup>	6,80.10 <sup>8</sup>	9,55.10 <sup>7</sup>	3,20. 10 <sup>2</sup>
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	4,10.10 <sup>7</sup>	6,30.10 <sup>9</sup>	3,88.10 <sup>9</sup>	1,20.10 <sup>7</sup>	9,66. 10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
<i>lc.l<sub>12</sub>lc.c<sub>4</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	6,69.10 <sup>8</sup>	7,40.10 <sup>7</sup>	7,78.10 <sup>6</sup>	7,40.10 <sup>5</sup>	6,80. 10 <sup>5</sup>	3,20. 10 <sup>6</sup>
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	9,60.10 <sup>9</sup>	6,83.10 <sup>9</sup>	5,90.10 <sup>9</sup>	3,60.10 <sup>9</sup>	7,57.10 <sup>8</sup>	2,01.10 <sup>5</sup>
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	2,01.10 <sup>9</sup>	9,60.10 <sup>6</sup>	8,73.10 <sup>5</sup>	1,05.10 <sup>5</sup>	9,10.10 <sup>3</sup>	3,77. 10 <sup>8</sup>
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	8,88.10 <sup>9</sup>	8,12.10 <sup>9</sup>	2,71.10 <sup>9</sup>	6,66.10 <sup>8</sup>	5,91.10 <sup>6</sup>	4,40. 10 <sup>3</sup>

**Tableau 16:** Survie des associations bactériennes à pH 6,5 en présence de 3 % de flore intestinale

temps Souches	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>lc.l<sub>3</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	9,99.10 <sup>9</sup>	1,22.10 <sup>9</sup>	1,02.10 <sup>9</sup>	7,66.10 <sup>8</sup>	5,77.10 <sup>8</sup>	3,16. 10 <sup>2</sup>
<i>lc.l<sub>5</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>4</sub></i>	8,12.10 <sup>9</sup>	6,30.10 <sup>8</sup>	3,93.10 <sup>9</sup>	6,91.10 <sup>7</sup>	5,32.10 <sup>7</sup>	3,22.10 <sup>2</sup>
<i>lc.l<sub>7</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	8,90.10 <sup>9</sup>	8,70.10 <sup>7</sup>	7,34. 10 <sup>6</sup>	9,46. 10 <sup>5</sup>	4,66.10 <sup>3</sup>	00
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	9,50.10 <sup>9</sup>	4,80.10 <sup>9</sup>	9,32.10 <sup>8</sup>	4,84.10 <sup>8</sup>	9,01. 10 <sup>6</sup>	1,23. 10 <sup>5</sup>
<i>lc.l<sub>9</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	1,90.10 <sup>9</sup>	4,23.10 <sup>8</sup>	8,60.10 <sup>7</sup>	6,49.10 <sup>7</sup>	9,48.10 <sup>6</sup>	2,26. 10 <sup>5</sup>
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>3</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	5,60.10 <sup>9</sup>	1,05.10 <sup>10</sup>	5,88.10 <sup>8</sup>	6,91.10 <sup>7</sup>	7,87. 10 <sup>6</sup>	9,99.. 10 <sup>4</sup>
<i>lc.l<sub>12</sub>lc.c<sub>4</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	5,41.10 <sup>9</sup>	9,36.10 <sup>6</sup>	3,94.10 <sup>5</sup>	8,19.10 <sup>3</sup>	00	00
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>2</sub>lc.d<sub>1</sub></i>	5,54.10 <sup>9</sup>	7,58.10 <sup>9</sup>	5,12.10 <sup>8</sup>	8,44.10 <sup>7</sup>	5,88.10 <sup>3</sup>	00
<i>lc.l<sub>11</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>3</sub></i>	6,58.10 <sup>9</sup>	5,88.10 <sup>7</sup>	3,39.10 <sup>5</sup>	1,99.10 <sup>5</sup>	4,70.10 <sup>4</sup>	1,04. 10 <sup>4</sup>
<i>lc.l<sub>13</sub>lc.c<sub>1</sub>lc.d<sub>2</sub></i>	7,70.10 <sup>9</sup>	9,55.10 <sup>9</sup>	5,16.10 <sup>8</sup>	8,89.10 <sup>7</sup>	5,98.10 <sup>7</sup>	00

## ANNEXE 3 :

**Tableau 1:** Criblage des souches lactiques vis-à-vis des germes intestinales (moyenne de trois essais, diamètres d'inhibition en mm).

Souches intestinales Souche Lactiques	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus ssp</i>	<i>Clostridium ssp</i>	<i>Bacteroide ssp</i>	<i>Bifidobacterium ssp</i>	<i>Lactobacillus ssp</i>
<i>Lc .I<sub>3</sub></i>	10,0 ± 0,0	25,0 ± 0,7	30,3 ± 0,5	24,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0
<i>Lc .I<sub>5</sub></i>	17,0 ± 0,4	20,2 ± 0,2	32,2 ± 0,8	12,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	7,7 ± 0,0
<i>Lc .I<sub>7</sub></i>	18,0 ± 0,0	30,7 ± 0,9	33,0 ± 0,0	28,0 ± 0,4	0,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0
<i>Lc .I<sub>9</sub></i>	20,2 ± 0,5	37,5 ± 0,3	32,0 ± 0,6	21,0 ± 0,4	1,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0
<i>Lc .I<sub>11</sub></i>	20,5 ± 0,7	25,5 ± 0,5	25,0 ± 0,4	25,2 ± 0,8	0,0 ± 0,0	9,6 ± 0,5
<i>Lc .I<sub>12</sub></i>	24,0 ± 0,6	30,0 ± 0,0	30,8 ± 0,8	12,0 ± 0,6	1,0 ± 0,0	4,2 ± 0,9
<i>Lc .I<sub>13</sub></i>	30,0 ± 0,3	35,0 ± 0,3	35,3 ± 0,5	18,1 ± 0,7	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0
<i>Lc .d<sub>1</sub></i>	10,0 ± 0,4	24,0 ± 0,5	19,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Lc .d<sub>3</sub></i>	4,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	9,0 ± 0,9	7,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
<i>Lc .d<sub>4</sub></i>	2,0 ± 0,9	18,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	4,4 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Lc .c<sub>1</sub></i>	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Lc .c<sub>2</sub></i>	6,0 ± 0,8	12,0 ± 0,2	4,0 ± 0,4	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Lc .c<sub>3</sub></i>	7,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0	6,6 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>A 1</b>	12,0 ± 0,2	5,5 ± 0,5	9,0 ± 0,0	7,9 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>A 2</b>	6,70 ± 0,1	6,0 ± 0,1	15,0 ± 0,3	4,4 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>A 3</b>	20,0 ± 0,5	20,2 ± 0,9	25,0 ± 0,9	13,9 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>A 4</b>	20,5 ± 0,4	30,0 ± 0,3	19,0 ± 0,1	15,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>A 5</b>	3,90 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>A 6</b>	0,00 ± 0,0	7,0 ± 0,7	4,4 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<b>A 7</b>	8,00 ± 0,1	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

**Tableau 2 :** Germes obligatoires et passagers mis en évidence par une analyse de routine de la flore physiologique intestinale et valeurs de tolérance d'après les laboratoires d'analyse Réunis Kutter-Liners – Hastert, (2003).

	Germes résidents	Germes passagers	Valeurs de tolérance (norme) exprimés en UFC/ml
Germes aérobies	<i>E. coli</i>		$10^6-10^7$
		<i>E. coli</i> atypiques : Lactose négatif Hémolytique	$\leq 10^5$
	<i>Enterococcus ssp</i>		$10^6-10^7$
		Autres anterobacteries <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Klebsiella ssp</i></li> <li>• <i>Proteus ssp</i></li> <li>• <i>Enterobacter ssp</i></li> <li>• <i>Citrobacter ssp</i></li> </ul>	$\leq 10^5$
Germes micro aérophi-les	<i>Lactobacillus ssp</i>		$10^5-10^7$
Germes anaérobies	Bacteroides – Prevotella – Porphyromonas		$10^8-10^{10}$
	<i>Bifidobacterium ssp</i>		$10^8-10^{10}$
	<i>Clostridium ssp</i>		$\leq 10^5$
champignons		Levures : <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Candida ssp</i></li> <li>• <i>Saccharomyces ssp</i></li> </ul>	$\leq 10^2$
		Moisissures : <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Geotrichum ssp</i></li> <li>• <i>Mucor ssp</i></li> <li>• <i>Aspergillus ...</i></li> </ul>	$\leq 10^2$

**Remarques :**

Chez le nourrisson élevé au lait maternel, le nombre de Bacteroides est sensiblement diminué.  
Le nombre de *Clostridium ssp* est généralement augmenté chez les personnes âgées.

**Tableau 3** : Pourcentage d'inhibition par les bactériocines (%).

Souche intestinales Souche Lactiques	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus ssp</i>	<i>Clostridium ssp</i>	<i>Bacteroides ssp</i>
<i>Lc .I<sub>9</sub></i>	17,86	21,28	34,60	16,8
<i>Lc .I<sub>11</sub></i>	5,99	7,6	16,40	3,4
<i>Lc .I<sub>12</sub></i>	6,6	7,5	18,85	5,5
<i>Lc .I<sub>13</sub></i>	9,6	17,85	28,88	7,9
<i>Lc .dl</i>	3,9	6,3	4,6	1,5
<i>A4</i>	11,9	13,04	15,65	11,2

**Tableau 04** : Diamètres d'inhibition des espèces intestinales à différents pH.

pH souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>E. coli</i>	0	0	0	9	16	18	18	6	0
<i>Enterococcus ssp</i>	0	0	3	11	20	24	23	10	2
<i>Clostridium ssp</i>	0	0	2	13	35	35	34	5	0
<i>Bcateroides ssp</i>	0	0	0	2	10	9,8	9	2	0

**Tableau 05:** Charges microbiennes des espèces intestinales après l'interaction.

Souches	0 h	16 h	24 h	48 h	72 h	120 h	96 h	144 h	168 h	192 h
<i>Lc .l<sub>9</sub></i>	$8,31.10^9$	$1,87.10^9$	$9,58.10^8$	$6,89.10^8$	$4,16.10^7$	00	$8,87.10^3$	00	00	00
<i>E.coli</i>	$9,80.10^6$	$8,20.10^6$	$2,40.10^6$	$8,8.10^5$	$7,30.10^5$	$2,75.10^5$	$4,44.10^5$	$2,5.10^5$	$10^5$	$9,80.10^6$
<i>Enterococcus ssp</i>	$1,80.10^7$	$9,80.10^6$	$8,17.10^6$	$6,23.10^6$	$5,12.10^6$	$3,16.10^6$	$4,52.10^6$	$2,00.10^6$	$10^7$	$1,70.10^7$
<i>Clostridium ssp</i>	$7,80.10^4$	$7,80.10^4$	$5,79.10^4$	$1,51.10^4$	$9,30.10^3$	$1,28.10^3$	$9,10.10^3$	$1.10^4$	$7,80.10^4$	$10^4$
<i>Bacteroides ssp</i>	$9,78.10^8$	$7,89.10^8$	$6,98.10^8$	$4,52.10^8$	$10^8$	$2,81.10^7$	$1,49.10^7$	$9,80.10^7$	$2,46.10^8$	$7,89.10^8$
<i>Bifidobacteriu m ssp</i>	$9,60.10^8$	$1,60.10^9$	$5,83.10^9$	$1,50.10^{10}$	$3,77.10^{10}$	$7,76.10^{10}$	$7,80.10^{10}$	$9,00.10^{10}$	$5,30.10^9$	$9,60.10^8$
<i>Lactobacillus ssp</i>	$2,30.10^6$	$7,80.10^6$	$9,81.10^6$	$1,04.10^7$	$4,80.10^7$	$3,16.10^8$	$2,34.10^8$	$6,20.10^8$	$5,20.10^6$	$2,77.10^6$