

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Génie biologique

Thème

Effet de la composition du milieu de culture sur l'activité antibactérienne de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*

Présenté par :

ETOKA – BEKA Mandingha Kosso

HAMIMI Nassilia

Jury :

President : IDRES N.

Examinateur : LAINCER F.

Promoteur : BENDJEDDOU K.

Année universitaire : 2011/2012



Remerciement

Au terme de ce travail, nous rendons grâce à DIEU tout puissant pour avoir éclairé notre chemin et nous avoir donné la foi et le courage afin de réaliser ce modeste travail.

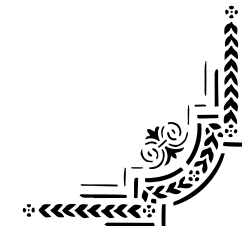
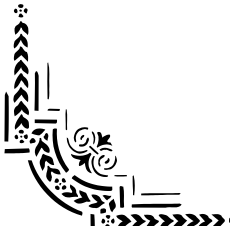
Nos remerciements s'adressent à l'ensemble des professeurs de l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia, particulièrement :

Mr. BENDJEDDOU K, pour avoir accepté de nous encadrer et nous avoir fait bénéficier de ses connaissances.

Mme IDRES N. qui nous a fait l'immense honneur de présider le jury et de juger notre travail.

Mlle LAINCER F. qui nous fait l'honneur d'examiner ce travail et de participer au jury.

Nos vifs remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont tendu la main notamment aux moments difficiles ; parmi elles nous citerons : Mr. BOUKKEROUI A., Mlle BOUKTIT N. et Mme GAROUT H.





Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

Tous d'abord à mes parents, Mr. ETOKA-BEKA Patrick Albert et Dr. ETOKA-BEKA Felicitas William MKANTA qui se sont sacrifiés toutes leurs vies pour que j'arrive là où je suis.

À mes grands frères : Emeka, Chaggan et Eloua

À ma grande sœur : Atsoko

Aux membres de ma famille qui m'ont soutenue étant en Algérie notamment :

TUGAMBWA Novatus, DONGO Gérard, ETOKABEKA désiré, OBOUAKA Jean de Dieu, BONGOU Camille ; ILOKI Zoe ETOKABEKA, YOMBI IOUA Carine ETOKABEKA, OWAMBA KOUMBA Donatien, SAMZUGI Charles, ETOKABEKA Job, ETOKABEKA Hervé

À une personne qui compte beaucoup pour moi et à qui je tien beaucoup :
mon très chér

IDO Juvenal Amos qui m'a toujours assisté et encouragé.

*À tous mes autres proches, parents et amies : SILOV Alwyn, NEGONGA Helena, ILONGA Nicole, GAUTHE Faidatou, BANGOURA Mamita, OPOKO Grace, ILOYE Esther, BONGOU Dita, GANGA Kellie, GOMA Jessica, BUABENG Michael, CUMAIO Helia, BEDA Bianca, HAMIMI Nassilia et tous ceux que je n'ai pas pu citer.
Que Dieux Nous Bénissent.*



Mamie



Dédicaces



Mes dédicaces vont :

*À toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la
réalisation de ce travail.*

Nassilia



Liste des Tableaux

Tableau I : Variation de l'extrait de viande.

Tableau II : Variation de l'extrait de levure.

Tableau III : Moyenne des Diamètres des zones d'inhibitions et nombre d'unités arbitraires du milieu MRS Standard.

Tableaux d'annexe

Tableau I : Quelques souches probiotiques commerciales utilisées en santé humaine.

Tableau II : Bouillon MRS.

Tableau III : Variation de l'extrait de viande dans le bouillon MRS.

Tableau IV : Variation de l'extrait de levure dans le bouillon MRS.

Tableau V : Gélose Muller Hinton.

Tableau VI : Bouillon nutritif.

Tableau VII: Diamètres des zones d'inhibitions et nombre d'unités arbitraires du surnagent concentré dans le milieu MRS Standard additionné de différentes concentrations d'extrait de viande.

Tableau VIII: Diamètres des zones d'inhibitions et nombre d'unités arbitraires du surnagent concentré dans le milieu MRS Standard additionné de différentes concentrations d'extrait de viande.

Liste des Figures

Figure 1 : Séquence et structure de lantibiotique de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2).

Figure 2 : Standardisation de l'inoculum des souches utiliser

Figure 3 : Test d'activité antimicrobienne du surnageant de *Lactobacillus paracasei* par la méthode des puits

Figure 4 : Dilution en cascade du surnagent concentré

Figure 5 : Zones d'inhibitions du surnagent concentré sur milieu MRS Standard obtenues avec les cinq essaies.

Figure 6 : Effet de la concentration d'extrait de viande sur les diamètres des zones d'inhibitions.

Figure 7 : Effet de la concentration d'extrait de viande sur le nombre d'unités arbitraires.

Figure 8 : Effet de la concentration d'extrait de levure sur les diamètres des zones d'inhibitions.

Figure 9 : Effet de la concentration d'extrait de levure sur le nombre d'unités arbitraires.

Figure 10 : Effet du Tween 80

Figure 11 : Effet du chlorhydrate de cystéine.

Figures d'annexe

Figure 1 : Principales voies de fermentation des sucres chez les bactéries lactiques.

Figure 2 : Les réactions de la glycolyse. Cours de Biochimie 2. Chapitre II : Biochimie Métabolique.

Figure 3: Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard observées dans les 5 tubes.

Figure 4 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard additionné de tween 80 observées dans les 5 tubes.

Figure 5 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard contenant du chlorhydrate de cysteine observées dans les 5 tubes.

Figure 6 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard ne contenant pas d'Extrait de viande observées dans les 5 tubes.

Figure 7 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard contenant 1 g d'Extrait de viande observées dans les 5 tubes.

Figure 8 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard contenant 2g d'Extrait de viande observées dans les 5 tubes.

Figure 9 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard contenant 4g d'Extrait de viande observées dans les 5 tubes.

Figure 10 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard contenant 5 g d'Extrait de viande observées dans les 5 tubes.

Figure 11 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard plus 6 g d'Extrait de viande observées dans les 5 tubes.

Figure 12 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard plus 7 g d'Extrait de viande observées dans les 5 tubes.

Figure 13 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard ne contenant pas d'Extrait de levure observées dans les 5 tubes.

Figure 14 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard additionné de 1 g d'Extrait de levure observées dans les 5 tubes.

Figure 15 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard additionné de 2 g d'Extrait de levure observées dans les 5 tubes.

Figure 16 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard contenant 3 g d'Extrait de levure observées dans les 5 tubes.

Liste des abreviation

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ARN : Acide ribonucleique
- β : Beta
- FAO : Organisation des Nation Unies pour l'amélioration et l'agriculture
- IgA : Immunoglobuline A
- kDa : Kilo Dalton
- MRS : De Man, Rogosa et Sharpe
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- PCR : Polymerase chain reaction
- pH : potentiel d'Hydrogène
- UFC : Unité formant colonies
- WHO : World Hearth Organization

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....01

Partie théorique

Chapitre I

1.Lactobacilles

1.1.Définition.....02

1.2.Caractères généraux.....02

1.2.1.Caractères morphologiques.....02

1.2.2.Caractères culturels.....02

1.2.3.Habitat.....03

1.2.4.Position taxonomique des Lactobacilles.....04

2.*Lactobacillus paracasei*.....04

2.1.Application des Lactobacilles dans l'alimentation humaine et animale.....05

2.1.1.Application dans l'alimentation humaine.....05

2.1.2.Application dans l'alimentation animale.....06

Chapitre II

1.Probiotiques

1.1.Définition des probiotiques.....07

1.2.Mécanisme d'action et rôle des probiotiques.....08

1.2.1.Probiotiques et produits toxiques.....08

1.2.2.Probiotiques et bactéries indésirables.....08

1.2.3.Probiotiques et digestibilité de la ration alimentaire.....09

1.2.4.Probiotique et immunité.....	09
2.Les bactériocines	
2.1.Définition des bactériocines.....	11
2.2.Classification des bactériocines.....	12
2.2.1.Classe I. Les lantibiotiques.....	12
2.2.2.Classe II.....	13
2.2.3.Classe III.....	13
2.2.4.Classe IV.....	13
2.3.Le mécanisme de production des bactériocines et sa régulation.....	13
2.4.Intérêt des bactériocines de bactéries lactiques.....	14
2.5.Les applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire.....	14
3.Influence de la variation des milieux de cultures pour sur la production de bactériocine.....	15

Partie pratique

Matériels et methodes

1. Origine des souches utilisées.....	16
2. Revivification des souches.....	16
3. Standardisation des inocula.....	16
4. Effet de la composition des différents milieux de culture utilisés sur l'activité antibacterienne.....	18
4.1. Effet de l'extrait de viande.....	18
4.2. Effet de l'extrait de levure.....	19
4.3. Effet du tween 80.....	19
4.4. Effet du chlorhydrate de cystéine.....	19

5. Test de l'activité antibactérienne de <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> à l'égard d' <i>E. coli</i>	20
6. Calcul du nombre d'unités arbitraires.....	22

Résultats et discussions

1. Test de l'activité antibactérienne de <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> à l'égard d' <i>E. coli</i> avec le surnagent concentré.....	24
2. Effet de la composition du milieu de culture sur l'activité antibactérienne de <i>Lactobacillus paracasei</i> avec le surnageant concentré.....	24
2.1. MRS Standard.....	24
2.2.Effet de l'extrait de viande.....	25
2.3. Effet de l'extrait de levure.....	27
2.4. Effet du Tween 80.....	29
2.5. Effet du chlorhydrate de cystéine.....	29
Conclusion.....	31

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Les organismes vivants se sont dotés, au cours de l'évolution, de systèmes de défense afin de se protéger des agressions bactériennes. On retrouve chez les bactéries des bactériocines et des acides organiques. Un intérêt pour les bactériocines s'est récemment développé, et notamment pour les bactériocines de bactéries lactiques en raison de leur utilisation potentielle en industrie agro-alimentaire. La compréhension du mode d'action de ces molécules constitue non seulement un intérêt du point de vue fondamental mais également sur le plan appliqué. En effet, il paraît essentiel de déterminer les conditions favorables à une activité optimale des bactériocines afin d'envisager leur utilisation future en industrie agro-alimentaire. Afin de définir le mécanisme d'action des bactériocines, de nombreuses études ont été menées. Elles reposent sur la comparaison, entre souches sensibles et souches résistantes, de données génétiques ou physiologiques ou encore sur l'étude des relations structure-fonction de ces peptides antimicrobiens (**Morisset, 2003**). Cependant très peu de travaux se sont basés sur l'importance de la composition des milieux de culture et l'effet que jouent les différents composants de ce dernier sur la production optimale des bactériocines (**Todorov et al, 2005**).

En 1960, De Man, Rogosa et Sharpe ont développé la formulation d'un milieu (MRS) spécialement adapté pour cultiver et dénombrer des lactobacilles provenant de produits alimentaires plus particulièrement les produits laitiers. Chaque composant du milieu MRS joue un rôle spécifique. La peptone, l'extrait de viande, l'extrait de levure, le glucose, les acides aminés, les sels de manganèse et de magnésium apportent les éléments nutritifs indispensables à la croissance des lactobacilles. Le Tween 80, mélange d'esters oléiques, est une source d'acides gras nécessaires à la croissance de ces germes. Le phosphate dipotassique contribue à stabiliser le pH au cours de la croissance bactérienne (**Biokar, 2009**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude, qui consiste à connaître l'influence de certains composants du milieu MRS notamment l'extrait de levure, l'extrait de viande, le chlorhydrate de cystéine et le tween 80 sur l'activité antimicrobienne de la souche *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*.

1. Lactobacilles

1.1.Définition

Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles forment un ensemble très disparate et représentent le groupe le plus important. Leur métabolisme est principalement saccharolytique, le lactate représente au moins 50 % des métabolites finaux produits à partir du glucide assimilé. En fonction de la stéréospécificité des lactate-déshydrogénases présentes dans les cellules, les lactobacilles produisent l'isomère D(+) ou L(-) ou les deux isomères de cet acide. Ces bactéries ont aussi besoin d'acides aminés, de nucléotides et de vitamines pour se multiplier. Certaines espèces de lactobacilles ont un métabolisme homofermentaire strict et produisent deux molécules de lactate par molécule de glucose fermenté. Les espèces homofermentaires strictes utilisent la voie d'Embden-Meyerhof pour convertir une molécule d'hexose en deux molécules de lactate. Ces bactéries ne possèdent pas de phosphoketolase mais une aldolase, qui convertit le fructose-1,6 diphosphate en deux molécules de triose-3 phosphate. Elles sont donc incapables de fermenter les pentoses. D'autres ont un métabolisme hétérofermentaire et produisent d'autres produits finaux comme l'acétate, l'éthanol, le formiate, le succinate et le CO₂. Les espèces hétérofermentaires strictes ne possèdent pas d'aldolase mais une phosphoketolase qui scinde les pentoses en une molécule d'acide lactique et une molécule d'acide acétique. Enfin, certains lactobacilles, hétérofermentaires facultatifs, ont une phosphoketolase inductible, par les pentoses. Les hexoses sont métabolisés par homofermentation (**Tailliez, 2004**)

1.2.Caractères généraux

1.2.1. Caractères morphologiques

Les cellules, à coloration de Gram positive, non sporulées et généralement non mobiles, peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs, fins, courts, incurvés ou ovoïdes. La formation de chaînes de cellules est courante (**Morrisset, 2003 ; Tailliez, 2004**).

1.2.2. Caractères culturels

La plupart des lactobacilles se multiplient dans une gamme de températures comprise entre 15 °C et 42 °C. Certaines espèces de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55 °C, certaines souches peuvent croître à des températures allant de 2 à 55 °C (**Euzeby, 2006 ; Saad, 2010**).

Les lactobacilles donnent une très bonne croissance sur milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe). En milieu, gélosé les colonies sont dans la plupart des cas de petites tailles, lisses, brillantes et dans de rares cas elles sont de couleur jaunâtre ou rougeâtre (cas de *Lactobacillus plantarum*). Ce genre se développe sur milieu à pH allant de 5.4 à 6.4 (quelques espèces peuvent pousser à un pH de 2.8 tel que *Lactobacillus suebicus*). La croissance optimal est obtenu dans des conditions microaérophiles bien que la plus part des souches soient anaérobies facultatives (Morriset, 2003 ; Walter, 2009).

1.2.3. Habitat

Les lactobacilles sont présents en infimes quantités sur les surfaces végétales. Cependant, ces faibles populations sont suffisantes pour assurer la colonisation rapide des végétaux abîmés ou en décomposition lors de la récolte (Tailliez, 2004).

Les lactobacilles entrent dans la constitution des levains thermophiles commerciaux ou artisanaux utilisés dans la fabrication des yaourts, laits fermentés et fromages à pâte pressée cuite. Ces lactobacilles sont essentiellement des espèces homofermentaires (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ou subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*). Ils jouent un rôle important dans la texture et la flaveur des fromages (Lopez et Mayo 1997; Swearingen 2001).

La fermentation lactique est aussi utilisée pour conserver les poissons et viandes. La fermentation peut être obtenue en mélangeant, au poisson, du sel et une petite quantité de riz pré-fermenté, de céréale ou de manioc comme source de carbone (Tailliez 2004). Dans le cas des viandes, les lactobacilles des espèces *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* et *Lactobacillus plantarum* peuvent jouer un rôle de barrière et limitent ainsi le développement de bactéries d'altération ou indésirables, ils assurent l'acidification indispensable à la texture des viandes salées saumurées et des saucisses fermentées, comme ils contribuent à l'aromatization de ces produits à travers le catabolisme de certains acides aminés (Montel et al, 1997). On trouve aussi les lactobacilles dans la flore vaginale. Elles ont un rôle de protection vis-à-vis des infections. Les espèces les plus fréquente sont *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* et *Lactobacillus crispatus*. Les espèces *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri* et *Lactobacillus salivarius* sont les espèces les plus fréquemment trouvé en population sous-dominante dans la flore colique humaine (Tailliez, 2004). Les lactobacilles font aussi parti de la flore buccale, on retrouve souvent les espèces suivantes : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus salivariu* (Dal Bello et Hertel, 2006).

Dans la majorité des cas les Lactobacilles sont non pathogènes mais elles peuvent occasionnellement causer des infections : endocardites, bactériémies et abcès où *Lactobacillus rhamnosus* est l'espèce la plus fréquemment impliquée (**Denis et al, 2007**).

1.2.4. Position taxonomique des Lactobacilles

Depuis le développement des techniques moléculaires, le genre *Lactobacillus* a été revisité une nouvelle fois à travers l'analyse et la comparaison des séquences d'ARN ribosomique 16S (ARNr). Cette étude a montré que les lactobacilles ne forment pas un groupe monophylétique (**Collins et al, 1991**). Trois grands groupes ont été constitués sur la base de la comparaison de ces séquences: le groupe *Lactobacillus delbrueckii*, le groupe *Lactobacillus casei/ pediococcus* et le groupe *Leuconostoc paramesenteroides* renommé ultérieurement *Weissella paramesenteroides* (**Collins et al 1993**). Ces groupes ne correspondent pas exactement aux groupes *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium* initialement proposés par Orla-Jensen 1919 ni à ceux basés sur le type métabolique (**Hammes et Vogel 1995**).

Le groupe *Lactobacillus delbrueckii* est le plus homogène et contient des espèces homofermentaires strictes correspondant au groupe des *Thermobacterium*. Les espèces et sous-espèces les plus connues de ce groupe sont *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus acidophilus* (**Collins et al, 1989**).

2. *Lactobacillus paracasei*

Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* sont des petits bacilles fins de 0.8 à 1.0 µm de largeur et de 2.0 à 4.0 µm de longueur, souvent à extrémité carrée, isolés ou en petites chaînes (**Walter et al, 2009**). Elles représentent des lactobacilles hétérofermentaires facultatives mésophiles et peuvent être homofermentaires en fonction du substrat (**Bourgeois et Larpent, 1996 ; Guiraud, 2003**).

La position taxonomique de *Lactobacillus paracasei* a connu plusieurs changements dans le temps avec l'évolution des techniques de taxonomie. En 1989, **Collins et coll**, proposaient une classification du groupe *Lactobacillus casei*. Ils décrivaient alors deux nouvelles espèces : *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus rhamnosus*. La description de ces nouvelles espèces était basée sur l'homologie ADN/ADN, et la description phénotypique

était très limitée. **Dicks et coll (1996)**, proposait une révision de cette dernière classification. D'après ces auteurs, *Lactobacillus paracasei* et toutes les espèces proches doivent être incluses dans le groupe *Lactobacillus casei*. En **1998**, **Klein et coll**, énonçaient que le groupe *Lactobacillus casei* soit divisé en 4 sous-groupes soit : *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zeae*, *Lactobacillus casei*, et *Lactobacillus rhamnosus*. **Ward et Timmins (1999)** ont pu séparer *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus rhamnosus* par PCR ; la majorité des souches de *Lactobacillus casei* étaient identifiées comme appartenant à l'espèce *Lactobacillus paracasei*. En **2002**, alors que **Holzappel et Schillinger** démontraient que les souches de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zeae* et *Lactobacillus.rhamnosus* sont représentées par le groupe de *Lactobacillus casei*; Dellaglio et al ont proposé que les souches *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus paracasei* soit réunies en un seul taxon de *Lactobacillus casei*. Ainsi, *Lactobacillus casei* est scindé en 4 sous espèces : *Lactobacillus casei* subsp. *zeae*, *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus.casei* subsp. *rhamnosus* (**Dellaglio et al, 2002**). En **2005**, la commission judiciaire internationale pour la Systématique des Procaryotes a rejeté la proposition de Dellaglio et a confirmé que le nom de *Lactobacillus paracasei* peut être utilisé comme un nom correct incluant des sous espèces (**Tindall, 2008**).

2.1.Application des Lactobacilles dans l'alimentation humaine et animale

2.1.1. Application dans l'alimentation humaine

Les lactobacilles mésophiles, bien qu'ayant seulement une influence relativement faible sur la protéolyse de certains aliments comme le fromage, ont la capacité d'influencer de manière significative certains attributs important comme l'arôme et la saveur (**Lynch et al, 1999**).

Certaines espèces et sous-espèces du groupe *Lactobacillus delbrueckii* comme *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sont des bactéries des yaourts et des laits fermentés (**Collins et al, 1989**).

Le lait de tofu est un meilleur substrat pour la culture de la souche *Lactobacillus paracasei*. Beaucoup de cultures probiotiques se développent mieux sur du lait de soja que sur du lait de vache, le lait de tofu peut être ainsi un alternatif potentiel au lait de soja comme substrat pour la production de Lactobacilles (**Thi et al, 2003**).

Les cultures de pain de levain contiennent des bactéries d'acides lactiques qui ont la capacité d'inhiber la croissance de certaines moisissures (**Magnusson et Schnurer, 2001**).

L'intérêt grandissant est survenu ces dernières années en relation à l'addition d'espèces de Lactobacilles (des groupes *Lactobacillus casei*) aux laits fermentés, ainsi une grande variété de produits contenant ceux-ci ont été conçue et commercialisée. Pour avoir cet effet thérapeutique, un nombre suffisant de micro-organismes viables doit être présent tout au long de la durée de stockage du produit, soit un minimum de 10^5 à 10^6 UFC/ml de bactéries probiotiques dans le lait fermenté (**Gueimonde et al, 2004**).

Les arômes des fromages fabriqués à base du lait bovin avec les souches de Lactobacilles sont différentes que ceux sans l'ajout de Lactobacilles. Ces fromages présentent aussi des caractéristiques sensorielles supérieures comme ils ont un goût aromatique et sucré sans amertume (**Thage et al, 2004**).

Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis* et *Lactobacillus helveticus*, deux lactobacilles des levains sont utilisés dans la fabrication des fromages à pâte pressée cuite (**Collins et al, 1989**).

2.1.2. Application dans l'alimentation animale

Ajouté à l'alimentation des chevaux, ces cultures peuvent activer le système immunitaire, diminuer la reproduction de micro-organismes pathogènes, réduire l'influence des substances pro-carcinogénique qui peuvent être produites pendant certains processus digestifs à activités enzymatiques des micro-organismes dans le côlon (**Supuková et al, 2010**).

Lactobacillus paracasei du lait fermenté diminue le niveau excessif de cholestérol du sang total chez les lapins. Des résultats semblables ont été constatés chez les rats (**Dilmi-Bouras et al, 2007**).

Elles sont aussi appliquées en alimentation porcine et avicole. Elles permettent l'engraissement des animaux, jouent un rôle de régulateurs métaboliques, immunomodulateurs, détoxifiants, contrôleurs de contaminations microbiennes, améliorateurs de la valeur nutritionnelle, additifs sensoriels et séquestrant de mycotoxines (**Bernardeau et al, 2009**).

1. Probiotiques

1.1. Définition des probiotiques

Un grand nombre d'aliments laitiers contenant une variété d'éléments bénéfiques pour la santé sont en vente sur le marché mondiale alimentaire. Certains de ces éléments montrent des propriétés communément appelées « probiotiques » quand l'aliment contient des micro-organismes qui ont des propriétés thérapeutiques notamment une activité antimicrobienne, ou hypocholestérolémiant, amélioration de la digestion du lactose et la maintenance de l'équilibre de la flore gastro-intestinale (**Gomes et Malcata, 1999**).

Le terme probiotique dérive de deux mots grec « pros » et « bios » qui signifient littéralement « pour la vie » (**Gbassi, 2010**). Les probiotiques ont bénéficiés de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. La notion de probiotiques a été développée principalement grâce aux travaux de Metchnikoff ayant suggéré que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes accroît la longévité en réduisant, dans le tube digestif, la population de bactéries purifiantes ou produisant des toxines. Une des premières définitions les décrivaient comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » a été proposé. Ensuite, la définition a été élargie à des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ». Cette dernière définition inclut potentiellement des produits métaboliques microbiens y compris les antibiotiques. Plus tard, une autre définition très proche du sens actuel a été proposée : « Supplément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale » (**Makhloufi, 2012**). La FAO et l'OMS ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et formulent la définition suivante : « micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère ». (**FAO/OMS, 2002**).

De nombreux microorganismes sont considérés comme probiotiques, Il en existe 4 grands groupes:

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

- Les Bifidobactéries : D'origine humaine ou animale, elles appartiennent à la flore intestinale normale et possèdent une bonne résistance aux sucs gastriques. Avec l'âge, la population de Bifidobacteries diminue et leurs espèces varient.
- Les différentes levures de type Saccharomyces : Elles sont principalement utilisées par l'industrie agroalimentaire.
- Les autres bactéries sporulées : Dont *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* (**Dias et al, 1995**).

1.2.Mécanisme d'action et rôle des probiotiques

Le mécanisme d'action exact des probiotiques est encore inconnu. Toutefois, trois principales hypothèses ont été avancées

L'influence favorable de ces agents serait reliée à:

- L'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes et de leurs liaisons avec l'épithélium gastro-intestinal;
- L'amélioration de la fonction barrière de l'intestin;
- La modulation du système immunitaire (**Marteau et al, 1998**).

1.2.1. Probiotiques et produits toxiques

Les probiotiques interviennent très certainement dans la neutralisation de produits toxiques. Ils provoqueraient une atténuation du catabolisme intra-digestif et une orientation de la microflore intestinale pour réduire l'absorption des substances toxiques (ammoniacs, amines et indoles) et diminueraient les biotransformations des sels biliaires et des acides gras en produits toxiques. Les bactéries probiotiques auraient aussi la capacité de produire des métabolites susceptibles de neutraliser in situ certaines toxines bactériennes (**Marteau et al, 1994**).

1.2.2. Probiotiques et bactéries indésirables

L'inhibition des bactéries indésirables ou pathogènes par les probiotiques peut se faire de différentes façons. La production d'acides organiques (acide lactique ou acide acétique) à partir de glucide ingérés lors de la prise alimentaire en abaissant le pH, freine le développement des *Escherichia coli* et des *Salmonella*. La diminution de concentration des bactéries coliformes dans le tube digestif serait due au pH très bas, obtenu grâce à l'apport de

lait acidifié par de l'acide lactique. En milieu humide, les lactobactéries, produisent du peroxyde d'hydrogène inhibiteur de nombreuses souches bactériennes pathogènes, mais respectant l'écosystème des bactéries elles-mêmes. Cette production de peroxyde d'hydrogène et d'acide lactique peut bloquer le développement de certaines espèces pathogènes comme le virus de la fièvre aphteuse, certains virus de la poliomyélite, certains champignons comme *Candida albicans* ou, encore, certaines bactéries comme *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium butyricum*, *Pseudomonas spp* et *Salmonella*. De plus, l'acidification favoriserait la régulation du transit intestinal. Les probiotiques pourraient également limiter la croissance des bactéries pathogènes en produisant des substances antimicrobiennes, de type bactériocine. De même, certaines souches utilisées comme probiotiques possèdent la capacité de déconjuguer les sels biliaires. Ces derniers sont sécrétés lors de la digestion et transformés avec d'autres substances en sels biliaires conjugués. Les formes déconjuguées ont un pouvoir inhibiteur plus important sur le développement des bactéries. Certains probiotiques ont une capacité d'adhérence au tube digestif. Deux études récentes ont montré que des souches adhérentes de *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus* pouvaient coloniser de manière prolongée une partie du tube digestif. Les probiotiques pourraient agir en limitant l'implantation des germes pathogènes par compétition au niveau des sites de fixation pour la colonisation : si les probiotiques utilisent la surface du tube digestif, les germes pathogènes n'ont plus de place pour s'implanter. Certains lactobacilles adhèrent aux villosités intestinales et inhibent la fixation d'*Escherichia coli* entéropathogènes (Marteau *et al*, 1998).

1.2.3. Probiotiques et digestibilité de la ration alimentaire

Les probiotiques permettent d'améliorer la digestibilité de nombreux nutriments. Leur rôle essentiel est de garantir une bonne hygiène digestive en favorisant la dégradation et l'absorption de certains aliments.

L'intolérance au lactose est due à l'absence d'assimilation du lactose, principal glucide du lait. Celle-ci est la conséquence d'un défaut de synthèse de la lactase, l'enzyme digestive du lactose. Cette anomalie provoque de nombreux troubles gastro-intestinaux chez les sujets sensibles. De multiples travaux ont montré que la lactase véhiculée par certaines bactéries lactiques participait dans l'intestin à la digestion du lactose. La lactase retrouvée dans les bactéries du yaourt a une membrane très facilement attaquée par les acides biliaires (sécrétés lors de la digestion). Ceci explique l'excellente digestion du lactose du yaourt (90%)

(contenant les deux bactéries *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) chez les sujets pourtant déficients en lactase. En pratique clinique, le remplacement du lait par du yaourt conduit à une meilleure absorption et à une meilleure tolérance du lactose chez les sujets présentant une intolérance primaire au lactose ou une intolérance secondaire survenant au cours de diarrhées persistantes ou après résection intestinale étendue. Les probiotiques facilitent aussi la digestion de glucides plus complexes que le lactose. C'est le cas de certaines souches glycénolytiques. Les probiotiques améliorent ainsi l'utilisation de la ration alimentaire de manière indirecte en agissant sur la microflore intestinale ou au niveau des cellules épithéliales du tube digestif de l'hôte. Les probiotiques stimulent l'activité enzymatique des microorganismes, permettant ainsi une meilleure assimilation des aliments ingérés. Ils stimulent également l'activité lactase, invertase et maltase des cellules épithéliales du tube digestif. Les probiotiques permettent aussi d'améliorer l'assimilation des acides aminés essentiels en inhibant l'action destructrice des désamidonases et des décarboxylases bactériennes excrétées par la microflore du tube digestif. De même, les probiotiques peuvent synthétiser des acides aminés essentiels. Des travaux sont entrepris sur l'efficacité clinique potentielle des probiotiques dans les situations caractérisées par une inflammation intestinale ou une perméabilité intestinale accrue (**Rambaud, 1998**).

1.2.4. Probiotique et immunité

De nombreuses études réalisées chez l'animal ont montré que l'administration orale de divers probiotiques pouvait moduler certains composants de la barrière immunitaire. La barrière immunitaire est la capacité de résistance de l'intestin face à la colonisation par des bactéries provenant de l'extérieur. Lorsqu'elle est en bon état, la flore permet à l'organisme de s'opposer à l'implantation et à la multiplication des germes néfastes endogènes. D'autres travaux ont montré que l'ingestion chez l'homme de fortes quantités de bactéries du yaourt augmentait la capacité des lymphocytes à sécréter diverses cytokines (médiateurs chimiques immunitaires). Plusieurs études contrôlées ont montré que l'administration de la souche *Lactobacillus GG* à des enfants atteints de gastroentérite à rotavirus raccourcissait significativement la durée de la diarrhée. L'administration de ce probiotique entraîne une amélioration de l'immunité non spécifique liée à une augmentation des cellules circulantes capables de sécréter des immunoglobulines. Au moment de la convalescence, 90 % des nourrissons du groupe recevant le probiotique contre seulement 46 % de ceux recevant le placebo, avaient développé une réponse anticorps spécifique IgA contre les rotavirus. Les mêmes auteurs ont rapporté que l'efficacité d'un vaccin oral antirotavirus pouvait être

augmentée par l'administration simultanée de *Lactobacillus GG*. Dans une étude, des souriceaux nouveau-nés étaient mieux protégés contre une infection à rotavirus si leur mère allaitante recevait une immunisation orale contre le rotavirus associée au probiotique B brève que si elle le recevait seul. Des effets protecteurs de certains probiotiques contre des infections intestinales ont été démontrés sur des animaux. Des essais réalisés chez l'homme ont suggéré que des probiotiques pourraient aider à éradiquer certaines bactéries pathogènes chez des porteurs chroniques de *Salmonella*, de *Campylobacter* ou de *Clostridium difficilea*. Plusieurs travaux ont démontré un effet thérapeutique significatif et intéressant de plusieurs probiotiques, notamment *Lactobacillus GG*, pour raccourcir la durée de la diarrhée en cas de gastro-entérite. Une étude contrôlée a montré que l'administration de *Bifidobacterium sp* et *Streptococcus thermophilus* à des nourrissons hospitalisés diminuait significativement le risque de diarrhée et de portage de rotavirus. La flore endogène et le système immunitaire jouent un rôle dans les cancers coliques. Plusieurs auteurs ont montré que certains probiotiques pouvaient diminuer l'activité de substances telles que des enzymes, des mutagènes ou des acides biliaires secondaires dans les selles, qui pourraient chacun être impliqués dans le cancer colique (Clot, 1994).

2. Les bactériocines

2.1. Définition des bactériocines

Les bactériocines sont définies comme des molécules d'origine bactérienne, de nature protéique ou partiellement protéique et douées d'une activité antagoniste vis-à-vis des espèces phylogénétiquement proches de l'espèce productrices. Leur synthèse par voie ribosomique les différencie des antibiotiques de nature peptidique provenant de l'assemblage enzymatique d'acides aminés libres. Deux grands groupes de bactériocines peuvent être distingués avec, d'une part, les bactériocines produites par des bactéries à Gram négatif, principalement représentées par les colicines et les microcines, et d'autre part, celles produites par les bactéries à Gram positif, et notamment les bactériocines de bactéries lactiques. (Cenatiempo *et al*, 1996)

La découverte des bactériocines remonte au début du vingtième siècle lorsque Gratia (1925) démontre l'existence d'une substance inhibitrice, thermostable, provenant d'un dialysat d'un milieu de culture d'*Escherichia coli*. Cette substance nommée colicine V inhibe la croissance d'une autre souche d'*E. coli* : *E. coli* ϕ .

Au cours des dernières décennies, de nombreux travaux ont porté sur les bactériocines produites par les genre *Bacillus* et *Staphylococcus*, et également par des membres de la famille des bactéries lactiques en raison de leur intérêt en industrie agro-alimentaire. Les résultats obtenus démontrent l'existence d'une grande diversité parmi les bactériocines (de bactéries lactiques notamment) au niveau structural, du mode d'action et de l'organisation génétique (Cenatiempo *et al*, 1996).

2.2. Classification des bactériocines

Les particularités des bactériocines de bactéries lactiques sont leur nature souvent cationique et amphiphile et leur mode d'action privilégiant la perméabilisation de la membrane cible (Nissen-Meyer et Nes, 1997).

2.2.1. Classe I. Les lantibiotiques :

Peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post traditionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déshydrobutyrine et la déshydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types: **la classe Ia** qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et **la classe Ib** qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticin 3147. Chaque lantibiotique possède une séquence et une structure (Fig1.) (Mcauliffe *et al*, 2001 ; Twomey *et al*, 2002).

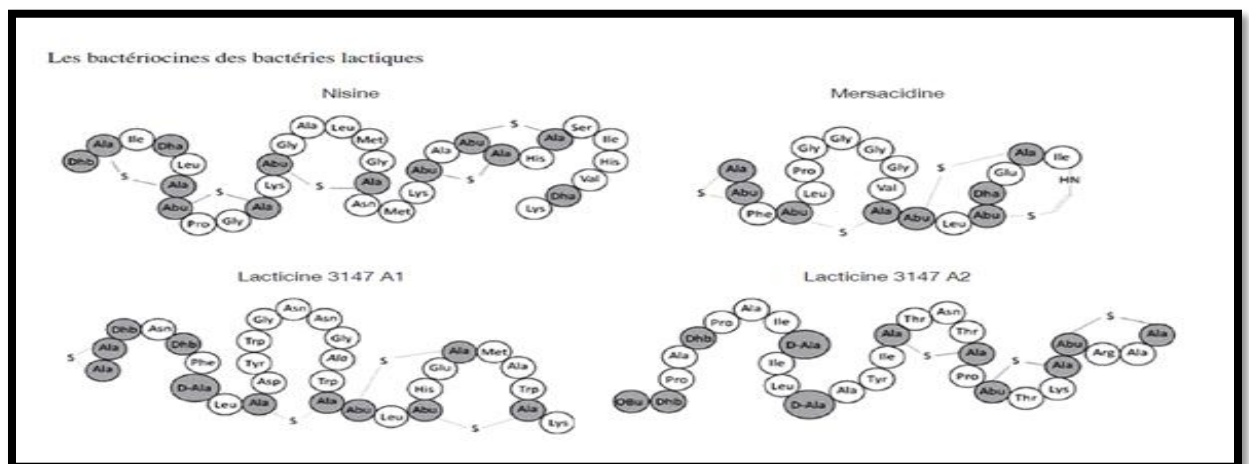


Figure 1 : Séquence et structure de lantibiotique de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1et A2).

2.2.2. Classe II.

Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoléctrique varie entre 8 et 10. Cette classe est divisée en trois sous-classes. Les bactériocines de **la sous-classe IIa** contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant une séquence consensus ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (**Fimland, 2000 ; Richard, 2006**). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (**Eijsink, 1998; Fimland, 2000; Drider, 2006**). **La sous-classe IIb** comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. **La sous-classe IIc** contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes.

2.2.3. Classe III.

Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Chez les lactobacilles cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (**Nilsen et al, 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigutova et al, 2007**).

2.2.4. Classe IV.

Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite (**Dortu, 2009**).

2.3. Le mécanisme de production des bactériocines et sa régulation

Différentes protéines sont impliquées dans la production des bactériocines et sa régulation. Les bactériocines sont produites sous forme d'un pré-peptide non-biologiquement actif qui subira des modifications post-traductionnelles pour aboutir au peptide actif. Cette production est souvent régulée par un système de *Quorum Sensing*, un mécanisme permettant à certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité de la population bactérienne.

2.4. Intérêt des bactériocines de bactéries lactiques

Dans leur grande majorité, les bactériocines peptidiques de bactéries lactiques sont thermorésistantes (120°C pendant 10 minutes), stables dans des zones de pH de 3 à 8 et sensibles à l'action d'enzymes protéolytiques (présentes dans le tractus intestinal). De plus, contrairement à certains autres peptides antimicrobiens d'invertébrés et vertébrés, elles ne montrent pas d'activité hémolytique vis à vis des cellules eucaryotes. (Nes et Holo, 2000). Ces protéines ne présentent pas de nocivité apparente pour l'homme et les animaux domestiques, ce qui implique une utilisation potentielle dans les domaines agro-alimentaire et thérapeutique. A l'heure actuelle, la nisine est la seule à être agréée par le comité d'experts de la FAO/WHO et à être employée comme agent de conservation (E234) dans l'industrie agro-alimentaire. Grâce à leurs propriétés biologiques et physico-chimiques, les bactériocines sont généralement compatibles avec les procédés de fabrication et de conservation des aliments (Deegan *et al*, 2006).

2.5. Les applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (Wijaya *et al*, 2006). Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou altérantes sans inhiber les bactéries indispensables. Les bactériocines doivent cependant être considérées comme un moyen de préservation complémentaire à ceux déjà existant (Deegan *et al*, 2006). Elles peuvent être appliquées sous une forme purifiée ou semi-purifiée. Les bactéries productrices peuvent également être utilisées dans les produits alimentaires, la bactériocine sera alors produite in-situ.

Les bactériocines purifiées ou semi-purifiées sont appliquées après production en fermenteur, purification ou semi-purification et conditionnement par les techniques adéquates, qui peuvent être relativement coûteuses. D'un point de vue législatif, une telle préparation est considérée comme un additif alimentaire. Jusqu'à présent, seule la nisine, un lantibiotique, est acceptée comme additif alimentaire (E234) (Guinane *et al*, 2005).

Les bactériocines peuvent également être appliquées sous forme d'un concentré obtenu après fermentation, par la souche productrice, et atomisation d'un substrat alimentaire tel que le lait, par exemple Cette préparation sera considérée comme un ingrédient fermenté. Elle

contiendra la bactériocine mais également d'autres métabolites microbiens tels que l'acide lactique. La pédiocine, une bactériocine de classe IIa, est commercialisée sous cette forme sous le nom ALTA 2341. Des essais ont été récemment fait avec la lacticine 3147, un lantibiotique (**Galvez *et al*, 2007**).

Un autre mode d'application des bactériocines consiste en leur immobilisation sur les cellules productrices, dans des gels ou des films telle que l'alginate de calcium, la gélatine, la cellulose, les protéines de soja, des films de polysaccharides, etc. La bactériocine sera alors libérée dans le produit au cours de la conservation. Depuis peu, des emballages en polyéthylène ou d'autres films plastiques contenant des bactériocines ont été développés. Ces emballages permettent de réduire la croissance des microorganismes pathogènes ou indésirables pouvant se développer en surface durant la conservation du produit (**Luchansky *et al*, 2004; Ghalfi, 2006**).

3. Influence de la variation des milieux de cultures sur la production de bactériocine.

Un milieu de culture est un support qui permet la culture de cellules, de bactéries, de levures, de moisissures afin de permettre leur étude. En principe, les cellules trouvent dans ces milieux les composants indispensables pour leur multiplication en grand nombre, rapidement, mais aussi parfois des éléments qui permettront de privilégier un genre bactérien ou une famille. Ainsi, selon le but de la culture, il est possible de placer les micro-organismes dans des conditions optimales, ou tout à fait défavorables.

La croissance de cellules et la production de bactériocine par des bactéries lactiques sont fortement influencées par le carbone, les sources d'azote et les facteurs de croissance. Il est difficile de trouver les facteurs principaux et de les optimiser pour des processus de biotechnologie, comprenant plusieurs variables. Généralement, la méthode non statistique (OVAT) qui consiste à faire varier un facteur à la fois est utilisée par beaucoup de chercheurs pour l'optimisation des milieux de cultures (**Todorov et Dicks, 2004**).

1. Origine des souches utilisées

La souche de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* utilisée proviens de la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université de Bejaia. Elle a été conservée à -20°C dans du bouillon MRS à 20% de glycérol.

La souche cible qui a été utilisée est *Escherichia coli*, souche qui fait également parti de la collection du laboratoire, elle était conservée à 4°C sur gélose inclinée.

2. Revivification des souches

La revivification est faite par des repiquages successifs sur un milieu de culture approprié pour chaque souche: milieu MRS pour *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* et le bouillon nutritif pour *E. coli*, le tout est suivi d'une incubation à 37 °C pendant 24h.

3. Standardisation des inocula

La standardisation des inocula des souches est indispensable pour connaitre les différentes proportions des souches en culture.

La souche de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* estensemencée sur un milieu MRS dans une boîte de Pétri en utilisant un écouvillon. La boîte de Pétri est incubée a 37°C pendant 48h (**Fig.2**). Après incubation et obtention de colonie bien séparée, 20colonies ont été prélevé et mises dans 9ml d'eau physiologique stérile. Ceci est suivi par une série de dilution décimale allant jusqu'à 10^{-7} . Ensuite, 1ml a été prélevé etensemencé en masse sur une gélose MRS, 3 boîtes par dilution ont été utilisées. Enfin, les boîtes sont incubées pendant 24h à 37°C. Les boîtes ayant données entre 30 et 300 colonies seront utilisées pour calculer les différentes proportions des souches en culture.

Le même protocole a été suivi pour établir la standardisation de l'inoculum d'*E- coli*

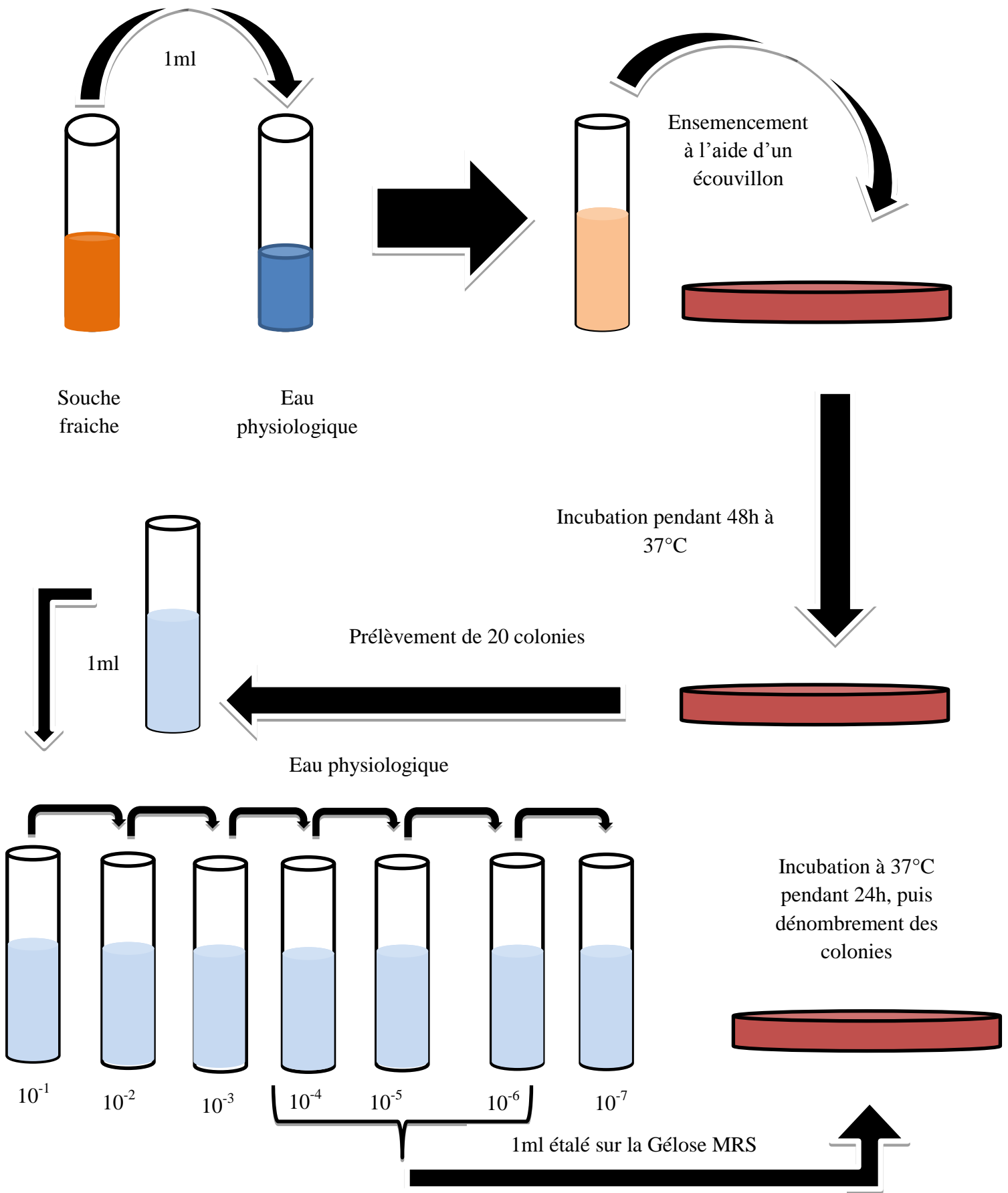


Figure 2 : Standardisation de l'inoculum des souches utiliser

4. Effet de la composition des différents milieux de culture utilisés sur l'activité antibactérienne

Pour étudier l'effet de la composition du milieu de culture sur l'activité antibactérienne de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*, plusieurs combinaisons contenant des concentrations différentes de certains ingrédients du milieu MRS ont été préparées comme suit :

4.1. Effet de l'extrait de viande

Afin de mettre en évidence l'effet de l'extrait de viande sur l'activité antibactérienne de *Lactobacillus paracasei*, 400 ml de milieu MRS sans extrait de viande ont été préparé et reparti dans 8 flacons de 50ml chacun. A ces derniers, des quantités d'extraits de viande correspondant à des concentrations allant de 0 à 8g /l ont été pesées et ajoutées à chacun des flacons tel qu'indiqué dans le Tableau I. Chaque combinaison est répartie dans cinq tubes de 10ml chacun pour pouvoir effectuer 5 essaies par combinaison.

Tableau I : Variation de l'extrait de viande

Volume du milieu MRS sans extrait de viande (ml)	Quantité d'extrait de viande ajouté (g)	Concentration finale d'extrait de viande (g/l)
50	0	0
	0.05	1
	0.10	2
	0.15	3
	0.20	4
	0.25	5
	0.30	6
	0.35	7
50 ml du témoin	0.40	8

4.2. Effet de l'extrait de levure

Pour étudier l'effet de l'extrait de levure sur l'activité antibactérienne de *Lactobacillus paracasei*, 200 ml de milieu MRS sans extrait de levure ont été préparé et reparti dans 4 flacons de 50ml chacun. A ces derniers, des quantités d'extraits de levure correspondant à des concentrations allant de 0 à 4g /l ont été pesées et ajoutées à chacun des flacons tel qu'indiqué dans le Tableau II. Chaque combinaison est répartie dans cinq tubes de 10ml chacun pour pouvoir effectuer 5 essais par combinaison.

Tableau II : Variation de l'extrait de levure

Volume du milieu MRS sans extrait de levure (ml)	Quantité d'extrait de levure ajouté (g)	Concentration finale d'extrait de viande (g/ml)
50	0	0
	0,05	1
	0,1	2
	0,15	3
50 ml du témoin	0.20	4

4.3. Effet du tween 80

L'étude de l'effet de tween 80 sur l'activité antibactérienne de *Lactobacillus paracasei* a été réalisée en préparant 50ml de milieu MRS standard auquel 1 ml de tween 80 a été ajouté. Le milieu ainsi préparé a été répartie dans 5 tubes de 10ml chacun.

4.4. Effet du chlorhydrate de cystéine

Dans le but d'étudier l'effet du chlorhydrate de cystéine sur l'activité antibactérienne de *Lactobacillus paracasei*, 50ml de milieu MRS standard ont été préparé, à ces derniers 0.025g de chlorhydrate de cystéine ont été ajouté. Le milieu ainsi préparé a été répartie dans 5 tubes de 10ml chacun.

5. Test de l'activité antibactérienne de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* à l'égard d'*E. coli*

L'effet des différents ingrédients sur l'activité antibactérienne de *Lactobacillus paracasei* est évalué en testant l'activité de cette souche à l'égard d'*E.coli*. Pour ce faire, les différentes combinaisons sont ensemencées chacune avec 1ml d'une culture fraîche de 18h de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* puis incubé à 37°C pendant 18h. Les cellules sont éliminées par centrifugation à 8000g pendant 15 min à 4°C.

L'activité antibactérienne du surnageant non concentré a été testé vis-à-vis d'*E.coli* par la méthode des puits (Fig.4).

Ainsi, une gélose Muller Hinton est ensemencée en surface par écouvillonnage avec une culture fraîche d'*E.coli* diluée à 1/10. Ensuite des puits de 9mm de diamètre et de 4mm de profondeur ont été creusés dans la gélose à l'aide d'un emboué stérile, puis 100µl du surnageant non concentré sont déposés dans chacun des puits. Les boîtes sont pré-incubées pendant 2heures à 4°C pour arrêter la croissance du germe cible et permettre la diffusion des agents inhibiteurs dans la gélose. Enfin les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24h.

Par la suite, le surnageant est concentré 7fois sous vide et son activité antibactérienne est testée à l'égard d'*E.coli* dans les mêmes conditions précédentes.

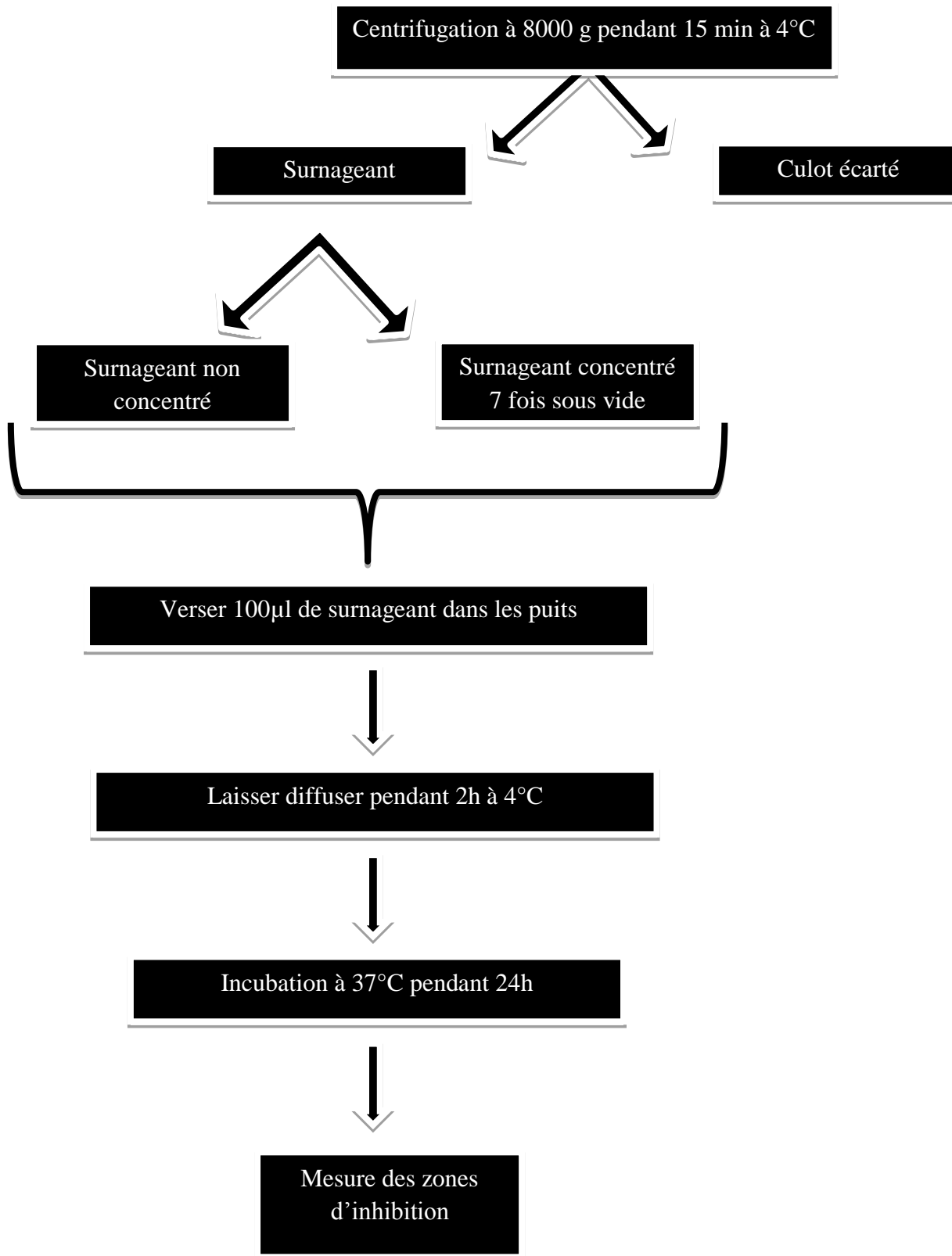


Figure 3 : Les étapes suivi pour réaliser le test d'activité antimicrobienne du surnageant de *Lactobacillus paracasei* par la méthode des puits

6. Calcul du nombre d'unités arbitraires

Les unités arbitraires sont déterminées comme suit :

1. Préparation des dilutions en cascade selon le protocole suivant :
 - Verser 200µl du surnageant concentré dans un eppendorf; y prélever 100µl et les mettre dans le premier puits.
 - Pour les 100µl restant, rajouter 100µl d'eau distillée, agiter le mélange. Prélever 100µl et déposer ces derniers dans le deuxième puits, (**Dilution 1/2**).
 - Rajouter 100µl d'eau distillée, au mélange restant de la dilution 1/2, agiter et prélever 100µl puis et déposer ces dernier dans le troisième puits, (**Dilution 1/4**).
 - Rajouter 100µl d'eau distillée, au mélange restant de la dilution 1/4, agiter et prélever 100µl et mettre ces derniers dans le quatrième puits, (**Dilution 1/8**).

 - Pour le cinquième puits, prendre 100µl du surnageant concentré, rajouter 200µl d'eau distillée et agiter. Prendre 100µl du mélange et mettre dans le cinquième puits, (**Dilution 1/3**).
 - Rajouter 100µl d'eau distillée, au mélange restant de la dilution 1/3, agiter et prélever 100µl et mettre ces derniers dans le sixième puits (**Dilution 1/6**).

2. Détermination du titre du surnagent

L'activité antibactérienne de toutes les dilutions obtenues est testée à l'égard d'*E.coli* par la méthode des puits. On considère que la dernière dilution qui donne une activité antimicrobienne contient une unité arbitraire de substance antibactérienne.

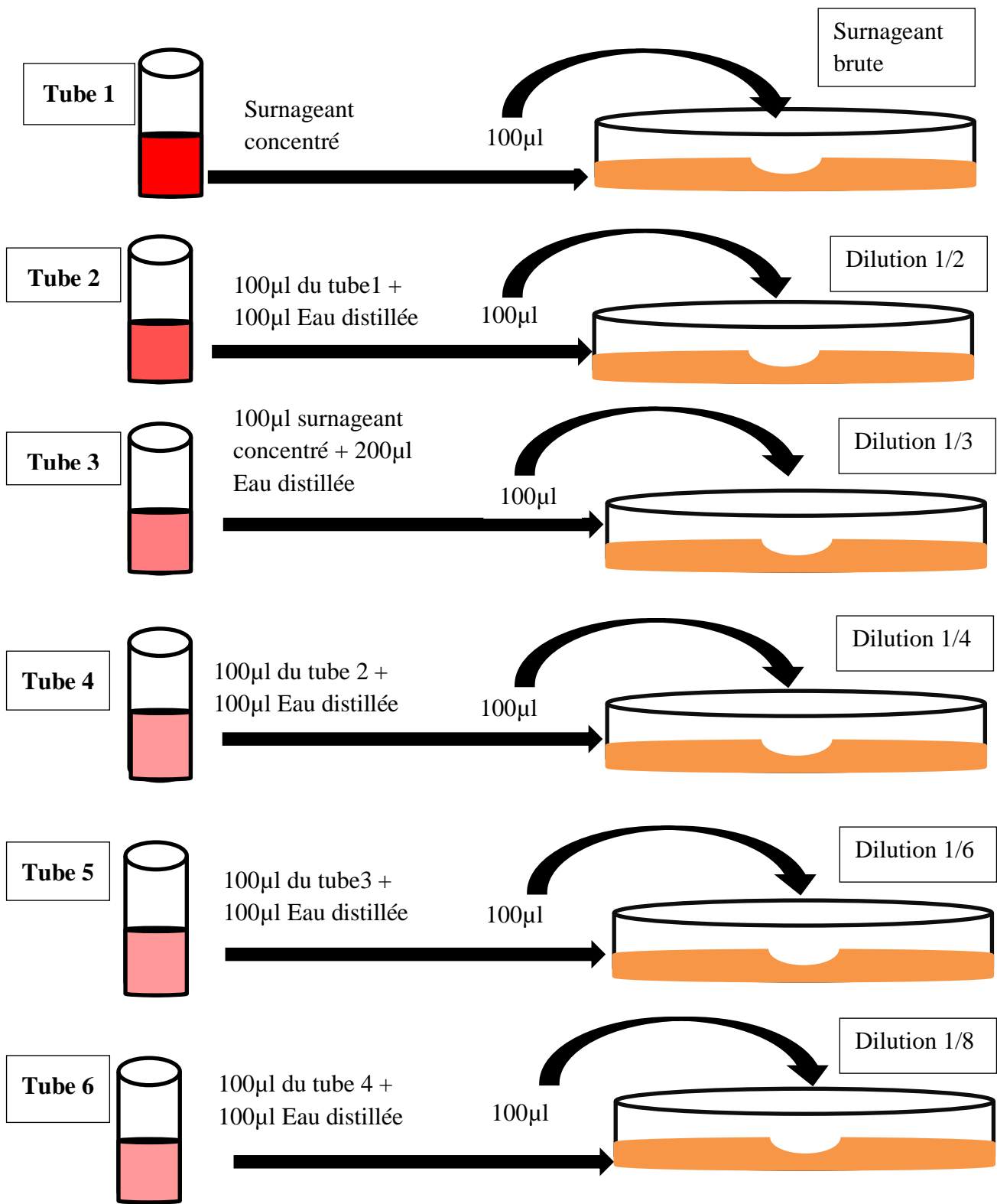


Figure 4 : Dilution en cascade du surnageant concentré

1. Test de l'activité antibactérienne de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* à l'égard d'*E. coli* avec le surnageant concentré.

Pour le milieu MRS Standard, le test d'activité du surnageant non concentré a donné des zones d'inhibition d'un diamètre de 15mm. Cependant, l'activité antibactérienne du surnageant non concentré des autres combinaisons était très faible ce qui rend difficile la mesure des diamètres des zones d'inhibitions. C'est pour cette raison que l'évaluation de l'effet antibactérien de la composition du milieu de culture sur l'activité antibactérienne de *Lactobacillus paracasei* est effectuée seulement avec le surnageant concentré.

2. Effet de la composition du milieu de culture sur l'activité antibactérienne de *Lactobacillus paracasei* avec le surnageant concentré

2.1.MRS Standard

Le test d'activité du surnageant du milieu MRS Standard a révélé des zones d'inhibitions de diamètres ayant une moyenne de 24,9mm et 40 UA/ml (Fig.5 et Tableau III).

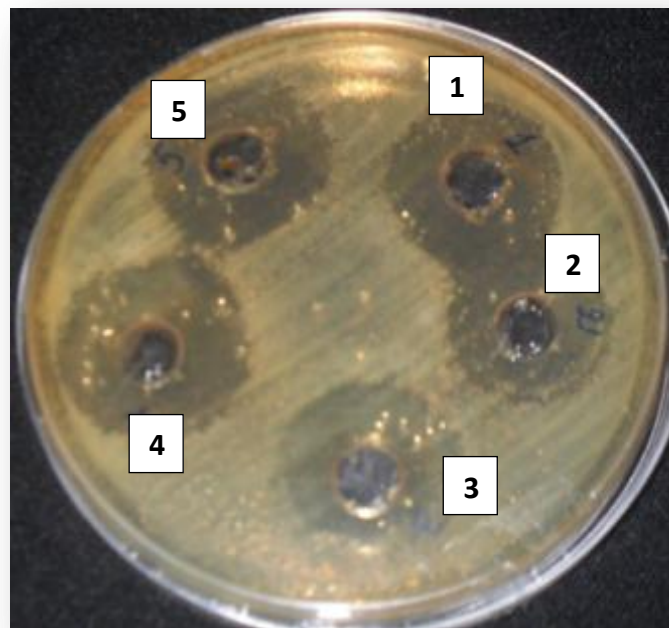


Figure 5 : Zones d'inhibitions du surnageant concentré sur milieu MRS Standard obtenues avec les cinq essais (Temoin).

Tableau III : Moyenne des Diamètres des zones d'inhibitions et nombre d'unités arbitraires du milieu MRS Standard.

Tube	Diamètre des zones d'inhibition	Unités arbitraires par millilitre (UA/ml)
1	25	40
2	24	40
3	24	40
4	26	40
5	25, 5	40
Moyenne	24,9	40

L'apparition des zones d'inhibitions peut être justifiée par l'effet des substances antibactériennes produites par *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle ainsi que des substances de nature protéique comme les bactériocines (Loso , 2007).

2.2.Effet de l'extrait de viande

Le teste d'activité du surnageant du milieu MRS Standard additionné d'extrait de viande a révélé des zones d'inhibitions de moyenne de diamètres allant de 12,7 mm à 24,9 mm selon les concentrations (Fig.6).

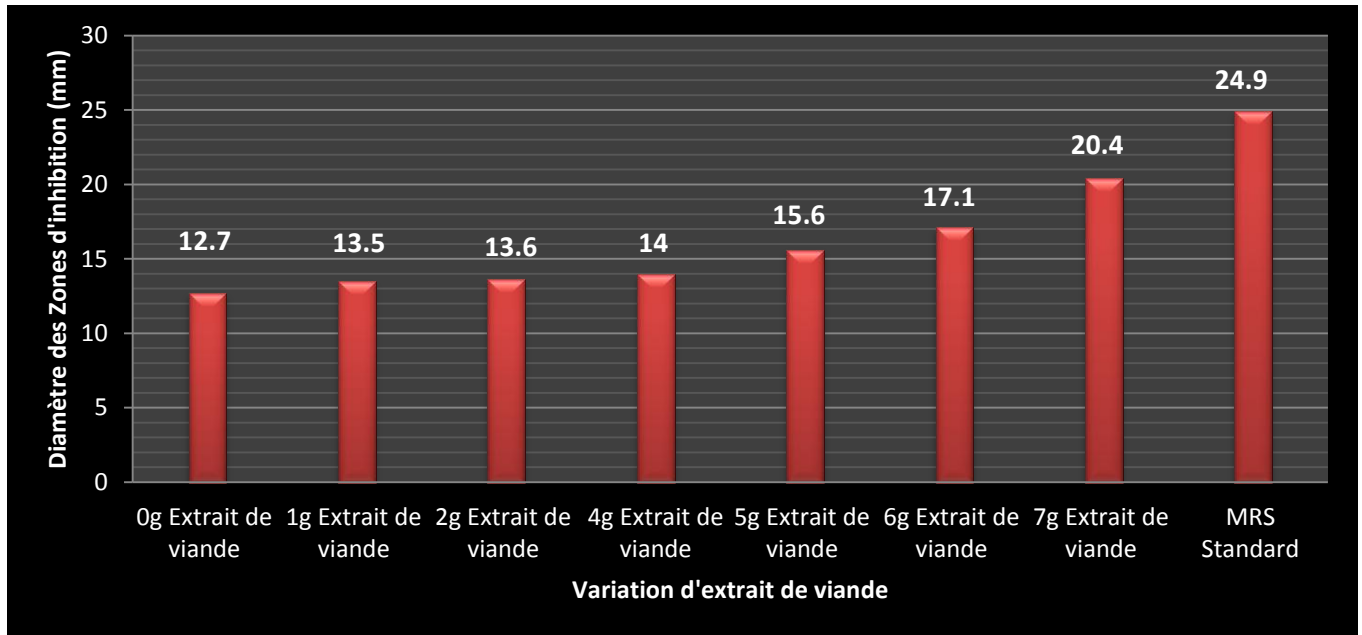


Figure 6 : Effet de la concentration d'extrait de viande sur les diamètres des zones d'inhibitions.

Le milieu MRS Standard additionné d'extrait de viande a montré des unités arbitraires de moyenne allant de 20 à 40 UA/ml en fonction de la concentration de cet ingrédient (Fig.7).

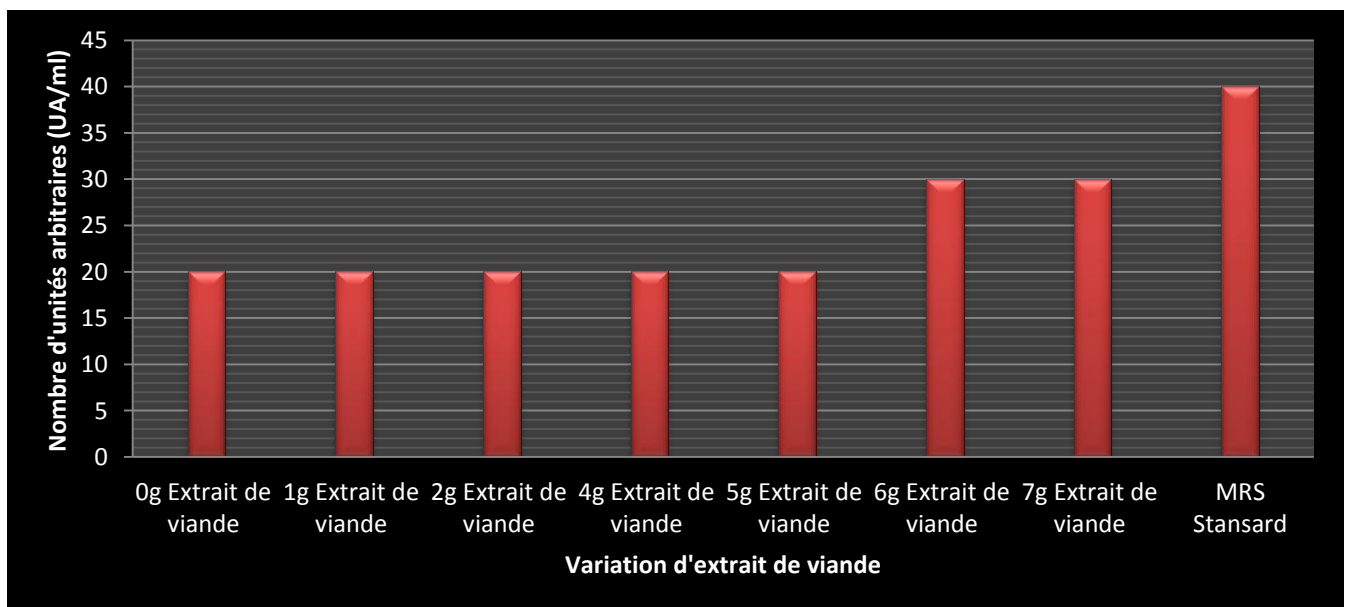


Figure 7 : Effet de la concentration d'extrait de viande sur le nombre d'unités arbitraires.

D'après les résultats obtenus, l'activité antimicrobienne, exprimée en diamètres des zones d'inhibitions et nombres d'unités arbitraires varient en fonction de la concentration de

l'extrait de viande dans le milieu MRS. Ainsi, plus la quantité en extrait de viande augmente plus l'activité antimicrobienne est élevée. Par conséquent, entre 0 g/l et 5 g/l d'extrait de viande on remarque que l'activité antibactérienne n'a pas changé, une augmentation de cette dernière a été observée à partir de 6 g/l. Ainsi la quantité minimum d'extrait de viande qui permet d'augmenter l'activité antibactérienne est de 6 g/l.

2.3. Effet de l'extrait de levure

Le test d'activité du surnageant du milieu MRS Standard contenant de l'extrait de levure a révélé des zones d'inhibitions de moyenne de diamètres allant de 13,2 à 24,9 mm selon les concentrations (Fig.8)

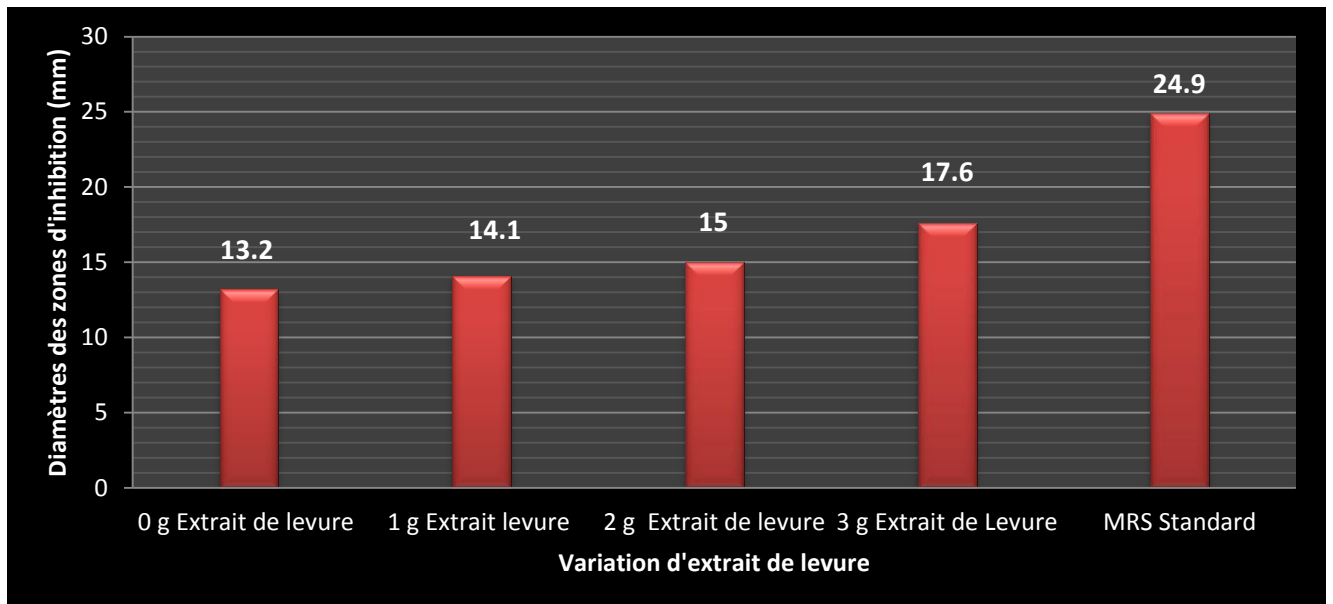


Figure 8 : Effet de la concentration d'extrait de levure sur les diamètres des zones d'inhibitions.

Le milieu MRS Standard additionné d'extrait de levure a montré des unités arbitraires de moyenne allant de 20 à 40 UA/ml selon la concentration du composant (Fig.9).

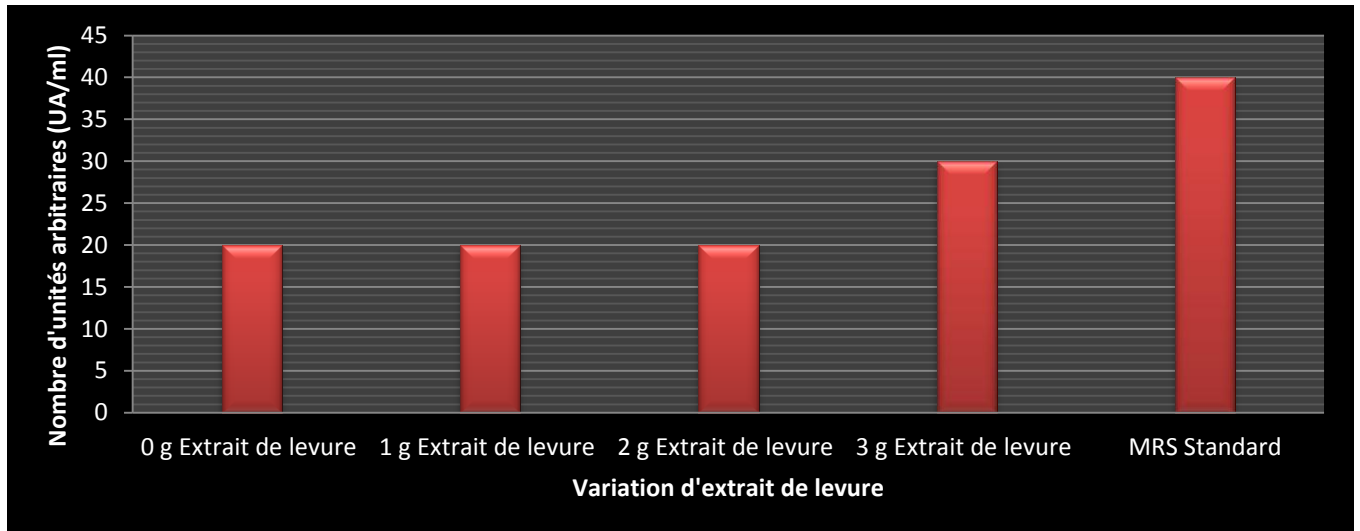


Figure 9 : Effet de la concentration d'extrait de levure sur le nombre d'unités arbitraires.

Les résultats obtenus, montrent que l'activité antimicrobienne de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* à l'égard de *E. coli* augmente en fonction de la concentration d'extrait de levure. Ainsi, on observe que l'activité antibactérienne n'a pas changé entre 0 g/l et 2 g/l, une augmentation est observée à partir de 3 g/l. Donc, la quantité minimum d'extrait de levure qui permet d'augmenter l'activité antibactérienne est de 3 g/l.

Ces résultats se concordent avec les travaux de **Todorov et Dicks (2004)** qui ont rapporté que l'augmentation de l'extrait de viande et de l'extrait de levure a un effet positif sur la production de substance antibactérienne.

D'une manière générale, en microbiologie l'extrait de viande et l'extrait de levure entrent dans la composition de la majorité des milieux de culture usuels. Les milieux obtenus sont riches en glucides, sels minéraux et surtout en composés azotés issus de l'hydrolyse des protéines: peptides, acides aminés, vitamines. L'extrait de viande et l'extrait de levure sont employés dans des milieux pour cultiver des micro-organismes, le plus souvent des bactéries, qui ne peuvent pas synthétiser ces composés organiques à partir d'éléments simples. Ceci justifie l'augmentation proportionnelle de l'activité antibactérienne en fonction de l'augmentation de la quantité en extrait de viande et de levure.

2.4.Effet du Tween 80

Le test d'activité du surnageant du milieu MRS Standard additionné de tween 80 a montré de très petites zones d'inhibitions de diamètre 10,5mm de moyenne, comparé au milieu MRS standard qui a révélé plus que le double soit 24,9mm. Le milieu a donné une moyenne de 10 unités arbitraires par millilitre (Fig.10).

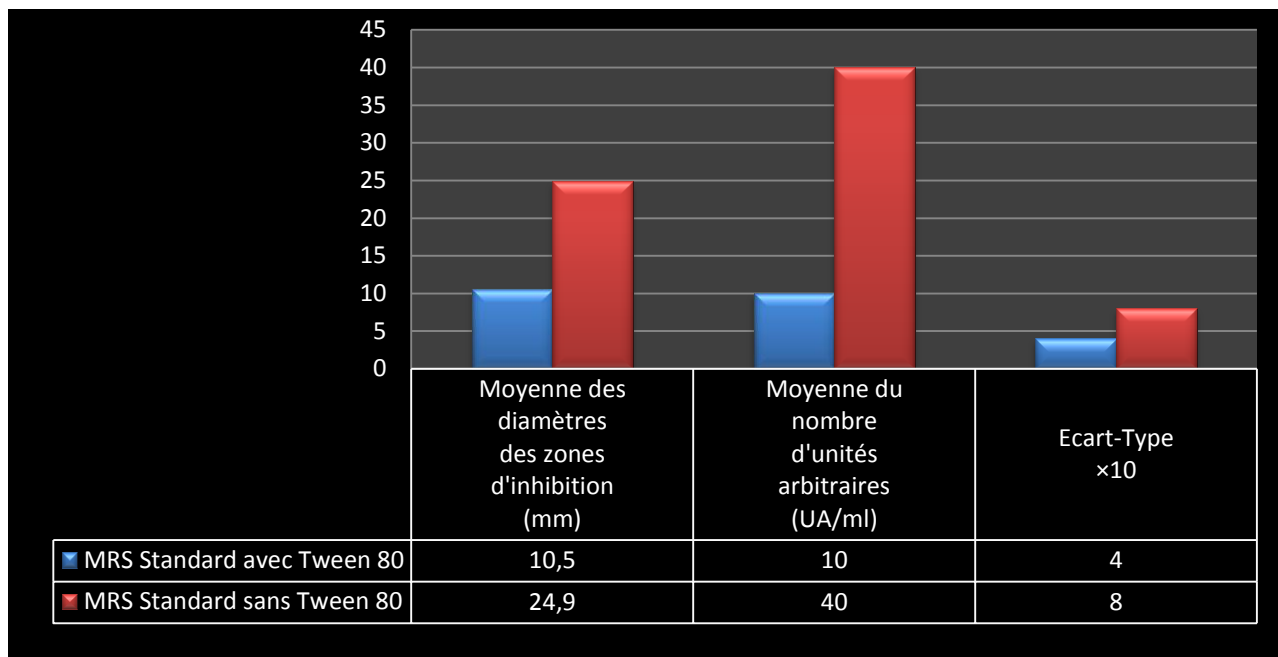


Figure 10 : Effet du Tween 80.

Le Tween 80, mélange d'ester de polyéthylène sorbitol et d'acide oléique, est une source d'acides gras nécessaires à la croissance des germes. Cependant, il paraît que ce composé diminue l'activité antibactérienne de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*. En fait, d'après **Todorov et Dick (2004)**, le tween 80 inhibe l'adhésion des bactériocines aux cellules cibles et diminuera de ce fait l'activité antibactérienne de plus de 50%.

2.5.Effet du chlorhydrate de cystéine

Le test d'activité du surnageant du milieu MRS Standard contenant du chlorhydrate de cystéine a révélé des zones d'inhibitions de moyenne de 19,7mm de diamètre. Ce milieu MRS a donné une moyenne de 30 unités arbitraires par millilitre (Fig.11).

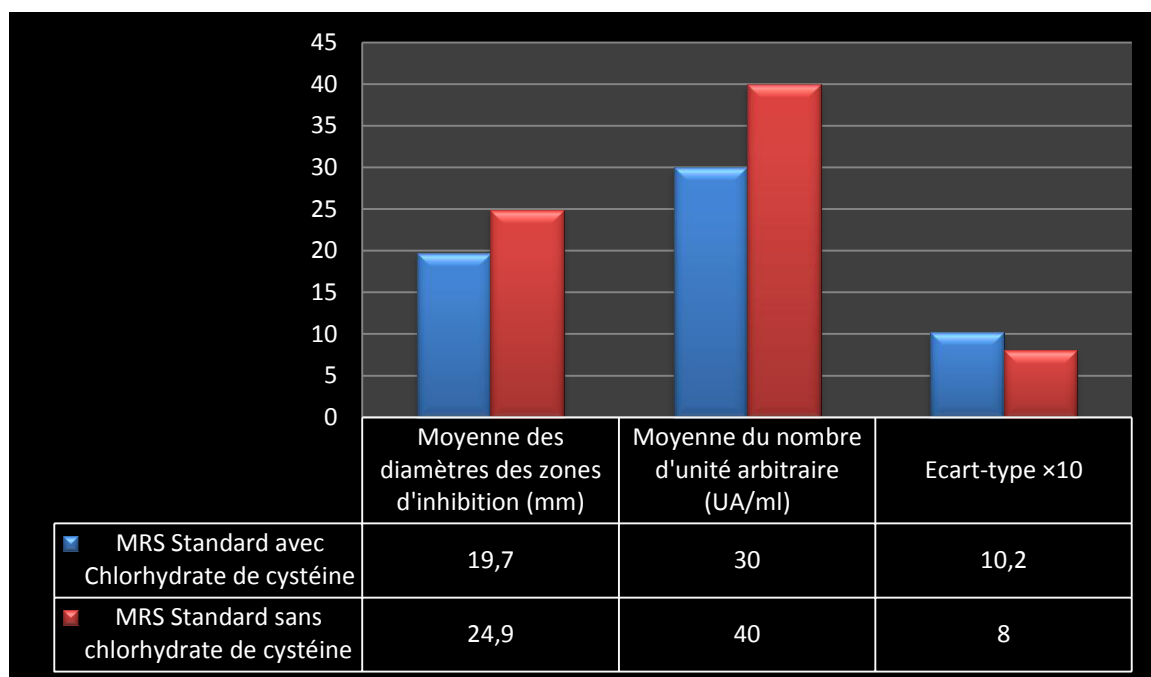


Figure 11 : Effet du chlorhydrate de cystéine.

Le Chlorhydrate de cystéine est un agent réducteur, son rôle est d'absorbé l'oxygène du milieu afin de créer l'anaérobiose. Selon les résultats obtenus, il semble que l'addition de chlorhydrate de cystéine n'améliore pas la production de substance antibactérienne par *Lactobacillus paracasei*.

Conclusion

L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet des composants du milieu MRS sur l'activité antimicrobienne de *Lactobacillus paracasei* à l'égard d'*E.coli* afin de pouvoir améliorer ce milieu et d'en créer si possible un autre qui contiendrait des quantités qui permettraient d'améliorer la production des différents agents antimicrobiens.

Les résultats obtenus ont montré que la taille des zones d'inhibitions et le nombre d'unités arbitraires varient en fonction de la quantité de l'extrait de viande, extrait de levure, chlorhydrate de cystéine et tween 80. D'après nos résultats, l'activité antimicrobienne de *Lactobacillus paracasei* à l'égard d'*E. coli* est fortement influencée par la concentration en extrait de viande ; elle passe de 20 UA à 0 g/l d'extrait de viande à 40 UA à 8 g/l de ce dernier. La concentration minimale d'extrait de viande qui permet d'augmenter l'activité antibactérienne est de 6 g/l. L'extrait de levure, influence lui aussi l'activité antibactérienne de *Lactobacillus paracasei*, le nombre d'unités arbitraires obtenues à différentes concentrations de cet ingrédient passe de 20 UA à 40 UA correspondant à 0 g/l et 4g/l respectivement. La quantité minimale en extrait de levure permettant d'augmenter l'activité antibactérienne est de 3 g/l.

Cependant il semble que le tween 80 et le chlorhydrate de cystéine diminuent l'activité de *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* comparé au milieu MRS standard.

Notre travail reste préliminaire pour en tirer une conclusion définitive.

D'autres études pourraient être effectuées tel que :

- L'étude de l'effet des concentrations en extraits de levure et en extraits de viande supérieures à celles du milieu MRS Standard sur l'activité antibactérienne.
- Il serait aussi intéressant d'étudier la variation des autres composants du milieu MRS tel que le glucose, la peptone et les vitamines sur l'activité antibactérienne de *Lactobacillus paracasei*.

Références bibliographiques

B

- **Bernardeau M. et Vernoux J-P.** (2009). Utilisation des probiotiques en alimentation porcine et avicole. 9ème journée des productions porcines et avicoles. www.cra.wallonie.be
- **Biokar.** (2009). www.biokar-diagnostics.fr
- **Bourgeois C. M. et Larpent J. P.** (1996). Microbiologie alimentaire. Aliments fermentés et fermentation alimentaire. Ed. TEC&DOC. ; 4-32

C

- **Cenatiempo Y., Robichon D., Gouin E., Debarbouille M., Cossart P., Héchard Y.** (1996). The rpoN (sigma54) gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. J. Bacteriol.; 179, 7591-7594.
- **Clot J.** (1994). Le rôle de certains probiotiques sur la flore intestinale et l'immunité. Quel enjeu pour la nutrition de demain. Immunité de la muqueuse intestinale. Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Saint-Éloi, Montpellier, Medec. ; 20-22.
- **Collins M. D., Rodrigues U. et Ash C.** (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacilles* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiol. Lett.; 77: 5-12.

- **Collins M. D., Samelis J. et Mextapoulos J.** (1993). Taxonomic studies of some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Microbiol.*; 75 : 595-603.
- **Collins M. D., Phillips B. A. et Zanoni P.** (1989). Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacilles casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov. subsp. *paracasei* and subsp *tolerans*, and *Lactobacilles rhamnosus* sp. nov, comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*; 39 : 105-8.

D

- **Dal Bello F., Walter J., Hammes W.P. et Hertel C.** (2003). Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition, *Microbiol. Ecol.*; 45, 455–463.
- **Dal Bello F. et Hertel C.** (2006). Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli. Institute of Food Technology, University of Hohenheim, Garbenstr. 28, D-70599 Stuttgart, Germany. *Syst. Appl. Microbiol.* ; 29, 69–76
- **Daviau F.** interpretation des essai de puits. Les methods nouvelles. Publication de l'institut francais du pettrole. centre d'etudes superieures de developpement et d'exploitation des gisements. ecol national superieur du petrol et des moteurs
- **Dellaglio F. E., Felis G. E. et Torriani S.** (2002). The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al 1989. Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*; 52, 285-287.
- **Deegan L. H., Cotter P. D., Hill C. et Ross P.** (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* ; 16, 1058-1071.
- **Denis F., Ploy M. C., Marti C., Bengen E. et Quentin R.** (2007). Bactériologie médicale : techniques usuelles. (Eds.), Elsevier Masson,; 105-108.

- **Dias, R. S., Bambirra, E. A., Silva, M. E., and Nicoli, J. R.** (1995) Protective effect of *Saccharomyces boulardii* against the cholera toxin in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*; 28, 323-325.
- **Dicks L.M.T., Duplessis M., Dellaglio F., et Lauer E.** (1996). Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zae*, designation of ATCC 334 as the neotype of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*; 46:337–340.
- **Dilmi-Bouras A., Koïche M. et Tabti M.** (2007). The effect of *Lactobacillus paracasei* on the rabbit's cholesterolemia. *Laboratoire de Microbiologie, Institut d'Agronomie, Université H. B. Chlef. African J. Biotechnol.*; 6 (24), 2840-2845
- **Dortu C.** (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques. Caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Env.* ; 13, 143-154.
- **Drider D.** (2006). The continuing story of class Iia bacteriocin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; 70(2), 564-582.

E

- **Eijsink V. G.** (1998). Comparative studies of class Iia bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* ; 64(9), 3275-3281.
- **Euzéby J. P.** (2006). *Lactobacilles ingluviei*.
<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ll/ingluviei.html>

F

- **FAO/OMS.** (2002). Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes.
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398f.pdf>
- **Fimland G.** (2000). A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.*; 182, 2643-2648.

G

- **Galvez A., Abriouel H., Lopez RL. et Ben Omar N.** (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* ; 120 (12), 51-70.
- **Gbassi G. K.** (2010). Aspect physicochimique de l'encapsulation et de la désencapsulation des probiotiques. Thèse de doctorat en chimie. Ecole doctorale des sciences chimiques. Université de Strasbourg.;31
- **Ghali H.** (2006). Bacteriocin activity by *L. curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4 degrees C storage. *J. Food Protect.*; 69, 1066-1071.
- **Gomes, A. et Malcata, F. X.** (1999). *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus* biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Tech.*; 10, 139–157.
- **Gueimonde M., Delgado S., Mayo B., Ruas-Madiedo P., Margolles A. et Reyes-Gavilan CG.** (2004). Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research Int.*; 37, 839–850.

- **Guinane C. M., Cotter P. D., Hill C. et Ross P.** (2005). A review: microbial solutions to microbial problems; *Lactococcal* bacteriocins for the control of undesirable biota of food. *J. Appl. Microbiol.* ; 98, 1316-1325
- **Guiraud J. et Galzy P.** (2003). L'analyse microbiologique dans les industries agroalimentaires. Edition Dunod masson ho ; 669-671.

H

- **Hammes W. P. et Vogel R. F.** (1995). The genus *Lactobacillus*. In: Wood BJB, Holzappel WH, editors. The lactic acid bacteria. The genera of lactic acid bacteria. London: Blackie Academic & Professional; (2)20-54.
- **Holzappel, W. H. et Schillinger U.** (2002). Introduction to pre- and probiotics. *Food research int.*; 35: 109-116.

K

- **Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. et Reuter, G.** (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*; 41, 103–125.

L

- **Lopez S. et Mayo B.** (1997). Identification and characterization of homofermentative mesophilic *Lactobacillus* strains isolated from artisan starter-free cheeses. *Lett Appl Microbiol.*; 25 , 233-8.
- **Loso A.** (2007). Chemical Composition and Antibacterial Activity Against Oral Bacteria by the Essential Oil of *Artemisia iwayomogi*. *Journal of Bacteriology* and

Virology. **37**(3), 129 – 136.

- **Luchansky J. B. et Call J. E.** (2004). Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *L. monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. *J. Food Prot.*; **67**, 1017-1021.
- **Lynch C. M., Muir D. D., Banks J. M., Mc Sweeney P. L. H., et Fox P. F.**(1999). Influence of Adjunct Cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar Cheese Ripening. *J.Dairy Sci.*; 8-15.

M

- **Magnusson, J., Schnurer, J.**, (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *App. Env. Microbiol.* ; **67**, 1–5.
- **Makhloufi.** (2012). Caractérisation d'une bactériocine d'une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. These de doctorat université de Pierre et Marie Curie. ; 3-86.
- **Marteau Ph., Pochart Ph., Bouhnik Y., Rambaud J-C.** (1994) Écologie microbienne, Survie et effets de Lactobacilles acidophiles et Bifidobactéries des produits laitiers fermentés dans le tube digestif de l'homme. *Cah. Nutr. Diet.* ; **29**, 6.
- **Marteau P., Rambaud J-C.** (1998). Probiotiques en gastroentérologie. *Hépatogastro.* 71-75.
- **Mcauliffe O. et Hill C.** (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*; **25**, 285-308.

- **Montel M. C., Larouture C. et Masson F.** (1997). Incidence des bactéries lactiques sur la flaveur des produits carnés fermentés. dans : Actes du Colloque LACTIC 97. Les bactéries lactiques. Caen : ADRIA Normandie.;197-212.
- **Morrisset D.** (2003). Etude des relations structure/fonction d'une bactériocine anti-listeria, la mesenterocine Y105. Thèse de doctorat en Aspect Moléculaire et Cellulaires de la Biologie. Université de Poitier.; 209.

N

- **Nes I. F. et Holo H.** (2000). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. J. Bacteriol.; 189, 1189-1198.
- **Nigutova K.** (2007). Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enterolysin A homologues among ruminal Gram+ cocci. J. Appl. Microbiol.; 102(2), 563-569.
- **Nilsen T., Nes I.F. et Holo H.** (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. Appl. Environ. Microbiol.; 69(5), 2975-2984.
- **Nissen-Meyer J., and Nes I.** (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. Arch. Microbiol. ; 167: 67-77.

P

- **Papagianni M.** (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. Biotechnol. Adv.; 21(6), 465-499.

R

- **Rambaud J-C.** (1994) Écologie microbienne, Survie et effets de Lactobacilles acidophiles et Bifidobactéries des produits laitiers fermentés dans le tube digestif de l'homme. Cah. Nutr. Diet. ; 29, 6.
- **Richard C.** (2006). Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class Iia bacteriocins. Food Microbiol., 23(2), 175-183.

S

- **Saad N.** (2010). Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacilles plantarum* 299 avec l'hôte : approche in vitro. Thèse de doctorat en science alimentaire. Université de limoges. ; 9.
- **Supuková A., Árvayová M., Supuka P., Rozumykova N., Brandeburová A.** (2010). International Scientific Conference on Gastro-Intestinal. Microbial. Ecol. ; 9-11.
- **Swearingen P. A., O'Sullivan D. J., Warthesen J. J.** (2001). Isolation, characterization, and influence of native, nonstarter lactic acidbacteria on Cheddar cheese quality. J. Dairy Sci. ; 84 : 50-9.

T

- **Tailliez P.** (2004). Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. Thèse de doctorat en biologie. Institut National de la Recherche Agronomique, Unité d'Écologie et de Physiologie du Système Digestif. ; 45-55.
- **Tindall B. J.,** (2008). The type strain of *Lactobacillus casei*, the name of *Lactobacillus paracasei* and its subsp. names are not rejected and the revival of the

name '*Lactobacillus zeae*' contrives Rules 51b (1) and (2) of the International Code of Nomenclature of Bacteria. Opinion 82. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.; 58, 1764-1765.

- **Thi L. N., Champagne C. P., Lee B. H. et Goulet J.** (2003). Growth of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* on tofu whey. Int. J. Food Microbiol. ; 89, 67–75.
- **Thage B. V., Broe M. L., Petersen M. H., Petersen M. A., Bennedsen M., Ardö Y.** (2004). Aroma development in semi-hard reduced-fat cheese inoculated with *Lactobacillus paracasei* strains with different aminotransferase profiles. Int. Dairy J.;15, 95–805.
- **Todorov S.D. et Dicks L. M. T.** (2004). Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. Department of Microbiology. World J. Microbiol. Biotechnol.; 20: 643–650, 2004.
- **Todorov S. D. et Dicks L. M. T.** (2005). Growth parameters influencing the production of *Lactobacillus rhamnosus bacteriocine* ST461BZ. Departement of microbiology, University of Stellenbosh. South Africa. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398f.pdf>
- **Twomey D., Ryan M., Meaney B. et Hill C.** (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure,function and applications. Antonie van Leeuwenhoek ; 82, 165-185.

W

- **Walter P. H. et Hertel C.** (2009). Bergy's Manual of systematic Bacteriology, (The firmicutes). Second edition. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York. ; 3,465-511.

- **Ward L. J. et Timmins M. J.** (1999). Differentiation of *Lactobacillus casei* , *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Let. Appl. microbiol.*; 29, 90–92.
- **Wijaya A., Neudeker C., Holzapfel W. et Franz C.** (2006). Influence of bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* BFE 1071 on *Lactobacillus* spp. in the rat gastrointestinal tract. In: *Proceedings of Food Micro.* University of Bologna, Bologna, Italy. ; 124-130.

Annexe I : Principales voies de fermentation des sucres chez les bactéries lactiques

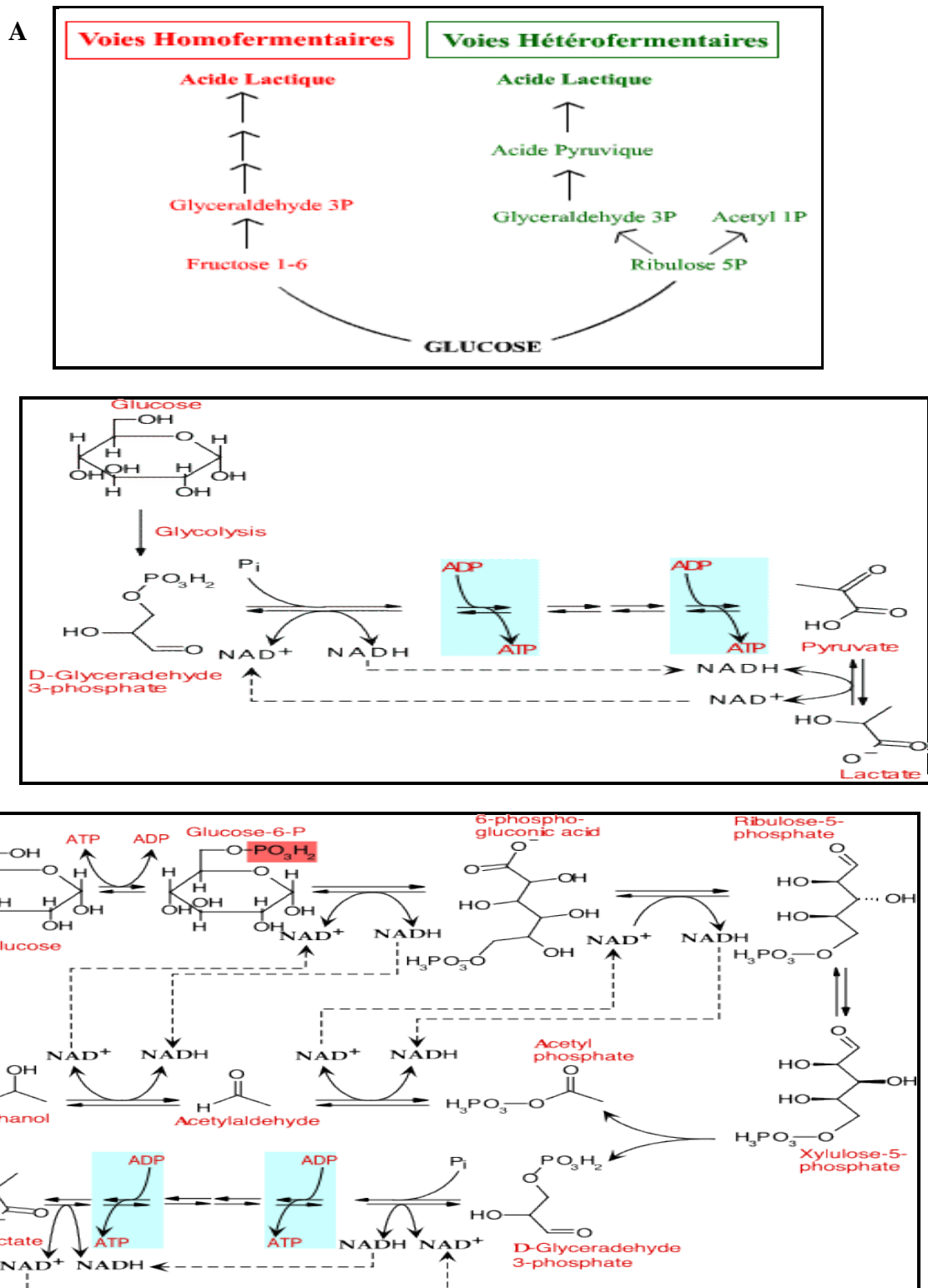


Figure 1 : Principales voies de fermentation des sucres chez les bactéries lactiques, (<http://membres.multimania.fr/neb5000/BacteriologieI/Groupes%20Bacteriens/Batonne%20Gram-positifs%20non%20sporulants%20reguliers.htm>)

A : Comparaison entre la voie homofermentaire et heterofermentaire

B : Voie homofermentaire

C : Voie heterofermentaire

Annexe II : Voies d'Emden meyerhof

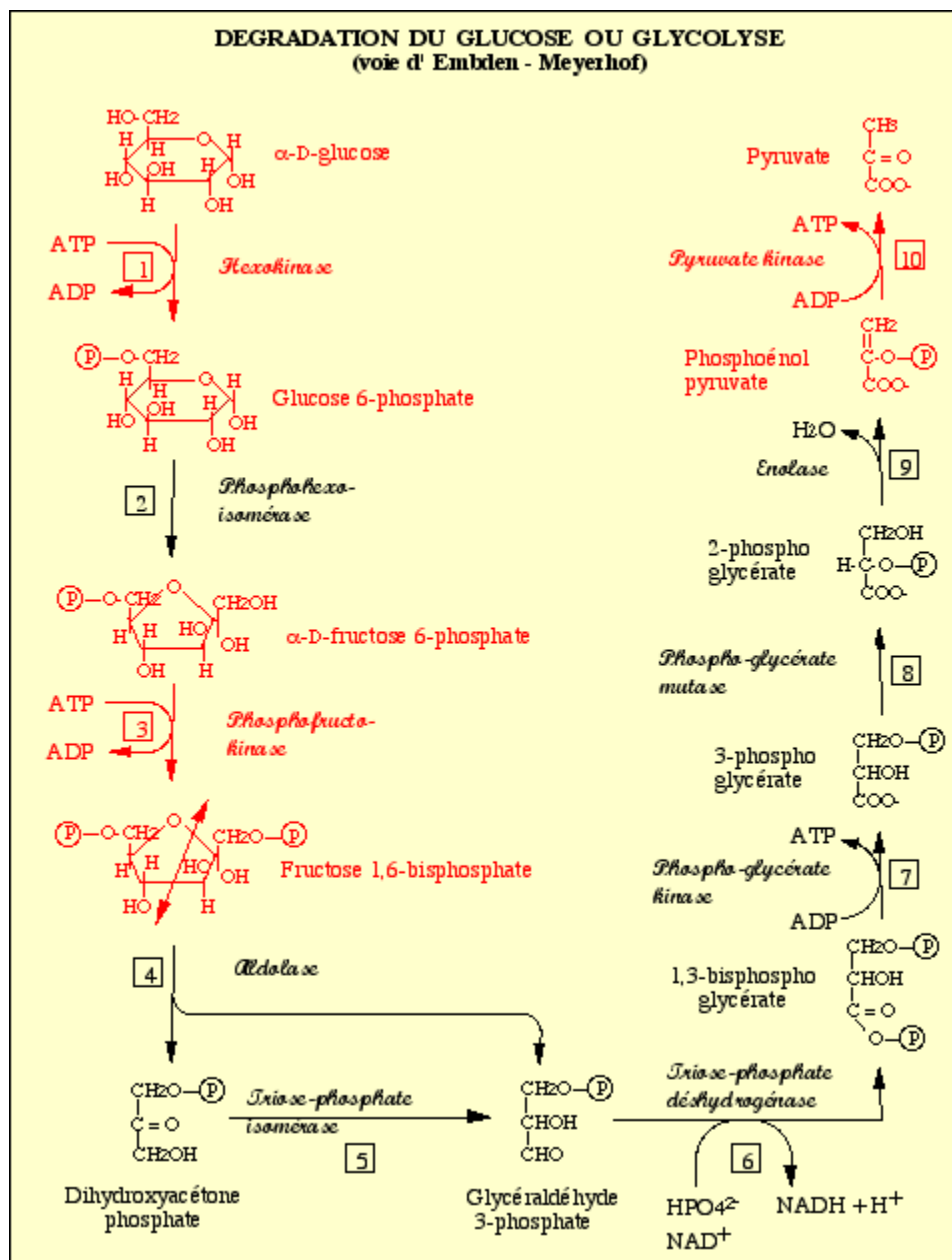


Figure 2 : Les réactions de la glycolyse. Cours de Biochimie 2. Chapitre II : Biochimie Métabolique, http://fr.wikibooks.org/wiki/Les_principales_voies_du_m%C3%A9tabolisme#La_cha.C3.AEne_respiratoire)

Annexe III : Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress : rôle de la barrière épithéliale colique

Tableau I : Quelques souches probiotiques commerciales utilisées en santé humaine (Belgnaoui Afifa AIT, 2006)

Souches	Producteur	Produits	Allégations	Références
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Valio Dairy (Finlande)	Yaourts à boire Yaourts à boire Compléments alimentaires	Prévention des allergies Traitement des allergies Stimulation de la production d'IL-10 Diminution de l'incidence des diarrhées Diminution des diarrhées à rotavirus	(Kalliomaki <i>et al.</i> , 2003) (Majamaa and Isolauri, 1997) (Pessi <i>et al.</i> , 2000) (Vanderhoof <i>et al.</i> , 1999) (Majamaa <i>et al.</i> , 1995)
<i>Lactobacillus johnsoni</i> La1 (Lj1)	Nestlé (Suisse)	Yaourts à boire Yaourts	Inhibition du développement de <i>Helicobacter pylori</i> Stimulation de l'activité phagocytaire	(Michetti <i>et al.</i> , 1999) (Schiffrin <i>et al.</i> , 1997)
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult (Japon)	Laits fermentés Yaourts Formules infantiles Compléments alimentaires	Diminution des diarrhées infantiles Facilite la digestion de lactose	(Nagao <i>et al.</i> , 2000) (Marteau <i>et al.</i> , 2001b)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Rodhia (Etats-Unis)	Laits fermentés Yaourts Formule infantiles Capsule	Diminution des diarrhées infantiles Facilite la digestion du lactose	(Sanders and Klaenhammer, 2000)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	ProViva (Suède)	Jus de fruits	Prévention des maladies cardiovasculaires	(Naruszewicz <i>et al.</i> , 2002)
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114001	Danone (France)	Yaourts à boire	Stimulation de la production d'IgA Diminution de l'incidence des diarrhées	(Faure <i>et al.</i> , 2001) (Pedone <i>et al.</i> , 2000)
<i>Lactobacillus casei</i> Bb12	Chr. Hansen (Etat-Unis)	Formules infantiles	Stimulation de la production d'IgA Diminution de l'eczema atopique Stimulation de l'activité phagocytaire Stimulation de la croissance des bébés Modulation de la composition de la flore Prévention des diarrhées à rotavirus	(Fukushima <i>et al.</i> , 1998) (Isolauri <i>et al.</i> , 2000) (Schiffrin <i>et al.</i> , 1997) (Nopchinda <i>et al.</i> , 2002) (Kirjavainen <i>et al.</i> , 2002) (Saavedra <i>et al.</i> , 1994)
VSL#3 (mélanges de 7 souches) <i>L. casei</i> ; <i>L. plantarum</i> ; <i>L. acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> ; <i>B. longum</i> ; <i>B. breve</i> ; <i>B. infantis</i> ; <i>S. thermophilus</i>	CSL (Italie)	Compléments alimentaires	Prévention de la pouchite Prévention des rechutes de pouchite	(Gionchetti <i>et al.</i> , 2003) (Gionchetti <i>et al.</i> , 2000)

Annexe IV: Différentes espèces du genre *Lactobacillus* (Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage OFEFP Berne, 2003)

LACTOBACILLUS

Lactobacillus acetotolerans

Lactobacillus acidophilus

Lactobacillus agilis

Lactobacillus alimentarius

Lactobacillus amylolyticus

Lactobacillus amylophilus

Lactobacillus amylovorus

Lactobacillus animalis

Lactobacillus aviarius subsp. *araffinosus*

Lactobacillus aviarius subsp. *aviarius*

Lactobacillus bavaricus - syn.: *Lactobacillus sake*

Lactobacillus bif fermentans

Lactobacillus brevis

Lactobacillus buchneri

Lactobacillus bulgaricus → *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Lactobacillus carnis - syn.: *Carnobacterium piscicola*

Lactobacillus casei

Lactobacillus casei subsp. *alactosus* → *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

Lactobacillus casei subsp. *pseudopantarum* → *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

Lactobacillus casei subsp. *rhamnosus* → *Lactobacillus rhamnosus*

Lactobacillus casei subsp. *tolerans*

Lactobacillus paracasei subsp. *tolerans*

Lactobacillus catenaformis

Lactobacillus cellobiosus

Lactobacillus collinoides

Lactobacillus confusus

Lactobacillus coryniformis

Lactobacillus coryniformis subsp. *coryniformis*

Lactobacillus coryniformis subsp. *torquens*

Lactobacillus crispatus

Lactobacillus curvatus

Lactobacillus curvatus subsp. *curvatus*
Lactobacillus curvatus subsp. *melibiosus*
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*
(*Lactobacillus bulgaricus*)
Lactobacillus delbrueckii subsp. *delbrueckii*
Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis*
(*Lactobacillus lactis*)
Lactobacillus divergens → *Carnobacterium divergens*
Lactobacillus farciminis
Lactobacillus fermentum
Lactobacillus fructivorans
Lactobacillus fructosus
Lactobacillus gallinarum
Lactobacillus gasseri
Lactobacillus graminis
Lactobacillus halotolerans → *Weissella halotolerans*
Lactobacillus hamsteri
Lactobacillus helveticus
Lactobacillus heterohiochii - syn.: *Lactobacillus*
fructivorans
Lactobacillus hilgardii
Lactobacillus homohiochii
Lactobacillus iners
Lactobacillus intestinalis
Lactobacillus jensenii
Lactobacillus johnsonii
Lactobacillus kandleri → *Weissella kandleri*
Lactobacillus kefir
Lactobacillus kefiranoferiens
Lactobacillus kefirgranum
Lactobacillus kunkeei
Lactobacillus lactis → *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*
Lactobacillus leichmannii
Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis*

Lactobacillus lindneri
Lactobacillus malefermentans
Lactobacillus mali
Lactobacillus maltaromicus
Lactobacillus manihotivorans
Lactobacillus minor → *Weissella minor*
Lactobacillus minutus → *Atopobium minutum*
Lactobacillus murinus
Lactobacillus oris
Lactobacillus panis
Lactobacillus parabuchneri
Lactobacillus paracasei
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei*
(*Lactobacillus casei* subsp. *alactosus*;
Lactobacillus casei subsp. *pseudoplanatarum*)
Lactobacillus paracasei subsp. *tolerans*
(*Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*)
Lactobacillus parakefiri
Lactobacillus paralimentarius
Lactobacillus paraplantarum
Lactobacillus pentosus
Lactobacillus piscicola → *Carnobacterium piscicola*
Lactobacillus plantarum
Lactobacillus pontis
Lactobacillus reuteri
Lactobacillus rhamnosus (*Lactobacillus casei*
subsp. *rhamnosus*)
Lactobacillus rimae → *Atopobium rimae*
Lactobacillus rogosae
Lactobacillus ruminis
Lactobacillus sakei
Lactobacillus sakei subsp. *carnosus*
Lactobacillus sakei subsp. *sakei*
Lactobacillus salivarius

Lactobacillus salivarius subsp. *salicinius*

Lactobacillus salivarius subsp. *salivarius*

Lactobacillus sanfranciscensis

Lactobacillus sharpeae

Lactobacillus suebicus

Lactobacillus trichodes - syn.: *Lactobacillus fructivorans*

Lactobacillus uli

Lactobacillus vaccinostercus

Lactobacillus vaginalis

Lactobacillus viridescens → *Weissella viridescens*

Lactobacillus vitulinus

Lactobacillus xylosus - syn.: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Lactobacillus yamanashiensis - syn.: *Lactobacillus mali*

Lactobacillus zeae

Annexe V: Composition des milieux de culture (Guiraud, 2003)

Tableau II: Bouillon MRS (pH=6.5)

Composition	Quantité g/l
Glucose	20
peptone	10
Extrait de viande	8
Acétate de Sodium	5
Extrait de levure	4
Phosphate dipotassique	2
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	0.2
Sulfate de manganèse	0.05

- Bouillon MRS avec Tween 80

Pour le bouillon MRS avec Tween 80, rajoutez à la composition du bouillon MRS 1 ml/l de Tween 80.

- Bouillon MRS avec le chlorhydrate de cystéine

Pour le bouillon MRS avec le chlorhydrate de cystéine, rajoutez à la composition du bouillon MRS 0.5 g/l de chlorhydrate de cystéine.

Tableau III: Variation de l'extrait de viande dans le bouillon MRS

Pour la variation de l'extrait de viande, rajoutez au milieu MRS standard sans extrait de viande des quantités de ce dernier suivant le tableau ci-dessous :

	Quantité à rajouter g/l						
Extrait de viande	-	1g	2g	4g	5g	6g	7g

Tableau IV: Variation de l'extrait de levure dans le bouillon MRS

Pour la variation de l'extrait de levure, rajoutez au milieu MRS standard sans extrait de levure des quantités de ce dernier suivant le tableau ci-dessous :

	Quantité à rajouter g/l			
Extrait de levure	-	1g	2g	3g

Tableau V: Gélose Muller Hinton (pH=7.3)

Composition	Quantité g/l
Extrait de viande	3
Hydrolysate acide de caséine	17.5
Amidon	1.5
Agar	16

Tableau VI: Bouillon nutritif (pH=7.2)

Composition	Quantité g/l
Peptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5

Tableau VII: Diamètres des zones d'inhibitions et nombre d'unités arbitraires du surnagent concentré dans le milieu MRS Standard additionné de différentes concentrations d'extrait de viande.

Quantité d'extrait de viande ajoutée (g)																
Tube	0		1		2		4		5		6		7		8	
	D (mm)	UA	D (mm)	UA	D (mm)	UA	D (mm)	UA	D (mm)	UA	D (mm)	UA	D (mm)	UA	D (mm)	U A
1	12	20	14,5	20	13	20	14	20	16	20	17,5	30	18	30	25	40
2	13	20	13,5	20	13	20	14,5	20	15	20	17	30	17	30	24	40
3	13	20	13,5	20	14	20	14,5	20	15	20	17	30	17	30	24	40
4	13	20	14	20	14	20	14	20	16	20	17	30	18	30	26	40
5	12,5	20	12	20	14	20	14	20	16	20	17	30	18	30	25,5	40
Moy	12,7	20	13,5	20	13,6	20	14	20	15,6	20	17,1	30	20,4	30	24,9	40

Moy= Moyenne

UA/ml= Nombre d'unités arbitraires par milliliter

Tableau VIII: Diamètres des zones d'inhibitions et nombre d'unités arbitraires du surnagent concentré dans le milieu MRS Standard additionné de différentes concentrations d'extrait de viande.

Quantité d'extrait de levure ajoutée (g)										
Tube	0		1		2		3		4	
	D (mm)	UA	D (mm)	UA	D (mm)	UA	D (mm)	UA	D (mm)	UA
1	13	20	14	20	15	20	17	30	25	30
2	13,5	20	14	20	15	20	17	30	24	30
3	13	20	14	20	15	20	18,5	30	24	30
4	13	20	14,5	20	15	20	17	30	26	30
5	13,5	20	14	20	15	20	18,5	30	25,5	30
Moyenne	13,2	20	14,1	20	15	20	17,6	30	24,9	30

UA/ml: Nombre d'unités arbitraires par millilitre

Annexe VI : Figure des différentes zones d'inhibitions obtenues



Figure 3: Zones d'inhibitions du surnageant non concentré sur milieu MRS Standard observées dans les 5 tubes.

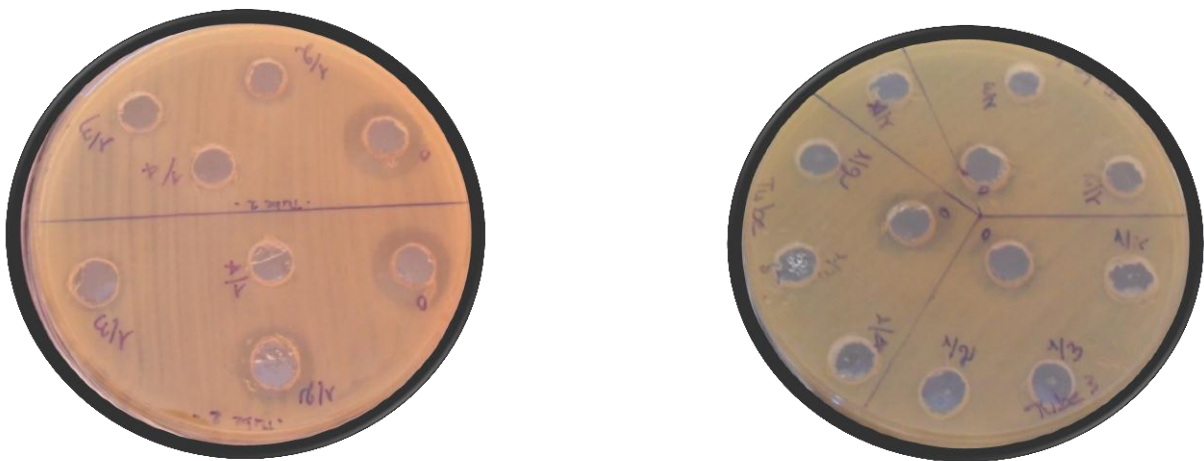


Figure 4 : Zones d'inhibitions du surnageant non concentré sur milieu MRS Standard additionné de tween 80 observées dans les 5 tubes.



Figure 5 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard contenant du chlorhydrate de cysteine observées dans les 5 tubes.

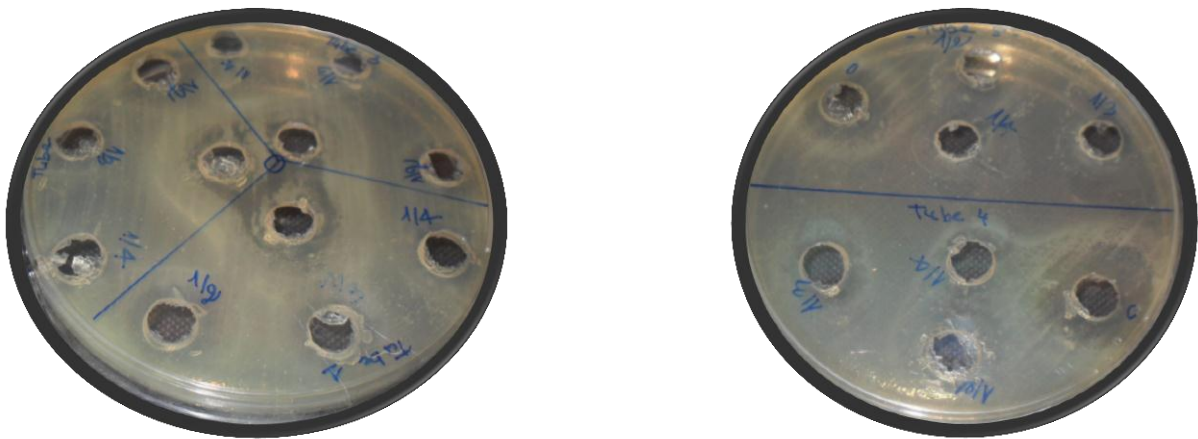


Figure 6 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard ne contenant pas d'Extrait de viande observées dans les 5 tubes.

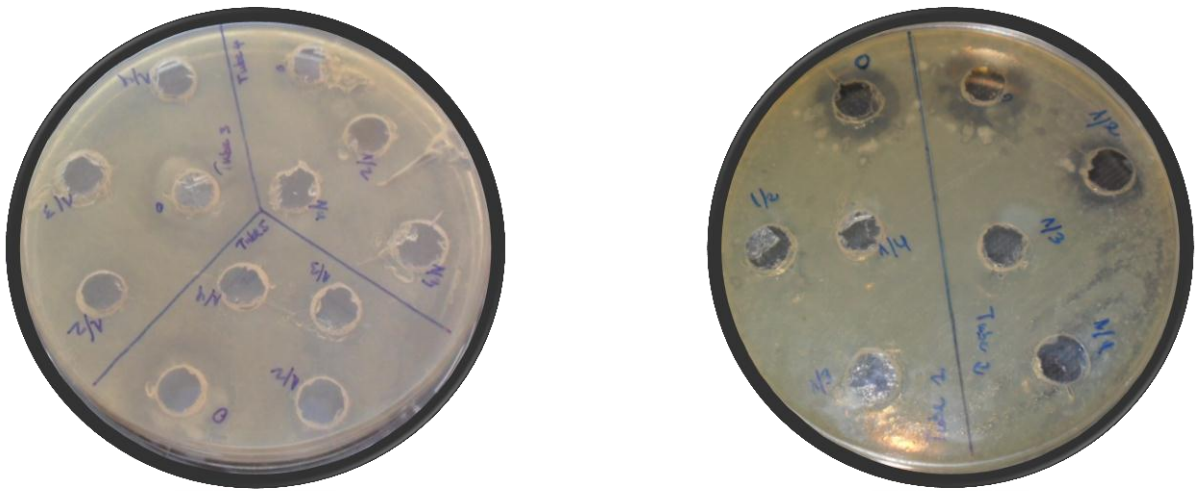


Figure 7 : Zones d'inhibitions du surnageant non concentré sur milieu MRS Standard contenant 1 g d'Extrait de viande observées dans les 5 tubes.



Figure 8 : Zones d'inhibitions du surnageant non concentré sur milieu MRS Standard contenant 2g d'Extrait de viande observées dans les 5 tubes.

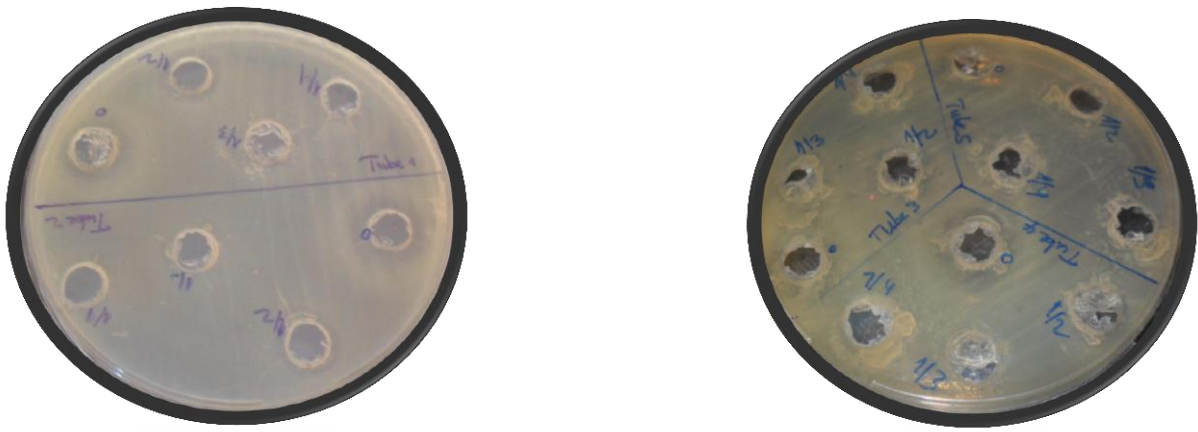


Figure 9 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard contenant 4g d'Extrait de viande observées dans les 5 tubes.

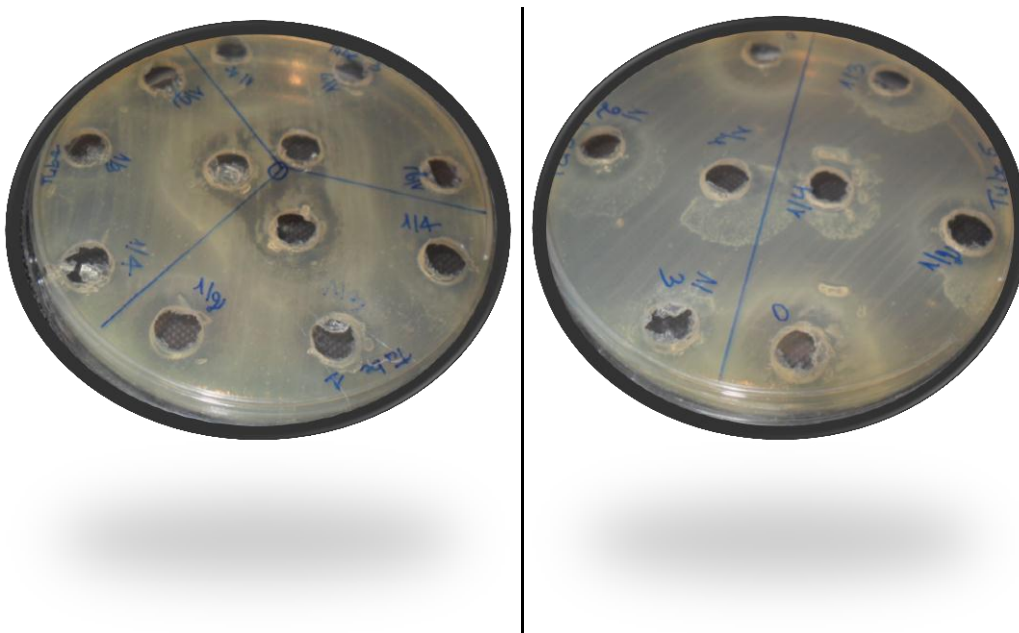


Figure 10 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard contenant 5 g d'Extrait de viande observées dans les 5 tubes.



Figure 11 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard plus 6 g d'Extrait de viande observées dans les 5 tubes.

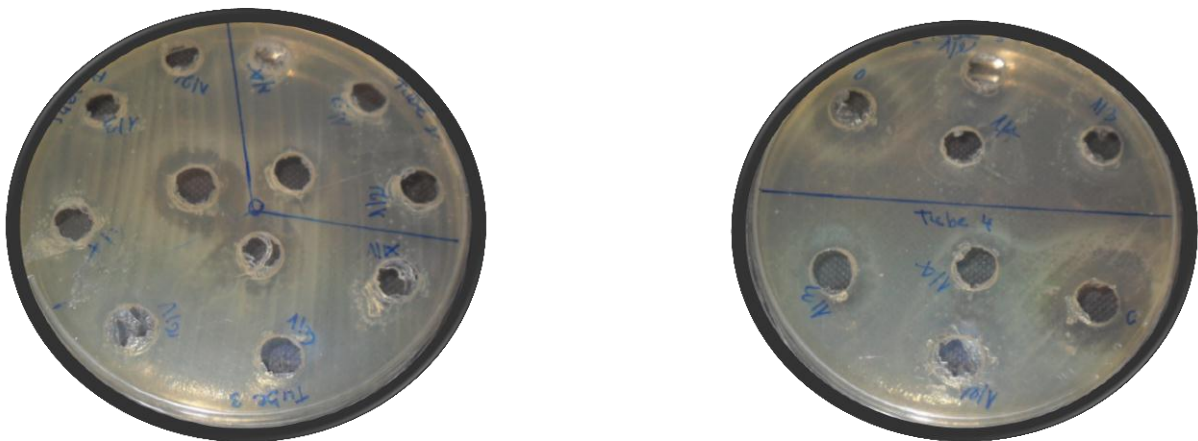


Figure 12 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard plus 7 g d'Extrait de viande observées dans les 5 tubes.

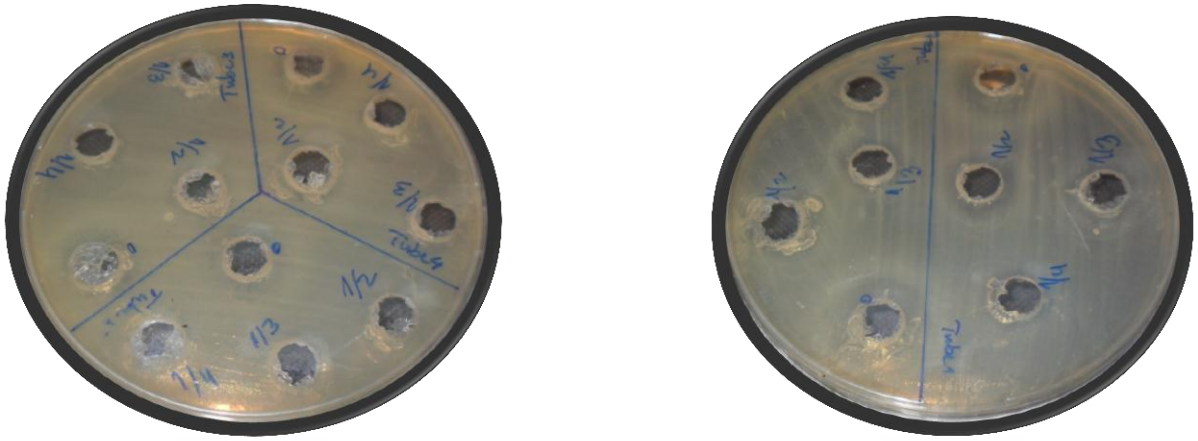


Figure 13 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard ne contenant pas d'Extrait de levure observées dans les 5 tubes.

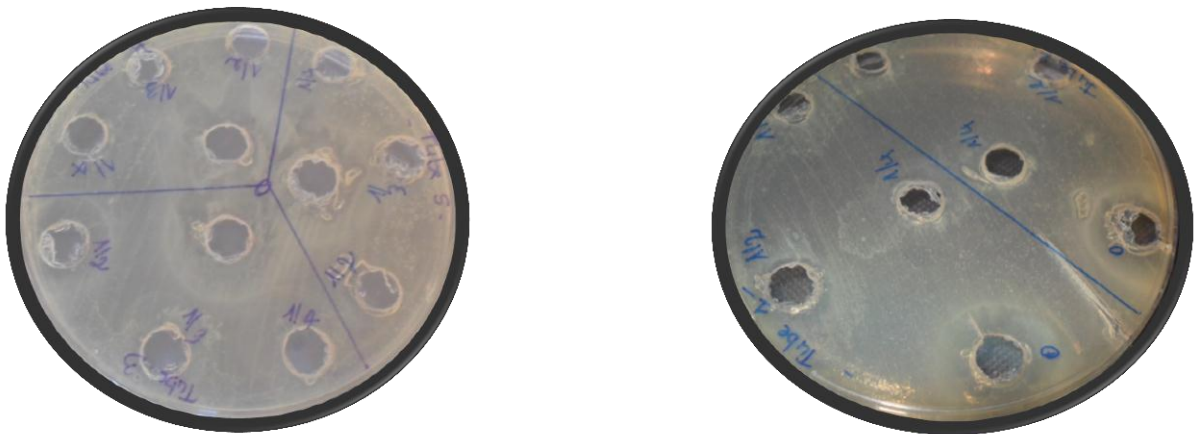


Figure 14 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard additionné de 1 g d'Extrait de levure observées dans les 5 tubes.

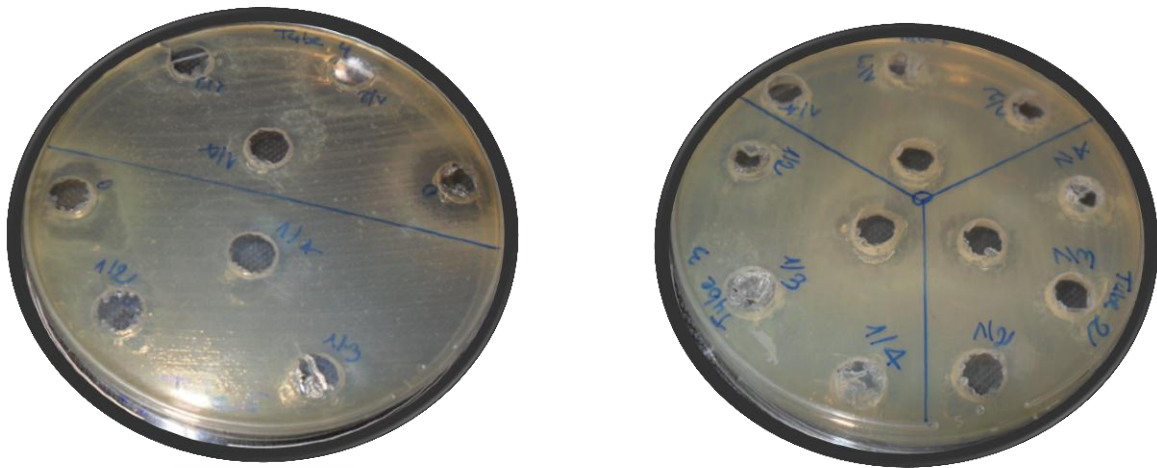


Figure 15 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard additioné de 2 g d'Extrait de levure observées dans les 5 tubes.

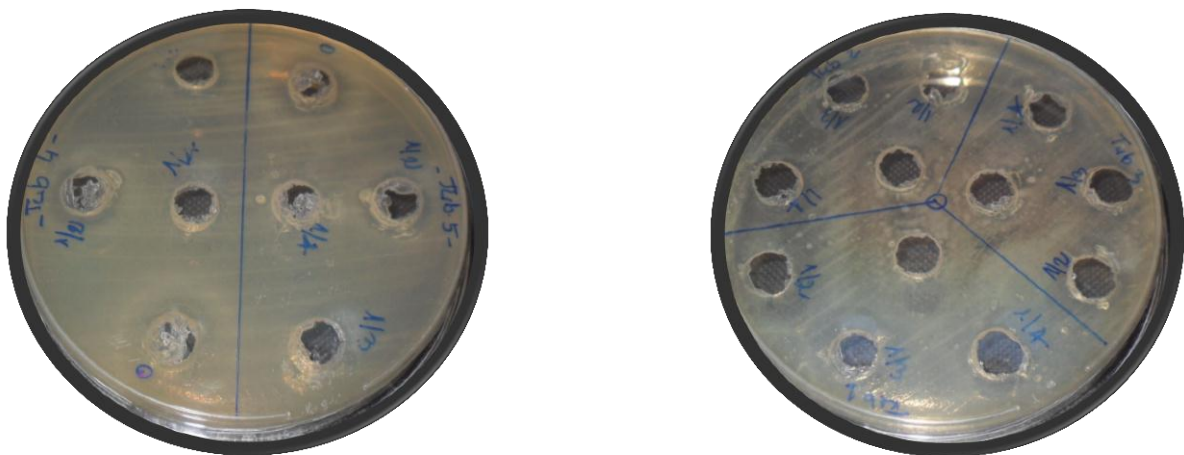


Figure 16 : Zones d'inhibitions du surnagent non concentré sur milieu MRS Standard contenant 3 g d'Extrait de levure observées dans les 5 tubes.

Résumé

Les agents antimicrobiens produits par les bactéries lactiques jouent un rôle important en industrie agro-alimentaire et pharmaceutique.

Dans le but d'optimiser leurs productions nous avons varié différents composant du milieu MRS. Une souche probiotique de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* a été utilisée dans cette optique pour l'inhibition de la croissance de l'espèce *Escherichia coli*.

Mots clés : *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, probiotiques, activité antimicrobienne.

Abstract

Antimicrobial substances produced by lactic bacteria play an important role in agro alimentary and pharmaceutical industries.

For optimizing their production, we varied different components of MRS medium. A probiotic strain of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* was used in this optic for the inhibition of the growth of *Escherichia coli*.

Keywords: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, probiotics, antimicrobial activity.