

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة حسيبة بن بوعلي - الشلف -
Université Hassiba BEN BOUALI - Chlef-
كلية العلوم الزراعية و العلوم البيولوجية
Faculté des Sciences Agronomiques et Des Sciences Biologiques

MEMOIRE

En vue de l'obtention du **Diplôme de Magister** en

Sciences alimentaires

Présenté par : M^{me} Tabti Meriem

Effet de *Lactococcus lactis* locales sur des bactéries pathogènes impliquées dans la pathologie digestive *in vitro*

Soutenu le, 29 octobre 2008

Devant le jury d'examen :

Président : M^r LABBACI A.

Maître de conférences (UHB Chlef)

Promoteur : M^r DILMI BOURAS A.

Professeur (UHB Chlef)

Co-promotrice : Mme ALLEM R..

Maître de conférences (UHB Chlef)

Examineurs :

M^r BENSÄÏD A.

Maître de conférences (UHB Chlef)

Mme MAMECHE-DOUMANDJI A.

Maître de conférences (USD Blida)

DEDICACES

*A ma très chère petite fille
Amira*

*A mon cher époux
Abdelkader*

*A toute ma famille en particulier
Abdelfattah et Imadeddine*

*A mes très chères amies
Koïche M., Meziane M. et Meziane M.*

MERJEM

Remerciements

Je tiens à adresser, mon respect et mes vifs remerciements à toutes les personnes ayant apporté leur contribution, de près ou de loin à mon travail de recherche.

J'adresse ma reconnaissance et mes plus sincères remerciements à mon promoteur, Monsieur Dilmi Bouras A., Professeur à l'université Hassiba Benbouali de Chlef, pour ses conseils scientifiques judicieux, et l'aide qu'il m'a apporté dans la réalisation de ce travail et surtout pour ses qualités humaines.

Mes chaleureux remerciements s'adressent à ma co-promotrice, Madame Allem R., Maître de conférence à l'université Hassiba Benbouali de Chlef, pour ses encouragements, sa disponibilité exceptionnelle, son inquiétude et l'aide qu'elle m'a apporté durant toute la période de réalisation de ce travail.

Je remercie également Monsieur Labbaci A., Maître de conférence à l'université Hassiba Benbouali de Chlef, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury et pour avoir bien voulu lire ce mémoire et faire part de ses remarques.

Mes plus sincères remerciements vont également à Monsieur Bensaïd A., Maître de conférence à l'université Hassiba Benbouali de Chlef, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail.

Mes remerciements les plus respectueux vont également à Madame Mameche-Doumandji A., Maître de conférence à l'université Saad Dahleb de Blida, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail; qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect et de ma profonde gratitude.

L'aide de mes collègues de travail a été grandement appréciée:

Je remercie beaucoup Monsieur Bradaï A., Maître assistant à l'université Hassiba Benbouali de Chlef, pour sa disponibilité et son aide exceptionnelle qu'il m'a apporté lors de la rédaction de ce mémoire, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance .

Un remerciement très particulier à mon amie et sœur M^{elle} Koïche M. Chargée de cours à l'université Hassiba Benbouali de Chlef, pour ses encouragements, ses conseils, son soutien morale et pour tout ce qu'elle m'a apporté tout au long de la réalisation de ce travail.

Je remercie vivement ma chère amie, M^{elle} Meziane M. Maître assistante à l'université Hassiba Benbouali de Chlef, pour sa gentillesse et son aide efficace durant la période de l'expérimentation.

J'aimerais en terminant remercier ma famille, mes amis et mes nombreux autres collègues de travail pour leurs soutien et encouragements.

TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX EN ANNEXE

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

I / PHYSIOLOGIE DU TUBE DIGESTIF	3
1 / Système digestif.....	3
2 / Flore intestinale.....	3
2.1/ Répartition topographique de la flore digestive.....	3
2.2/ Composition classique d'une flore intestinale humaine.....	4
2.3/ Rôles de la flore intestinale humaine	4
a) – Effets digestifs.....	4
b) – Effets nutritionnels.....	5
c)- Protection contre l'infection.....	5
3 / Les maladies bactériennes des voies digestives inférieures	6
3.1/ L'intoxication alimentaire par les staphylocoques	6
3.2/ La gastroentérite à <i>Clostridium perfringens</i>	7
3.3/ La Salmonellose : gastroentérite à <i>Salmonella</i>	8
3.4 / La gastroentérite à <i>Escherichia coli</i>	9
3.5/ Les infections à <i>Citrobacter</i>	10
3.6/ Les infections à <i>Hélicobacter pylori</i>	11
3.6.1/ Principaux caractères.....	12
3.6.2 Voies de transmission.....	12
3.6.3 / Pouvoir pathogène d' <i>Hélicobacter pylori</i>	13
3.6.4/ Inefficacité du système immunitaire	13
3.6.5 Endommagement de la muqueuse gastrique.....	14
II/ BACTERIES LACTIQUES ET PROBIOTIQUES	15
1/ Bactéries lactiques.....	15

2 / Les lactocoques : Streptocoques lactiques mésophiles.....	16
2.1/ Principaux caractères.....	16
2.2/ Classification et nomenclature.....	16
2.3/ Habitat.....	18
2.4/ Exigences nutritionnelles	18
3 / Effets probiotiques des bactéries lactiques	20
3.1/ Probiotiques	20
3.2 / Microorganismes probiotiques	20
3.3/ Effets des probiotiques sur la santé	22

III / EFFETS ANTIMICROBIENS DES BACTERIES LACTIQUES. 25

1/ Antagonisme microbien.....	25
2 / Activité antimicrobienne des bactéries lactiques.....	26
2.1/ Production d'acides organiques	26
2.2/ Formation du peroxyde d'hydrogène.....	27
2.3/ Action de diacétyle	28
2 4/ Production de bactériocines.....	28
2.4.1/ Classement des bactériocines.....	29
2.4.2/ Caractéristiques biochimiques des bactériocines de <i>Lactococcus lactis</i> ..	30
2.4.3/ Caractéristiques des déterminants génétiques	31
2.4.4/ Mode d'action	32
2.4.5/ Facteurs influençant la production de bactériocines	32
2.4.6/ Domaines d'application des bactériocines	32

PARTTIE EXPERIMENTALE

I/ MATERIELS ET METHODES	37
1/ Matériels	37
1.1/ Matériel biologique	37
1.2/ Milieux de culture	38
1.3/ Réactifs chimiques	39
2 Méthodes.....	39
2.1/Repiquage et revivification des Lactocoques	39
2.2/ Préparation de l'inoculum.....	39

2.3/ Conditions de croissance.....	39
2.4/ Analyses microbiologiques.....	40
2.5/ Etude du pouvoir acidifiant des Lactocoques	40
2.5.1/ Préparation du lait	40
2.5.2/ Pouvoir acidifiant	41
2.6/ Techniques d'isolement et d'identification des bactéries pathogènes	41
2.6.1/ Prélèvements	41
2.6.2/ Examens bactériologiques	41
a) <i>Enrichissement</i>	41
b) <i>Isolement</i>	42
c) <i>Identification des caractères biochimiques</i>	42
2.7/ Technique d'isolement et d'identification d' <i>Hélicobacter pylori</i>	44
2.7.1/ Techniques d'isolement.....	44
2.7.2/ Identification des caractères biochimiques.....	45
2.8/ Etude du pouvoir antibactérien des souches lactiques	45
2.8.1/ Préparation des précultures des souches lactiques.....	46
2.8.2/ Préparation des précultures des bactéries pathogènes	46
2.8.3/ Dénombrement des souches avant interaction	46
2.8.4/ Spectre antibactérien des souches.....	47
2.8.5/ Dénombrement des souches après interaction.....	47
2.9/ Etude de la nature de la substance inhibitrice.....	48
2.9.1/ Elimination de l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène	48
2.9.2 / Effet des traitements thermiques sur la substance inhibitrice.....	48
2.9.3 / Effet des enzymes protéolytiques.....	49
2.10 /Analyse statistique des résultats.....	49

II/ RESULTATS ET DISCUSSIONS

1/ Survie des Lactocoques dans les conditions extrêmes du tube digestif.....	50
1.1/ Souches pures.....	50
1.1.1/ Survie de <i>Lactococcus lactis</i> à pH 2,5.....	50
1.1.2/ Survie de <i>Lactococcus lactis</i> à pH 4,5.....	52
1.1.3/ Survie de <i>Lactococcus lactis</i> à pH 6,5.....	53
1.2/ Association des différentes souches	56
1.2.1/ Survie des différentes associations à pH 2,5.....	56

1.2.2/Survie des différentes associations à pH 4,5	58
1.2.3/ Survie des différentes associations à pH 6,5.....	60
2 / Pouvoir acidifiant des souches sélectionnées.....	52
3/ Isolement et identification des bactéries pathogènes	65
3.1/ Isolement et identification de <i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Citrobacter freundii</i>	65
3.1.1/ Examens bactériologiques.....	65
3.1.2/ Identification des caractères biochimiques.....	65
3.2/ Isolement et identification de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Clostridium perfringens</i>	67
3.2.1/ Examens bactériologiques.....	67
3.2.2/ Identification des caractères biochimiques.....	68
3.3/ Isolement et identification d' <i>Helicobacter pylori</i>	68
3.3.1/ Test rapide à l'urée.....	68
3.3.2/ Examens bactériologiques.....	68
4/ Etude du pouvoir antibactérien des souches lactiques.....	71
4-1/ Dénombrement des souches avant interaction.....	71
4-2/ Spectre antibactérien des souches	72
4-2-1/ Effet de <i>Lactococcus lactis</i> sur <i>E. coli</i>	73
4-2-2 / Effet de <i>Lactococcus lactis</i> sur <i>C. freundii</i>	74
4-2-3 / Effet de <i>Lactococcus lactis</i> sur <i>S. typhi</i>	75
4-2-4 / Effet de <i>Lactococcus lactis</i> sur <i>H. pylori</i>	76
4-2-5/ Effet de <i>Lactococcus lactis</i> sur <i>C perfringens</i>	77
4-2-6/ Effet de <i>Lactococcus lactis</i> sur <i>S. aureus</i> (1)	78
4-2-7/ Effet de <i>Lactococcus lactis</i> sur <i>S. aureus</i> (2)	79
4-3 / Dénombrement des souches après interaction	81
4-4/ Etude de la nature des substances inhibitrices.....	82
4-4-1/ Elimination de l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène	82
4-4-2/ Effet des traitements thermiques sur la substance inhibitrice.....	86
4-4-3/ effet des enzymes protéolytiques	93

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

RESUME

Les objectifs de notre étude consistaient à étudier l'activité antimicrobienne de certaines souches de bactéries lactiques à l'égard de quelques espèces pathogènes et rechercher la nature des substances inhibitrices sécrétées. 21 souches de lactocoques mésophiles appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis*, ont été étudiées durant notre expérimentation. Une première sélection est effectuée suite à l'étude de la survie de ces souches dans le tube digestif. Les cultures pures et mixtes présentant une bonne résistance vis-à-vis des conditions extrêmes du tube digestif (acidité gastrique, sels biliaires) sont: *Lc.l7*, *Lc.l12*, *Lc.l6*, *Lc.l13*, *Lc.l9*, *Lc.d1*, *Lc.d2*, *Lc.c1* et *Lc.c3*, *L7D1C1*, *L7D2C1*, *L7D2C3*, *L9D1C1*, *L9D2C1*, *L9D2C3*, *L12D1C3*, *L6D1C3*, *L6D1C1*, *L12D2C3*, *L6D2C3* et *L13D2C3*. L'étude de l'évolution de l'acidité Dornic a montré que toutes ces cultures possèdent un pouvoir acidifiant élevé. Une deuxième sélection est réalisée sur la base du pouvoir antibactérien vis-à-vis de sept souches pathogènes: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* (1) et *Staphylococcus aureus* (2). Les tests d'inhibition sont réalisés par la méthode de diffusion des disques. Les cultures retenues pour leur effet inhibiteur sont: *Lc.l7*, *Lc.l12*, *Lc.l6*, *Lc.l13*, *Lc.l9*, *L7D1C1*, *L7D2C1*, *L7D2C3*, *L9D1C1*, *L9D2C1*, *L9D2C3*, *L12D1C3*, *L6D1C3*, et *L6D1C1*. Les bactéries pathogènes Gram positif sont plus sensibles à l'effet des souches lactiques. Les souches *Lc.l6*, *Lc.l9* et *Lc.l13* ont un effet bactériostatique vis-à-vis d'*H.pylori*. Le traitement thermique à 100°C pendant 15 et 30 mn n'affecte pas l'activité de ces substances. Ces dernières sont sensibles à la pronase, la trypsine, l' α -chymotrypsine et à la pepsine à l'exception des substances produites par *Lc.l7* et *Lc.l6* qui ne sont pas dégradées par la pepsine. Ces caractéristiques font penser que ces substances sont extracellulaires, thermostables et de nature protéique ce qui confirme qu'il s'agit de bactériocines. Ces résultats suggèrent que l'utilisation de ces souches lactiques comme probiotiques permettrait mieux de protéger l'homme contre les bactéries responsables de la physiopathologie gastro-intestinale.

Mots clés: *Lactococcus lactis*, bactéries pathogènes, survie, pouvoir antibactérien, substances inhibitrices.

ABSTRACT

The objectives of our study consisted to study the antimicrobial activity of certain stocks of lactic bacteria with regard to some pathogenic species and to seek the nature of the secreted inhibiting substances. 21 lactococques stocks mesophiles pertaining to the species *Lactococcus lactis*, were studied during our experimentation. A first selection is carried out following the study of the survival of these stocks in the digestive tract. The pure and mixed cultures having a good resistance opposite D be conditions extreme of the digestive tract (gastric acidity, biliary salts) are: *Lc.l*₇, *Lc.l*₁₂, *Lc.l*₆, *Lc.l*₁₃, *Lc.l*₉, *Lc.d*₁, *Lc.d*₂, *Lc.c*₁ and *Lc.c*₃, *L*₇*D*₁*C*₁, *L*₇*D*₂*C*₁, *L*₇*D*₂*C*₃, *L*₉*D*₁*C*₁, *L*₉*D*₂*C*₁, *L*₉*D*₂*C*₃, *L*₁₂*D*₁*C*₃, *L*₆*D*₁*C*₃, *L*₆*D*₁*C*₁, *L*₁₂*D*₂*C*₃, *L*₆*D*₂*C*₃ and *L*₁₃*D*₂*C*₃. The study of the evolution of Dornic acidity showed that all these cultures have high capacity acidifying. A second selection is carried out on the basis of capacity antibactérien v is-with-screw of seven pathogenic stocks: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* (1) and *Staphylococcus aureus* (2). The tests of inhibition are carried out by the method of diffusion of the discs. The cultures retained for their inhibiting effect are: *Lc.l*₇, *Lc.l*₁₂, *Lc.l*₆, *Lc.l*₁₃, *Lc.l*₉, *L*₇*D*₁*C*₁, *L*₇*D*₂*C*₁, *L*₇*D*₂*C*₃, *L*₉*D*₁*C*₁, *L*₉*D*₂*C*₁, *L*₉*D*₂*C*₃, *L*₁₂*D*₁*C*₃, *L*₆*D*₁*C*₃, and *L*₆*D*₁*C*₁. The pathogenic bacteria positive Gram are more sensitive to the effect of the lactic stocks. The stocks *Lc.l*₆, *Lc.l*₉ and *Lc.l*₁₃ have an effect bacteriostatic with respect to *H.pylori*. The thermal 100°C treatment during 15 and 30 mn does not affect the activity of these substances. These last are sensitive to the pronase, trypsin, the α –chymotrypsine and with pepsin except for S substances produced by *Lc.l*₇ and *Lc.l*₆ which are not degraded by pepsin. These characteristics make think that these substances are extracellular, thermostable and of proteinic nature what confirms that it is about bactériocines. These results suggest that the use of these lactic stocks as probiotic would make it possible to protect the man against the bacteria responsible for gastro-intestinal physiopathology.

Key words: *Lactococcus lactis*, bacteria pathogenic, survival, antibactérien capacity, inhibiting substance.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des lactocoques. Source : Guiraud, (1998).....	17
Tableau 2 : Besoins nutritionnels des lactocoques. Source : Konnings, (1994).....	19
Tableau 3 : Microorganismes à caractère probiotique. Source: Holzapfel et <i>al.</i> (2001)..	21
Tableau 4 : Milieux d'isolement des souches pathogènes Source: Guiraud, 1998.....	42
Tableau 5 : Tableau déidentification par galerie API 20E. Source : BioMérieux (2006).....	43
Tableau 6 : Tableau de lecture d'une galerie biochimique classique. Source : Marshall, (1982).....	44
Tableau 7 : Tableau d'identification biochimique des bactéries pathogènes par galerie API20E.....	66
Tableau 8 : Identification des caractères biochimiques d' <i>H. pylori</i>	69
Tableau 9 : Charge initiale des souches pathogènes et lactiques avant interaction.....	71
Tableau 10 : diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après 24 heures d'incubation 37°C.....	72
Tableau 11 : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après élimination de l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène.....	83
Tableau 12 : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après traitement thermique à 60 °C/30 mn.....	87
Tableau 13 : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après traitement thermique à 80 °C/30 mn.....	88
Tableau 14 : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après traitement thermique à 90 °C/30 mn.....	90
Tableau 15 : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après traitement thermique à 100°C/15 mn.....	92

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Evolution de la croissance des souches de bactéries lactiques à pH 2.5 en absence de sels biliaires.....	51
Figure 02 : Evolution de la croissance des souches de bactéries lactiques à pH 2.5 en présence de sels biliaires.....	51
Figure 03: Evolution de la croissance des souches de bactéries lactiques à pH 4.5 en absence de sels biliaires.....	52
Figure 04 : Evolution de la croissance des souches de bactéries lactiques à pH 4.5 en présence de sels biliaires.....	53
Figure 05 : Evolution de la croissance des souches de bactéries lactiques à pH 6.5 en absence de sels biliaires.....	54
Figure 06: Evolution de la croissance des souches de bactéries lactiques à pH 6.5 en présence de sels biliaires.....	55
Figure 07: Evolution de la croissance des souches de bactéries lactiques en absence de sels biliaires et à pH optimal (témoin).....	55
Figure 08 : Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 2.5 en absence de sels biliaires.....	57
Figure 09 : Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 2.5 en présence de sels biliaires.....	57
Figure 10 : Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH optimal et en absence de sels biliaires (témoin).....	58
Figure 11 : Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 4.5 en absence de sels biliaires.....	59
Figure 12 : Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 4.5 en présence de sels biliaires.....	59
Figure 13 : Evolution de la croissance des cultures mixtes on à pH 6,5 et en absence de sels biliaires.....	60
Figure 14: Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 6,5 et en présence de sels biliaires.....	61
Figure 15 : Evolution du pH des cultures pures à 30 °C en fonction du temps.....	62
Figure 16: Evolution du pH des cultures mixtes à 30 °C en fonction du temps.....	63
Figure 17: Evolution de l'acidité Dornic des cultures pures à 30 °C en fonction du temps.....	63

Figure 18: Evolution de l'acidité Dornic des cultures mixtes à 30 °C en fonction du temps.....	64
Figure 19 : Test rapide à l'urée après incubation à 37°C pendant 24h.....	68
Figure 20 : Effet antibactérien des souches lactiques en cultures mixtes vis-à-vis d' <i>E.coli</i>	74
Figure 21 : Effet antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis de <i>C. freundii</i>	75
Figure 22 : Effet antibactérien des souches lactiques en cultures mixtes vis-à-vis de <i>S. typhi</i>	76
Figure 23 : Effet antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis d' <i>H. pylori</i>	77
Figure 24 : Effet antibactérien des souches lactiques en cultures mixtes vis-à-vis d' <i>H. pylori</i>	77
Figure 25 : Effet antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis de <i>C. perfringens</i>	78
Figure 26 : Effet antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis de <i>S. aureus</i> (1).....	79
Figure 27: Effet antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis de <i>S. aureus</i> (2).....	79
Figure 28 : Pouvoir antibactérien de <i>Lc.l13</i> , <i>Lc.l9</i> et <i>Lc.l6</i> vis-à-vis d' <i>H. pylori</i> après 24h d'incubation à 37° C.....	80
Figure 29 : Pouvoir antibactérien de <i>Lc.l13</i> , <i>Lc.l9</i> et <i>Lc.l6</i> vis-à-vis d' <i>H. pylori</i> après une semaine d'incubation à 37° C.....	80
Figure 30 : Pouvoir antibactérien des cultures lactiques vis-à-vis <i>E.coli</i> après élimination des acides organique et du H ₂ O ₂	82
Figure 31 : Pouvoir antibactérien des cultures lactiques vis-à-vis de <i>S. typhi</i> après élimination des acides organique et du H ₂ O ₂	83
Figure 32 : Pouvoir antibactérien des souches lactiques vis-à-vis d' <i>H. pylori</i> après élimination des acides organique et du H ₂ O ₂	84
Figure 33 : Pouvoir antibactérien des souches lactiques sur <i>C. perfringens</i> après élimination des acides organique et du H ₂ O ₂	84
Figure 34 : Pouvoir antibactérien des cultures lactiques vis-à-vis <i>S. aureus</i> (2) après élimination des acides organique et du H ₂ O ₂	85

Figure 35 : Pouvoir antibactérien des cultures Lactiques vis-à-vis d' <i>E. Coli</i> après traitement thermique à 60° C/ 30 mn.....	86
Figure 36 : Pouvoir antibactérien des cultures lactiques vis-à-vis d' <i>H. pylori</i> après traitement thermique à 60° C/ 30 mn.....	86
Figure 37 : Pouvoir antibactérien des cultures lactiques vis-à-vis de <i>S. aureus</i> (1) après traitement thermique à 60 °C/ 30 mn.....	87
Figure 38 : Pouvoir antibactérien des cultures lactiques vis-à-vis d' <i>H. pylori</i> après traitement thermique à 80° C/ 30 mn.....	89
Figure 39 : Pouvoir antibactérien des souches lactiques sur <i>E. coli</i> après traitement thermique à 90° C/ 30 mn.....	89
Figure 40 : Pouvoir antibactérien des souches lactiques vis-à-vis d' <i>H. pylori</i> après traitement thermique à 100° C/ 30 mn.....	92
Figure 41 : Pouvoir antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis d' <i>E. coli</i> après traitement thermique à 100° C/ 15 mn.....	92
Figure 42 : Pouvoir antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis d' <i>E. coli</i> après traitement par la pepsine.....	94
Figure 43 : Pouvoir antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis de <i>C. perfringens</i> après traitement par la pepsine.....	94

LISTE DES TABLEAUX EN ANNEXE

ANNEXE I : Milieux de cultures

Tableau 1: Composition du milieu M17 agar (Terzaghi et Sandine, 1975).

Tableau 2: Composition du milieu BGT. (Guiraud, 2003).

Tableau 3: Composition du milieu gélose chocolat (Marchal et *al.*, 1987).

ANNEXE IV: Tableaux des résultats

Tableau 1: Evolution de la croissance des cultures pures à pH 6,5 en absence de sels biliaires.

Tableau 2: Evolution de la croissance des cultures pures à pH 4,5 en absence de sels biliaires.

Tableau 3: Evolution de la croissance des cultures pures à pH 2,5 en absence de sels biliaires.

Tableau 4: Evolution de la croissance des cultures pures à pH 2,5 en présence de 0,3 % de sels biliaires.

Tableau 5: Evolution de la croissance des cultures pures à pH 6,5 en présence de 0,3 % de sels biliaires.

Tableau 6 : Evolution de la croissance des cultures pures à pH 4,5 en présence de 0,3 % de sels biliaires.

Tableau 7 : Evolution de la croissance des cultures pures en fonction du temps (témoin).

Tableau 8 : Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 2,5 en absence de sels biliaires.

Tableau 9: Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 4,5 en absence de sels biliaires.

Tableau 10: Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 6,5 en absence de sels biliaires.

Tableau 11: Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 2,5 en présence de 0,3 % de sels biliaires.

Tableau 12: Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 4,5 en présence de 0,3 % de sels biliaires

Tableau 13: Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 6,5 en présence de 0,3 % de sels biliaires.

Tableau 14 : Evolution de la croissance des cultures mixtes en fonction du temps (témoin).

Tableau 15: Evolution de l'acidité Dornic des souches lactiques à 30 °C suivant le temps.

Tableau 16: Evolution du pH des souches lactiques à 30 °C suivant le temps.

Tableau 17: dénombrement des souches lactiques après interaction avec *E.coli*.

Tableau 18: dénombrement des souches lactiques après interaction avec *C.freundii*.

Tableau 19: dénombrement des souches lactiques après interaction avec *S. typhi*.

Tableau 20: dénombrement des souches lactiques après interaction avec *H. pylori*.

Tableau 21: dénombrement des souches lactiques après interaction avec *C. perfringens*.

Tableau 22: dénombrement des souches lactiques après interaction avec *S.aureus* (1).

Tableau 23: dénombrement des souches lactiques après interaction avec *S. aureus* (2).

Tableau 24: Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après traitement thermique de 100 °C/30 mn.

Tableau 25: Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après traitement par la pepsine.

ANNEXE V: Résultats statistiques

Tableau 1 : Résultats de l'analyse de variance des cultures pures

Tableau 2 : Résultats de l'analyse de variance des cultures mixtes

Introduction

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fabrication d'aliments fermentés depuis plusieurs siècles. En plus de l'amélioration de la saveur, la fermentation permet d'augmenter la durée de conservation du produit. Tortora et Grabowski (2001) ont montré que certaines souches de bactéries lactiques peuvent avoir une influence sur de nombreuses bactéries nocives qui peuvent provoquer de graves maladies infectieuses en sécrétant des toxines qui perturbent l'activité du tube digestif. Ces maladies se manifestent par des diarrhées aiguës et des vomissements qui peuvent être d'origine bactérienne (ex : *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* et *Citrobacter freundii*), parasitaire ou virale.

Les Salmonelles sont responsables d'infections sévères chez l'homme. Elles sont souvent à l'origine de la mortalité infantile dans les pays en voie de développement et restent un risque permanent dans les pays industrialisés (Tortora et *al.*, 2003).

L'infection à *Helicobacter pylori* est la plus répandue dans le monde, touchant environ un tiers de la population des pays développés et plus des deux tiers dans les pays en voie de développement; cette bactérie occasionne chez l'homme des gastrites, des ulcères et même des cancers de l'estomac (De Vuyst, 2004).

Les traitements antibiotiques sont devenus moins efficaces et le développement des résistances aux antibiotiques apparaît comme une des principales causes de ces échecs. Une alternative de traitement pourrait être la consommation de probiotiques (Korwin, 2004).

Les bactéries lactiques, comme les lactocoques et les lactobacilles, sont utilisées pour leurs différentes propriétés. Elles ont la capacité de produire lors de leur croissance des composés actifs à savoir les acides organiques, des dérivés du métabolisme de l'oxygène (H₂O₂) et des substances naturelles de nature protéique dotées d'activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération (Vinod Kumar et *al.*, 2006). Parmi ces substances synthétisées, des peptides dénommés bactériocines, sont produits puis excrétés à l'extérieur des cellules productrices. Ils présentent une activité bactéricide ou bactériostatique (Ammor et *al.*, 2006).

C'est dans cette optique, que nous nous sommes intéressés à étudier, *in vitro*, l'effet de quelques souches de *Lactococcus lactis* sur l'inhibition des bactéries impliquées dans la

physiopathologie digestive (*E. coli*, *S. typhi*, *C. freundii*, *C. perfringens* et *S. aureus* et *H. pylori*).

Notre étude s'articule en trois parties :

- ◆ L'étude de la survie des souches lactiques en cultures pures et en cultures mixtes dans des conditions extrêmes du tube digestif (acidité gastrique et sels biliaires);
- ◆ L'isolement et l'identification des bactéries pathogènes : *H. pylori*, *E. coli*, *S. typhi*, *C. freundii*, *C. perfringens* et *S. aureus*;
- ◆ L'étude de l'activité antimicrobienne des meilleures souches de bactéries lactiques et la recherche de la nature des substances inhibitrices sécrétées.

I / PHYSIOLOGIE DU TUBE DIGESTIF

1 / Système digestif

Le système digestif comprend deux groupes d'organes : le tube digestif et les organes digestifs annexes (Tortora et Grabowski, 2001). Les enzymes secrétées par les structures annexes et les cellules qui tapissent le tube digestif dégradent la nourriture par leur action chimique (Tortora et al., 2003).

Des mécanismes de défense s'opposent à l'implantation et/ou à l'envahissement du tube digestif par des microorganismes potentiellement pathogènes qui se heurtent en tout premier lieu à la barrière physiologique des cellules qui composent la muqueuse digestive. A cette action mécanique, s'ajoutent les effets des substances antimicrobiennes libérées dans les cavités, telles que l'HCl sécrété dans l'estomac, les enzymes intestinales, le pouvoir bactéricide des sels biliaires, en particulier l'acide désoxycholique et la flore intestinale (Taglang, 2005).

2 / Flore intestinale

Chez l'homme, la microflore intestinale renferme environ 100 000 milliards de bactéries appartenant à plus de 400 espèces différentes (Bjorksten, 2004). Il s'agit d'une biomasse considérable dont l'activité se traduit par la production *in vivo*, d'enzymes et de métabolites (Hao et Lee, 2004).

2.1/ Répartition topographique de la flore digestive

La répartition de la flore varie selon les segments du tube digestif. Elle dépend de la teneur du milieu en oxygène, des sécrétions du tube digestif, des nutriments disponibles et de la vitesse du transit (Hopkins et al., 2002) :

- ◆ dans l'estomac, du fait d'un pH bas, la flore est quasi inexistante (inférieur à 10^3 UFC/g) ;
- ◆ dans l'intestin grêle, il existe une variation quantitative (duodénum $10^3 - 10^4$ UFC/g, jéjunum $10^4 - 10^6$ UFC/g, iléon $10^6 - 10^8$ UFC/g) et qualitative (diminution progressive des bactéries aérobies au profit des bactéries anaérobies strictes). Il y a peu de bactéries dans l'intestin grêle où elles ne jouent pratiquement aucun rôle ;
- ◆ dans le côlon, le transit, très fortement ralenti, est à l'origine d'une stase d'où l'augmentation importante de la population bactérienne (de $10^9 - 10^{11}$ UFC/g), c'est

une véritable chambre de fermentation, siège de très nombreuses biotransformations des aliments non assimilés au niveau du grêle. Le côlon est la seule zone colonisée de façon permanente ; la flore microbienne essentiellement anaérobie est dense et active, produisant localement de nombreux métabolites.

2.2/ Composition classique d'une flore intestinale humaine

La flore normale est définie par l'ensemble des espèces présentes dans l'écosystème de façon constante et capables de s'y multiplier dans les conditions environnementales du tube digestif (Ouwehand et Vesterland, 2003).

Les bactéries habituellement présentes dans l'intestin grêle appartiennent aux genres : *Lactobacillus*, *Streptococcus* et à quelques espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* à des concentrations faibles jusqu'à l'iléon où elles apparaissent dominées par des espèces anaérobies à Gram négatif appartenant au genre *Bactéroïdes*.

Dans le Côlon, il faut distinguer quatre types de flore (Bjorksten, 2004) :

◆ Flore dominante ($N > 10^9$ UFC/g) exclusivement anaérobie: *Bactéroïdes*, *Eubactérium*, *Bifidobactérium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Propionibacterium* ;

◆ Flore sous-dominante ($10^6 > N > 10^8$ UFC/g): différentes espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (surtout *E. coli* et les genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Risobarium*, *Desulfovibrio*, *Methanobrevibacter*) ;

◆ Flore résiduelle ($N < 10^6$ UFC/g): bactéries en transit ou réprimées par la flore résidente ;

◆ Flore fécale: renferme de nombreuses espèces mortes, l'analyse de la flore fécale ne donne qu'une vue très limitée de l'écosystème mais permet de retrouver des souches pathogènes ou potentiellement pathogènes pour l'hôte.

2.3/ Rôles de la flore intestinale humaine

a) – Effets digestifs

Selon Moreau (2005) les modifications anatomiques et histologiques liées à la présence de la microflore sont mises en évidence en comparant ce qui se passe chez l'animal conventionnel par rapport à l'animal axénique ; l'absence de flore entraîne un ralentissement du transit intestinal et une dilatation du caecum et la vitesse de renouvellement cellulaire est significativement réduite chez l'animal axénique.

b) – Effets nutritionnels

D'après Bourlioux (1998) les effets nutritionnels de la flore intestinale peuvent être :

❖ Bénéfiques pour l'hôte par :

- la production d'acides gras à chaîne courte diminuant la synthèse hépatique du cholestérol ;
- la dégradation des hydrates de carbone non absorbés (amidon, pectine, glycoprotéines) aboutissant à la production d'acides organiques assimilables par l'hôte (acétate, propionate, butyrate) et de gaz (CO₂, H₂) ;
- l'hydrolyse des lipides alimentaires non absorbés grâce aux lipases bactériennes et à la conjugaison des acides biliaires primaires, indispensables pour une bonne absorption des graisses ;
- la dégradation de certaines protéines et de certains acides aminés (tryptophane), permettant la récupération de l'azote ;
- certaines bactéries anaérobies facultatives (*E. coli*, *E. aerogènes*) sont capables de synthétiser *in vitro* un large éventail de vitamines (biotine, riboflavine, acide pantothénique, pyridoxine et vitamine K). La vitamine B12 peut être synthétisée par des bactéries anaérobies strictes (*C. butyricum*, *Veillonella sp.*).

❖ Défavorables pour l'hôte par :

- Le métabolisme glucidique : Les activités de type β -glucuronidases libèrent à partir des β -glucuronides des aglycones à pouvoir cancérigène,
- Le métabolisme azoté : La dégradation par la microflore des nitrates et des amines secondaires aboutit à la production de nitrosamines cancérigènes ;
- les myrosinases d'origine bactérienne qui sont capables d'hydrolyser les glucosinolates des crucifères (Choux, navets, ...) et peuvent être responsables de diarrhées.

c)- Protection contre l'infection

La flore intestinale joue aussi un rôle crucial sur les systèmes immunitaire intestinal et périphérique. Elle peut activer et moduler des réponses spécifiques par exemple au niveau intestinal sur la réponse protectrice IgA antirotavirus, importante chez le nouveau né (Rousseau, 2004).

Elle exerce aussi un rôle de régulation comme celui de la tolérance induite par voie orale, qui empêche les réactions immunitaires aux protéines alimentaires et aux composants de la flore elle-même (Moreau, 2005).

3 / Les maladies bactériennes des voies digestives inférieures

Les voies digestives constituent un environnement stérile, à la naissance la colonisation bactérienne débute au cours du processus de l'accouchement et se développe avec l'âge selon le profil de l'alimentation qui fait modifier chaque fois la flore digestive. Cette modification peut, à son tour entraîner une augmentation de la charge bactérienne pathogène et toxique provoquant de nombreuses pathologies gastro-intestinales (Steer, 2000).

Les maladies du tube digestif sont essentiellement de deux types, les infections et les intoxications. Une infection survient lorsqu'un agent pathogène pénètre à l'intérieur du tube digestif et s'y multiplie. Les microorganismes peuvent s'installer sur la muqueuse intestinale et y croître, ou bien la traverser pour migrer vers d'autres organes internes. Certains agents pathogènes entraînent la maladie en sécrétant des toxines qui perturbent l'activité du tube digestif (Regnault, 2002).

L'intoxication résulte de l'ingestion de telles toxines préformées. Les infections et les intoxications provoquant des diarrhées sévères sanglantes ou accompagnées de mucus s'appellent dysenteries. Le terme gastroentérite s'applique aux maladies s'accompagnant d'une inflammation des muqueuses de l'estomac et de l'intestin (Tortora et *al.*, 2003).

3.1/ L'intoxication alimentaire par les staphylocoques

Les staphylocoques appartiennent à la famille des micrococaceae. Ce sont des cocci à Gram positif, aéro-anaérobies facultatifs, non sporulés, immobiles et catalase positive. Parmi les staphylocoques, *Staphylococcus aureus* est la principale espèce entérotoxigène (Bourgeois et *al.*, 1996). *S. aureus* se multiplie plus facilement en aérobiose qu'en anaérobiose, il est mésophile, généralement inhibé en présence d'une flore compétitive importante (Joly et Alain, 2003).

L'intoxication alimentaire par les staphylocoques qui, survient lors de l'ingestion d'entérotoxines produites par *S. aureus* est la principale cause des gastroentérites (Bourgeois et *al.*, 1996). *S. aureus* sécrète plusieurs toxines qui endommagent les tissus, ce qui augmente la virulence de la bactérie.

La production de la toxine du type sérologique A, responsable de la plupart des cas d'intoxication, est souvent corrélée avec la production d'une enzyme coagulant le plasma sanguin, la présence de l'enzyme concourt à déterminer les types de bactéries susceptibles d'être virulentes, cette virulence accrue des souches de *S. aureus* productrices d'entérotoxines et de coagulase serait due à la présence d'un plasmide qui possède les gènes responsables de leur synthèse (Tortora et *al.*, 2003).

La toxine elle-même est thermostable et peut maintenir sa structure jusqu'à 30 minutes au cours d'une ébullition. Par conséquent, une fois qu'elle est formée, la toxine n'est pas détruite quand la nourriture est réchauffée, alors que les bactéries sont tuées.

Une fois ingérée, la toxine déclenche rapidement le réflexe de vomissement régi par le cerveau et provoque les crampes abdominales et les diarrhées qui s'ensuivent. Il s'agit essentiellement d'une réaction de type immunologique, car l'entérotoxine staphylococcique est un antigène non spécifique qui stimule, en même temps et sans distinction, un grand nombre de récepteurs de lymphocytes T et donne ainsi naissance à une réaction immunitaire exagérée et nocive (Tortora et Grabowski, 2001).

3.2/ La gastroentérite à *Clostridium perfringens*

Les *Clostridium* sont classiquement définis comme des bactéries de la famille des bacillaceae (bacilles et cocci sporulés) à Gram positif, de forme bacillaire, mobiles par ciliature Péritriche ou immobiles et catalase négative. Elles sont anaérobies strictes, mais peuvent résister à des concentrations plus ou moins fortes en oxygène (Guiraud, 1998).

Clostridium perfringens produit un grand nombre de "toxines" qui ont des activités très variées. Sur la base de la production de 04 toxines létales majeures, les *Clostridium perfringens* ont été séparés en 05 types A, B, C, D, E. Les 05 types de *Clostridium perfringens* ne peuvent pas être différenciées morphologiquement ou biochimiquement (Regnault, 2002).

Lorsqu'un aliment contenant un grand nombre de formes végétatives de *Clostridium Perfringens* est ingéré, les bactéries sporulent dans l'intestin grêle et l'entérotoxine est alors libérée, provoquant l'apparition de troubles digestifs (Reynolds et *al.*, 1986).

L'entérotoxine est un polypeptide de simple chaîne possédant diverses propriétés biologiques, elle provoque l'accumulation de liquide dans l'anse intestinale ligaturée. Elle est

dermo érythémateuse puisqu'elle induit une augmentation de la perméabilité capillaire, une perte d'eau, de sodium et de chlore est observée ainsi que l'absorption de glucose et le métabolisme oxydatif sont inhibés (Bourgeois et *al.*, 1996).

L'ingestion de grandes quantités de cellules végétatives de *Clostridium perfringens* type A entérotoxigène (environ 10^8 cellules) se traduit par l'apparition d'une toxi-infection alimentaire (Guiraud, 1998).

Après l'ingestion, les bactéries sporulent dans l'intestin, en milieu alcalin, et ce phénomène nécessite six à huit heures pour parvenir à sa phase terminale. L'entérotoxine libérée induit la sécrétion en grande quantité de liquide, de sodium et de chlorures dans l'intestin, ce qui provoque l'apparition d'une diarrhée.

Les symptômes de la maladie apparaissent en général 8 à 12 heures après le repas infectant. Les douleurs abdominales sont importantes, il apparaît une diarrhée profuse et la plupart du temps pas de vomissements sauf chez les sujets sensibles. L'entérotoxine ne produit pas de lésions de la muqueuse intestinale, et la maladie régresse en principe spontanément en 24 à 48 heures, sans séquelles (Tortora et *al.*, 2003).

3.3/ La Salmonellose : gastroentérite à *Salmonella*

Les bactéries du genre *salmonella* appartiennent à la famille des *Entérobacteriaceae*. Ce sont des bacilles de 0,7 à 1,5 μm de large et 2,0 à 5 μm long, à Gram négatif, anaérobies facultatifs, mobiles grâce à une ciliature péritriche, chimioorganotrophes et ne formant pas d'endospore. Elles sont caractérisées par une catalase positive et oxydase négative (Gledel, 1988).

Les *Salmonella* sont responsables d'infections sévères chez l'homme et les animaux. Elles sont souvent à l'origine de la mortalité infantile dans les pays en voie de développement et restent un risque permanent dans les pays industrialisés (Guiraud, 1998).

Le réservoir de *Salmonella typhi* et *Salmonella paratyphi* est strictement humain. La transmission peut être interhumaine par contact direct avec une personne infectée, ou indirecte par la consommation d'aliments contaminés lors de leur préparation par une personne malade (ou porteuse saine), ou par la consommation d'aliments contaminés par de l'eau souillée par des matières fécales (Bergeron et Dufour, 2004).

La dose infectieuse de Salmonellose peut être inférieure à 1000 bactéries. La période d'incubation de la maladie est de 12 à 36 heures. Les Salmonelles envahissent d'abord les

cellules de la muqueuse intestinale. Le mécanisme de pénétration de la bactérie est assez spectaculaire. Une fois dans la cellule, les bactéries se multiplient, traversent la muqueuse et pénètrent les systèmes lymphatique et cardiovasculaire par l'intermédiaire des quelles atteignent d'autres organes où elles peuvent provoquer des abcès. La maladie se manifeste habituellement par une fièvre modérée, des nausées, des vomissements, de la diarrhée parfois sanglante et des douleurs abdominales. Ces signes régressent en quelques jours, une semaine environ (Bourgeois et *al.*, 1996).

Le taux de mortalité dû à la salmonellose est en général très faible, probablement inférieur à 1 %. Cependant, la mortalité est plus élevée chez les enfants et les personnes très âgées (Tortora et *al.*, 2003).

3.4 / La gastroentérite à *Escherichia coli*

Escherichia coli appartient au groupe des coliformes, d'origine fécale et peut être responsable d'intoxications à cause d'un développement abondant. Elle possède les propriétés classiques des entérobactéries: Gram négatif, catalase positive, oxydase négative, anaérobie facultative et bâtonnet court (Guiraud, 1998).

Les bactéries coliformes sont habituellement inoffensives, mais certaines souches peuvent être pathogènes et possèdent des fimbriae spécifiques qui leur permettent d'adhérer à certaines cellules épithéliales de l'intestin. Ces bactéries produisent aussi des toxines responsables de troubles gastro-intestinaux. Il existe plusieurs biotypes d' *Escherichia coli* pathogènes qui diffèrent par leur virulence et la sévérité des dommages qu'ils provoquent (Tortora et *al.*, 2003) :

◆ *Escherichia coli* entéro pathogène (ECEP)

Ces bactéries sont responsables des diarrhées surtout chez l'enfant. Elles peuvent être responsables d'épidémies dans les collectivités notamment en milieu néonatal, favorisées par le manque d'hygiène. La diarrhée peut être sévère et prolongée; selles aqueuses accompagnées d'une grande quantité de mucus, fièvre et vomissements. Pour manifester leur pouvoir pathogène, la plupart des souches doivent posséder des structures d'adhérence aux entérocytes, gérant une destruction progressive de ceux-ci associée ou non à l'action d'une cytotoxine. La dose infectieuse est de 10^8 à 10^{10} bactéries par ingestion (Guechi, 2002).

◆ *Escherichia coli* entérotoxigène (ECET)

L'E.C.E.T est une cause fréquente des diarrhées du voyageur et d'enfants dans les pays en voie de développement. Les bactéries ingérées adhèrent aux entérocytes et sécrètent des entérotoxines qui vont être responsables d'une diarrhée liquide abondante, s'accompagnant de nausées et de vomissements, de douleurs abdominales, parfois de la fièvre et du malaise général. La dose infectieuse varie de 10^8 à 10^{10} bactéries par ingestion (Leclerc et *al.*, 1995).

◆ *Escherichia Coli* enteroinvasive (E.C.E.I)

C'est une souche provoquant des diarrhées aiguës, avec de la fièvre, myalgies et frissons, il s'agit de syndrome de dysentérieforme : la souche se fixe à la muqueuse et l'infecte. Certaines souches ont des réactions sérologiques croisées avec les shigelles, aussi bien morphologique que physiologique, elles sécrètent la même vérotoxine, elles sont retrouvées surtout chez les enfants de moins de dix ans dans les pays en voie de développement. La dose infectieuse est habituellement de 10^9 bactéries par ingestion (Tortora et *al.*, 2003).

◆ *Escherichia Coli* entérohémorragique (ECEH)

Ces genres sont responsables d'une diarrhée sanglante, de colites hémorragiques parfois accompagnées d'atteintes rénales graves pouvant aboutir à la mort, notamment chez l'enfant ou les personnes âgées. Ces bactéries interagissent avec la muqueuse de l'intestin et produisent une toxine, la vérocytotoxine qui détruit les vaisseaux sanguins du rein. La dose infectieuse des souches entérohémorragique d' *Escherichia coli* est évaluée entre 10 et 10^3 bactéries par ingestion (Joly et Alain, 2003).

◆ *Escherichia Coli* entéroaggrégant et entéroadhérant (ECEAgg)

Leurs caractéristiques sont voisines de celles des ECEP. Ils provoquent des diarrhées chez l'enfant et chez les voyageurs en milieu tropical (Tortora et *al.*, 2003).

3.5/ Les infections à *Citrobacter*

Les souches du genre *Citrobacter* appartenant à la famille des *Entérobacteriaceæ* sont Gram négatif constituées de bacilles droits, isolés ou groupés en paire, d'environ 1,0 μm de diamètre sur 2,0 à 6,0 μm de longueur (Guiraud, 1998).

Les espèces du genre *Citrobacter* sont isolées des fèces de l'homme et des animaux (bovins, Chevaux, chiens, chats, tortues, oiseaux...). A l'exception de *Citrobacter braakii*, de *Citrobacter sedlakii* et de *Citrobacter rodentium*. Les *Citrobacter sp.* sont également isolés

du milieu extérieur (sol, eaux usées, aliments) et l'espèce la plus fréquemment retrouvée est *Citrobacter freundii*. Toutes les espèces, à l'exception de *Citrobacter rodentium*, peuvent être isolées de prélèvements cliniques chez l'homme, elles sont considérées comme des bactéries pathogènes opportunistes et la plupart de ces infections sont d'origine nosocomiale (Euzéby, 2000).

Les souches de *Citrobacter freundii* isolées des selles synthétisent une entérotoxine thermostable apparentée à celle d' *Eschérichia coli*. Elles sont responsables de diarrhées chez l'homme et de toxi-infections alimentaires qui se traduisent par une gastroentérite sévère suivie parfois d'un syndrome hémolytique urémique (Guiraud, 1998).

Citrobacter Koseri est isolée de selles, de plaies, du sang, de crachats mais surtout de l'urine ainsi que de cas de méningites et d'abcès du cerveau chez les nouveau-nés. Les *Citrobacter sp.* ont été impliquées dans des cas de mammites, d'avortements et de diarrhées chez les bovins et dans des cas de diarrhées chez les ovins et les caprins (Euzéby, 2000).

3.6/ Les infections à *Helicobacter pylori*

En 1979 Warren, un auteur australien a observé sur des échantillons de la muqueuse gastrique antrale des bactéries incurvées qui furent alors appelées "Campylobacter-like-organisme" qui ont été présentes chez les patients qui avaient une gastrite chronique. Ce n'est qu'en 1982 que ces bactéries spiralées ont pu être cultivées par Marshall et Warren. Ceci avait permis aux chercheurs de déterminer un nouveau genre bactérien qu'il avaient appelé "Gastric campylobacter pylori", pour prendre en 1983 le nom de *Helicobacter pylori* (Sevin et al., 1998).

Helicobacter pylori est une bactérie pathogène, ne colonise que la muqueuse gastrique et n'infecte pas le duodénum s'il n'y a pas de métaplasie gastrique. Elle est du genre *Helicobacter* et sa définition se résume en trois mots : hélico (du grec hélikoïde, qui veut dire spiralée) ; bacter (bâtonnet) ; pylori (désigne le pylore). Ce qui donne un bâtonnet spiralé du pylore (Bigard, 2004).

Selon la deuxième édition du manuel de Berge de la systématique bactérienne de 2001, le genre *Helicobacter* appartient à la famille *Helicobacteraceae* avec deux genres différents à savoir le genre *Helicobacter* et le genre *Wollinella*.

D'autres *Helicobacter* ont pu être identifiés *Helicobacter felis*, *Helicobacter meridarum*, *Helicobacter pulorum* et *Helicobacter bilis*...la plupart ont été trouvés dans le tube digestif des animaux et *Helicobacter pylori* a été isolée de l'estomac humain (Lamouliatte et al., 1992).

3.6.1/ Principaux caractères

Helicobacter pylori est un bacille à Gram négatif, de forme spiralée ou incurvée de 2,5 à 5 µm de long et 0,5 à 1 µm de large. Les bacilles sont généralement de morphologie homogène sur biopsies. Après culture, la morphologie devient hétérogène. Les bacilles sont en forme de "U", "S" ou même circulaire.

La mobilité d' *Helicobacter pylori* est assurée par 4 – 6 flagelles engainés de position polaire (ciliature lophotriche). Du fait de ses exigences métaboliques multiples, *Helicobacter pylori* est cultivée sur des milieux riches additionnés de sang ou de sérum de cheval (5 à 10%). La culture est réalisée dans des jarres sous atmosphère microaérophile avec 85 % de N₂ 10 % de CO₂ et 5 % d'O₂. Après 3 à 5 jours d'incubation à 37°C, les colonies apparaissent translucides, légèrement brunes et convexes (Avril et al., 2000).

Helicobacter pylori possède un capital enzymatique important car elle a une catalase, oxydase, amidase, peptidase, phosphatase et surtout une uréase extracellulaire en quantité extrêmement importante. Elle possède aussi une DNase gammaglutamyl-transpeptidase, leucine aminopeptidase, une lipase et aussi une estérase.

Certaines activités enzymatiques telles que Uréase, catalase et phospholipase peuvent expliquer la capacité d' *Helicobacter pylori* à résister à l'acidité gastrique, à la réponse inflammatoire et la modification de la composition du mucus et des phospholipides qui ont un rôle protecteur pour la muqueuse (Faucher, 1999).

3.6.2 Voies de transmission

D'après Megraud et al. (2000) trois principales voies de transmission d' *Helicobacter pylori* d'une personne à une autre sont proposées:

◆ **Transmission féco-orale** : Elle peut exister dans les pays où les conditions d'hygiènes sont absentes et les maladies sont fréquentes (les pays du tiers monde).

◆ **Transmission oro-oral** : Suite à des régurgitations, la cavité buccale peut être un réservoir transitoire et la transmission peut se faire de façon directe. Le cas le plus remarqué

chez les enfants nés de mères *Helicobacter pylori* positive, aussi chez les adolescents (maladies du baiser), parce que l' *Helicobacter pylori* a été isolée de la plaque dentaire et trouvée dans la salive.

◆ **Transmission gastro-orale** : Le risque de l'infection existe dans les salles d'endoscopie, chez les gastroentérologues (défaut d'utilisation de gants), aussi la possibilité du risque de la transmission d'un malade à un autre par la fibroscopie non stérilisée.

3.6.3 / Pouvoir pathogène d' *Helicobacter pylori*

L'implantation gastrique d' *Helicobacter pylori* est facilitée par plusieurs facteurs :

◆ **Mobilité** : La mobilité permet à *Helicobacter pylori* de se mouvoir dans le mucus mieux que d'autres bactéries. La mobilité particulière d' *Helicobacter pylori* est non seulement due à sa forme spiralée, mais aussi à six flagelles unipolaires engainés. Les filaments sont constitués de l'assemblage polymérique de flagellines majeurs Fla A et Fla B. Ces filaments sont protégés de l'acidité gastrique par une gaine membranaire terminée par un tube (Skouloubris et al., 2000).

◆ **Colonisation** : *Helicobacter pylori* résiste à l'acidité gastrique grâce à la production de l'uréase. Cette enzyme a besoin d'ion Ni^{2+} au niveau des sites actifs pour hydrolyser l'urée qui est normalement présente dans l'estomac en produisant du dioxyde de carbone et de l'ammoniac. Chaque bactérie se retrouve dans un microenvironnement tamponné qui la protège de l'acidité gastrique. Ceci ne signifie pas que *Helicobacter pylori* peut pousser ou même survivre longtemps en milieu très acide, mais seulement qu'il possède un moyen de défense transitoire qui lui permettra la colonisation (Monteiro, 1995).

◆ **Adhérence** : L'observation histologique de biopsie a révélé qu' *Helicobacter pylori* est trouvée majoritairement dans la couche de mucus mais à proximité de la surface des cellules épithéliales gastriques. L'adhésion est due à deux types d'adhésines: *Adhésine Bab A* et *Adhésines homologues Alp A et Alp B* (Skouloubris et al., 2000) :

3.6.4/ Inefficacité du système immunitaire

Suite à l'infection par *Helicobacter pylori*, l'hôte exerce une réponse immunitaire à la fois humorale et cellulaire. Pour échapper à ce système de défense, *Helicobacter pylori* peut soit produire des antigènes extrêmement immunogènes ou des enzymes.

❖ **Immunogénicité** : la réponse immune se manifeste sous forme d'IgM, pendant les premières semaines et d'IgG dans la phase chronique. Les immunoglobulines devraient

pouvoir limiter l'infection en agissant sur la mobilité et sur l'adhérence, ce qui n'est pas le cas avec des IgG et des IgM qui sont produites, mais elles sont sensibles aux protéases présentes dans l'environnement gastrique et se fixent de manière non spécifique (Sobhani et *al.*, 1995).

❖ **Enzymes :**

◆ *Catalase*: elle hydrolyse H₂O₂ et contribue à la protection d' *Helicobacter pylori* vis-à-vis des défenses de l'hôte (Sobhani et *al.*, 1995).

◆ *Sialidase*: elle peut avoir des effets délétères selon plusieurs mécanismes en altérant le mucus et en révélant des sites de liaison à la muqueuse (Dwarakanath et *al.*, 1994).

◆ *Phosphorylase* : les souches rencontrées chez les ulcéreux, produisent plus de phosphorylase que les autres (Fennerty, 1994).

3.6.5 Endommagement de la muqueuse gastrique

La bactérie traverse la muqueuse gastrique, la couche du mucus et vient se fixer sur les cellules épithéliales en provoquant des lésions qui sont dues à la synthèse d'uréase et de la cytotoxine Vac A. L'ammoniac libéré par *Helicobacter pylori* peut agir directement comme cytotoxine sur les cellules gastriques et peut gêner la respiration mitochondriale et cellulaire en réduisant la viabilité de la cellule, entraînant les lésions de la muqueuse (Sobhani et *al.*, 2000).

La lésion de base de l'infection à *Helicobacter pylori* est une gastrite, c'est-à-dire, une inflammation de la muqueuse gastrique. Elle peut évoluer vers d'autres pathologies telles que l'ulcère, gastrite et cancer gastrique. *Helicobacter pylori* a été liée à une liste de pathologies en dehors des régions gastroduodénales y compris la maladie du cœur, de quelques désordres auto-immuns (état inflammatoire chronique de la peau) (Megraud, 1994).

II/ BACTERIES LACTIQUES ET PROBIOTIQUES

1/ Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes procaryotes, hétérotrophes et chimio organotrophes (De Roissart, 1986). Elles se caractérisent par une production de quantités importantes d'acides lactiques résultants du métabolisme des sucres (fermentation lactique) (Choisy, 1987).

Les bactéries lactiques sont des cocci ou des bâtonnets Gram positif, immobiles, sporogènes, non pigmentés, anaérobies mais aérotolérantes, ne réduisent pas les nitrates et ne produisent pas de catalase (Choisy, 1987 ; Larpent, 1989), à l'exception de quelques souches qui possèdent une pseudo catalase et qui peuvent apparaître catalase positive (De Roissart, 1986 ; Guiraud, 1998).

Certaines espèces produisent au moins 1,8 mole d'acide lactique par mole de glucose fermentée, ce sont des bactéries lactiques homofermentaires (fermentation homolactique) d'autres produisent environ une mole d'acide lactique par mole de glucose fermentée et des quantités appréciables de produits secondaires, principalement du gaz carbonique, de l'éthanol et de l'acide acétique, ce sont des bactéries lactiques hétérofermentaires (fermentation hétérolactique) (Choisy, 1987)

Les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles nombreuses, elles ne peuvent croître facilement que dans des milieux riches en vitamines, bases nucléiques et en sources de carbone et d'azote (Fliss et *al.*, 2001).

Les bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène, mais de trop grandes teneurs peuvent leur être néfastes. Ceci peut probablement être relié au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est produit dans les cellules en présence d'air. L'eau oxygénée doit être éliminée sinon son accumulation devient toxique. Le système le plus efficace d'élimination du H₂O₂ est une enzyme nommée catalase dont les bactéries lactiques sont déficientes. Les bactéries lactiques possèdent plutôt une peroxydase, moins efficace que la catalase. Ainsi, comme les bactéries lactiques n'éliminent pas facilement le peroxyde, elles sont considérées comme micro-aérophiles (Biavati et *al.*, 2000).

2 / Les lactocoques : Streptocoques lactiques mésophiles

Les lactocoques sont des bactéries lactiques mésophiles appartenant à la famille des *Streptococaceae*. Ils se trouvent principalement dans les laits et crèmes fermentées ainsi que dans les fromages où ils sont en quantité dominante (Alais, 1984).

2.1/ Principaux caractères

Les lactocoques se présentent sous forme de coques (1 µm de diamètre), isolés, en paires ou en chaînettes (Singleton, 1984).

Ce sont des organismes homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L (+), catalase négative, anaérobies facultatifs ou microaérophiles (Dellaglio, 1994). Leur température de croissance optimale est de 20 à 30°C. Elles peuvent croître à 10°C mais pas à 45°C (Alais, 1984). La distinction entre les espèces et les sous-espèces de *Lactococcus* est donnée par le tableau 1.

2.2/ Classification et nomenclature

Traditionnellement, les streptocoques lactiques mésophiles ont été rattachés au genre *Streptococcus*. En se fondant sur des critères moléculaires, Schleifer et al. (1985) ont proposé de séparer les streptocoques lactiques mésophiles du genre *Streptococcus* et de créer le genre *Lactococcus*.

Actuellement, ce genre regroupe plusieurs espèces et sous-espèces dont les plus importantes en industrie laitière sont (Dellaglio, 1994):

- *Lactococcus lactis subsp. lactis* ;
- *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* ;
- *Lactococcus lactis subsp. crémoris*.

Tableau 1 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des lactocoques.

	<i>Lactococcus. lactis</i> <i>subsp cremoris</i>	<i>Lactococcus.Lactis</i> <i>Subsp lactis</i>	<i>Lactococcus. Lactis</i> <i>subsp lactis</i> <i>diacetylactis</i> <i>Lactis biovar</i>
Groupe sérologique	N	N	N
GC %	39-40	39-40	39-40
Hémolyse	γ	γ	γ
Type Fermentaire	Homo	Homo	Homo
Croissance à :			
10°C	+	+	+
30°C	+	+	+
45°C	-	-	-
Croissance en présence de NaCl :			
2%	+	+	+
4%	-	+	+
6,5%	-	-	-
Croissance à pH 9,6	+	-	+
Milieu bilié	-	-	-
Résistance 30 min à 63 °C	v	v	v
LS	+	v	+
Hydrolyse de l'arginine	+	-	+
Résistance au tellurite	.	.	.
LT	ARC	ARC	ARC
Fermentation du citrate	-	-	+
Acétoïne	+	-	-
Gélatinase	-	-	-
Hydrolyse de l'amidon	-	-	-
CO ₂ sur citrate	+	-	-
Sucres fermentés :			
Glucose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Saccharose	-	+/-	+/-
Maltose	-	+	+
Pentoses	-	+/-	+/-
Mannitol	-	+/-	+/-
Mélibiose	-	-	-

Source : Guiraud, (1998).

Symboles :

+ : Positive pour la plupart des souches

v : variable

A : acidification

R : réduction

LT : Lait tournesolé.

LS : Lait de Sherman

. : Non déterminé

C : coagulation

2.3/ Habitat

Les Lactocoques peuvent être isolés du lait ou des végétaux qui constituent, probablement leur réservoir naturel mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Jones, 1978).

◆ *Lactococcus lactis subsp. lactis* qui fut isolé pour la première fois par Lister en 1873 du lait fermenté et est reconnu comme agent primaire de l'acidification du lait caillé (Sandine, 1988).

◆ Ce genre est facilement isolé du lait cru mais peut l'être d'autres habitats en particulier des végétaux ; on le retrouve aussi dans la flore minoritaire du rumen (10^4 cellules par gramme) (Dellaglio, 1994).

◆ L'ancienne sous-espèce *diacetylactis* de *Lactococcus lactis* serait plus liée aux végétaux (Jones, 1978).

◆ *Lactococcus lactis subsp. cremoris* serait plus exclusivement adapté au lait mais son isolement est plus difficile, sa concentration y étant faible (Sandine, 1988).

2.4/ Exigences nutritionnelles

Les lactocoques se caractérisent sur le plan nutritionnel par une importante déficience biosynthétique (Thomson, 1985). Ils requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés mais d'autres facteurs de croissance sont nécessaires à leur multiplication, en particulier des acides aminés et des vitamines de groupe B (tableau 2) (Konning, 1994).

Tableau 2 : Besoins nutritionnels des lactocoques

Substances de croissance	<i>Lc.Lactis subsp.lactis</i>	<i>Lc.Lactis subsp.cremoris</i>	<i>Lc.Lactis subsp.lactis biovar diacetylactis</i>
Acides aminés			
Lysine	-	-	-
Leucine	+	+	+
Histidine	+	+	+
Valine	+	+	+
Cystéine	S	+	S
Aspartate	nd	nd	nd
Glutamate	+	+	+
Isoleucine	+	+	+
Tyrosine	nd	nd	nd
Méthionine	+	+	+
Vitamines			
Vit. B12	+	+	+
Biotine	+	+	+
Niacine	+	+	+
Panthothécate	+	+	+
Riboflavine	+	+	+
Thiamine	+	+	+
Pyridaxol	+	+	+
Acide folique	+	+	+
Acides organiques			
Acide acétique	+	+	+
Acide oléique	+	+	+
Acide orotique	nd	nd	nd
Acide formique	nd	nd	nd
Acides nucléiques			
Hypoxanthine	S	-	-
Adénine	S	S	-
Guanine	S	-	-
Thymine	S	-	-
Thymidine	S	-	-
Uracile	S	-	-

Source : Konnings, (1994).

Symboles :

+ : Essentiel à la croissance, - : Non requise pour la croissance, S : Stimulant, nd : Non déterminé.

3 / Effets probiotiques des bactéries lactiques

3.1/ Probiotiques

Le concept des probiotiques provient d'un chercheur et prix Nobel russe, Elie Metchnikoff, qui avait pour théorie que la longévité des paysans bulgares étaient directement liée à leur consommation de laits fermentés (Gournier-Château et *al.*, 1994). Metchnikoff avait proposé l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des bactéries lactiques, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie (Sanders, 2000).

Le terme "probiotique" a été proposé pour la première fois par Parker, (1974), pour désigner les micro-organismes et substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la microflore intestinale. Plus tard, Fuller, (1991), a redéfini les probiotiques de la façon suivante : " Préparations microbiennes vivantes, utilisées comme additif alimentaire, ayant une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale."

Récemment, la définition de probiotique s'est précisée : "tout micro-organisme vivant qui, une fois ingéré en certaine quantité, exerce des effets bénéfiques au-delà des fonctions nutritionnelles de base" (Gournier-Château et *al.*, 1994).

De façon plus spécifique, pour qu'un microorganisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique il doit présenter les caractéristiques suivantes (Stanton et *al.*, 2001; Dilmi Bouras, 2006 et Dilmi Bouras et *al.*, 2007) :

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

3.2 / Microorganismes probiotiques

Des enquêtes alimentaires (Fuller, 1991) ont montré l'augmentation significative de la consommation d'aliments riches en probiotiques. Ce comportement

alimentaire nouveau conduit positivement à des changements désirables dans le tractus gastro-intestinal de l'homme.

Parmi les changements désirables exercés par ces genres bactériens, il convient de citer la compétition à l'adhésion au mucus intestinal, l'antagonisme bactérien, la composition vis-à-vis des nutriments, la production d'acides organiques comme produits de fermentation, la stimulation de la réponse immunitaire et enfin l'intervention dans le métabolisme du cholestérol et des acides biliaires (Gibson et Roberfroid, 1995).

Les principaux microorganismes, à caractère probiotique sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Microorganismes à caractère probiotique

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	Autres bactéries lactiques	Autres microorganismes
<i>L. acidophilus</i>	<i>B.adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L.casei</i>	<i>B.animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>E-coli strain nissle</i>
<i>L.cripatus</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionobacterium sp.</i>
<i>L.bulgaricus</i>	<i>B.infantis</i>	<i>Leuconostoc sp.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiea</i>
<i>L.gallinarum</i>	<i>B.lactis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L.gasseri</i>	<i>B.longum</i>	<i>Sporolactobacillus irudinus</i>	
<i>L.johnsonii</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L.paracasei</i>			
<i>L.plantarum</i>			
<i>L.reuteri</i>			
<i>L.rhamnosusGG</i>			

Source: Holzapfel et al.(2001)

Toutes ces propriétés ont donné aux médecins et nutritionnistes l'idée de sélectionner des souches de bactéries lactiques destinées à être additionnées vivantes dans des aliments fermentés ou bien de préparations bactériennes appelées ainsi probiotiques (Goldin et Grorbach, 1992).

3.3/ Effets des probiotiques sur la santé

Aujourd'hui, le rôle que peuvent jouer les microorganismes probiotiques dans les situations de déséquilibre de la microflore intestinale et de ses activités métaboliques apparaît de plus en plus important, diversifié et de retombé sanitaire positif chez le sujet qui les reçoit. Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été observés suite à la consommation des probiotiques (Bleichner et *al.*, 1997) :

◆ **Probiotiques et les infections gastro-intestinales** : Les microorganismes probiotiques ont la capacité d'inhiber voire de détruire certaines microorganismes pathogènes et en particulier ceux d'origine entérique (Saavedra et *al.*, 1994).

Des essais réalisés chez l'homme par Marteau et *al.*, (1993) ont montré que certains probiotiques pourraient aider à éradiquer certains microorganismes pathogènes chez des porteurs chroniques de *Salmonella*, *Campylobacter* et *Clostridium*. Les mêmes observations ont été faites vis-à-vis de *Chigella dysenteriae* (Misra et Kulia, 1995), *Yersinia enterocolitica* (Ozbas et Aytac, 1995) et *E. Coli* (Fujiwara et *al.*, 1997).

Autres études cliniques ont démontré que les infections gastrointestinales causées par *Helicobactère pylori*, la diarrhée du voyageur, diarrhée due aux rotavirus, diarrhée associée aux antibiotiques, peuvent être contre carrées avec succès par l'utilisation de probiotiques (Van Niel et *al.*, 2002 ; Felley et Michetti, 2003).

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

Selon certaines études, les bactéries probiotiques ont la propriété d'inhiber les processus conduisant à la formation du cancer du colon chez l'homme (matsumoto et Benno, 2004). L'activité métabolique de ces germes induit un certain nombre de changements dans l'environnement intestinal et parmi lesquelles il convient de citer :

- Acidification du suc intestinal par la production d'acides organiques tels que l'acide acétique et l'acide lactique (Ibrahim et Bezkorovainy, 1993 ; Bielecka et *al.*, 1998).

- Production de substances antibactériennes telles que les bactériocines qui inhibent la croissance des espèces appartenant aux genres *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Shigella* ainsi que *vibrio cholera* (Gibson et Wang, 1994 ; Yildirim et Johnson, 1998).
- Modification du potentiel d'oxydoréduction.
- Modification de toxines ou de récepteurs toxiques (Braegger, 2002).

♦ **Probiotiques et le système immunitaire** : Parmi les effets des bactéries lactiques chez l'homme, ceux concernant la stimulation des fonctions immunitaires sont les plus prometteurs et les mieux étudiés (Moreau, 2005).

Une étude réalisée par Link –Amster et *al.*, (1994) montre que des échantillons de sang prélevés sur des sujets consommant des laits fermentés, additionnés de *L. acidophilus* et des bifidobactéries, et une forme atténuée de *Salmonella typhi* présentent une plus forte augmentation de la réponse humorale en IgA que des sujets n'ayant pas pris le lait fermenté.

En outre, Salminen et Salminen (1997) indiquent que l'interaction d'adhésion des probiotiques à la surface mucosale facilite le contact avec le médiateur local du tissu lymphoïde. L'association de ce dernier à l'intestin déclenche l'immunisation de tout le système et la stabilisation de la fonction "barrière" du mucus. Ce système fonctionne en provoquant une augmentation de la production des IgA (Immunoglobuline A), IgG (Immunoglobuline G), IgM (Immunoglobuline M), cytokines anti-inflammatoires, interleukines 10 et d'interférons (ces deux dernières molécules servant de signaux de communication entre cellules au cours de la réponse immunitaire) (Aattouri et Lemonier, 1997).

Les probiotiques ont aussi la propriété de réduire ou supprimer les réponses immunitaires induites par les ingrédients alimentaires en induisant la tolérance orale et prévenant les allergies (Moreau, 2005).

♦ **Probiotiques et l'intolérance au Lactose**

La consommation de laits fermentés par des sujets déficients en lactase contribue à réduire plus de 90 % de leur intolérance au lactose (Marteau et *al.*, 1990), cette anomalie est due à une faible activité en lactase intestinale sur les entérocytes des villosités situées dans la bordure en brosse du jéjunum (Sahi, 1994 ; Jiang et *al.*, 1996).

♦ **Probiotiques et l'hypercholestérolémie**

Plusieurs études ont montré que la consommation de yogourt ou de lait fermenté contenant des probiotiques entraîne une diminution du taux de cholestérol dans le sang, et par

conséquent la réduction des risques d'hypercholestérolémie responsable des maladies coronariennes (Dilmi-Bouras, 1991 ; Dilmi-Bouras, 2006).

Modler et *al.* (1990) ont montré que les bactéries lactiques produisent de l'hydroxyméthylglutarate, qui inhibe l'enzyme hydroxyméthylglutaryl – réductase intervenant dans la synthèse du cholestérol.

Une autre étude réalisée par Dilmi Bouras et Sadoun (2002) a montré que *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* du yoghourt YB3, en association, sont à l'origine de la diminution des taux élevés du cholestérol total, du cholestérol des HDL et du cholestérol des LDL *in vivo* (chez le lapin).

◆ *Autres effets sur la santé*

Certains effets bénéfiques des probiotiques ont été également observés chez l'homme :

- Les bactéries du yogourt semblent augmenter la concentration des vitamines du groupe B, elles approvisionnent globalement le lait en vitamines (Naidu et *al.*, 1999).
- L'ingestion de quelques bactéries mésophiles, notamment *Lactobacillus casei*, diminue significativement la glycémie d'après les tests réalisés en 1997 (Lievin et *al.*, 2000).
- La consommation des probiotiques par des sujets atteints d'hypertension peut diminuer leur pression sanguine (Nakajima et *al.*, 1995).
- Les probiotiques peuvent augmenter l'absorption intestinale du calcium chez les femmes pendant et après la ménopause (Naidu et *al.*, 1999).
- Chez les personnes âgées, une légère constipation peut être partiellement corrigé par la consommation de lait fermenté (Bouley, 1993).

III / EFFETS ANTIMICROBIENS DES BACTERIES LACTIQUES

1/ Antagonisme microbien

L'antagonisme est un phénomène très complexe, résultant de nombreuses activités connues, il influe sur les caractères morphologiques des microorganismes et divers processus physiologiques telle que la capacité de la production de pigments (Bourgeois et *al.*, 1996). L'antagonisme est une relation d'exclusion qui s'établit entre des espèces microbiennes entrant en compétition dans un même milieu. Lorsque se crée une relation antagoniste entre deux espèces microbiennes vivantes dans le même milieu, le développement d'une espèce se trouve affectée par la présence de l'autre (Singleton, 1984).

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

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

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

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

2 / Activité antimicrobienne des bactéries lactiques

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

2.1/ Production d'acides organiques

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

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

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

◆ **Effet inhibiteur spécifique** : L'effet inhibiteur spécifique des acides organiques est généralement attribué à leur forme non dissociée. Cette forme pénètre librement dans la

cellule où elle s'ionise, ce qui provoque un abaissement de pH interne et un blocage de certains mécanismes de transport (Pernoud et *al.*, 2005).

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

2.2/ Formation du peroxyde d'hydrogène

La consommation de l'oxygène dissous par les bactéries lactiques, aboutit en présence d'un substrat oxydable à la formation de composés de réduction de l'oxygène : anion superoxyde (O^{2-}), peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'eau (H_2O). Les deux premiers composés sont très toxiques pour la cellule, et les microorganismes aérobies disposent d'un équipement enzymatique permettant leur élimination. Chez les bactéries lactiques, seules les enzymes aboutissant à la formation de H_2O_2 et de H_2O ont été identifiées, mais l'anion superoxyde peut apparaître comme composés intermédiaires (Nicoli et Pénaud, 1985).

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

L'importance de l'accumulation dépend largement du substrat glucidique disponible, par exemple pour un *Streptococcus lactis*, la production de H_2O_2 est plus importante en présence de galactose qu'en présence de glucose ou de lactose. Pour éliminer le peroxyde d'hydrogène, les bactéries lactiques ne disposent pas de catalase à groupement hémique. Cependant certaines d'entre elles présentent une activité catalasique, lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux renfermant du sang ou des groupements hémiques, d'autres présentent une activité pseudo-catalasique faisant intervenir des enzymes sans hème.

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

▪ La lactoperoxydase catalyse l'oxydation du thiocyanate par le peroxyde d'hydrogène en formant un composé inhibiteur.

▪ La lactoperoxydase et le thiocyanate sont présents initialement dans le lait ; le peroxyde d'hydrogène est produit par les bactéries lactiques. Le facteur limitant de ce système est le H₂O₂. L'addition au lait de peroxyde à faible concentration peut rendre ce système actif contre certaines espèces Gram négatifs, même catalase positive Comme *E. coli*, *Salmonella* ...etc.

▪ Le chauffage du lait, en inactivant la Lactoperoxydase (70 °C, 20 minutes ou 82°C, 20 secondes) supprime cette inhibition (Demazeaud, 1990).

2. 3/ Action de diacétyle

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

2. 4/ Production de bactériocines

Une bactériocine est une substance de nature protéique possédant une activité antimicrobienne produite par une bactérie. La production d'une bactériocine peut être considérée comme une façon d'éliminer des bactéries envahissantes (Nissen-Meyer et *al.*, 1997). Le spectre d'activité d'une bactériocine se définit comme étant la diversité des bactéries sensibles à l'action bactéricide ou bactériostatique du peptide. Un spectre d'activité limité aux bactéries taxinomiquement proches de la bactérie productrice a été attribué aux bactériocines (Tagg et *al.*, 1976).

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

Le nom de bactériocine est généralement dérivé du germe ou de l'espèce bactérienne productrice: Colcine (*d'Escherichia coli*), helveticine (*Lb. helveticus*), pediocine (*Pediococcus sp.*), sakacine (*Lb. sakei*), Leucocine (*Leuconostoc sp.*) (Boufennara et Bounab, 1995).

2.4.1/ Classement des bactériocines

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

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

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

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

- Le sous-groupe II est composé des bactériocines formées d'un seul peptide. Certaines de ces bactériocines sont apparentées à la pédiocine. Ces peptides ont la particularité d'être actifs contre le genre *Listeria*. Parmi ces bactériocines : Bavarcine MN ; carnobactériocines BM1 et B2, curvacine A, enterocine A, Leucocine A, pédiocine PA1 et sakacine P.

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

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

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

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

2.4. 2/ Caractéristiques biochimiques des bactériocines de *Lactococcus lactis*

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

◆ La souche productrice de la *lacticine 3147* et *L. lactis* DPC3147 (Ryan *et al.*, 1996). La *lacticine 3147* possède un large spectre d'inhibition. Elle est active contre certaines bactéries des genres suivants : *Acetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *staphylococcus* et *Streptococcus*. Deux peptides sont nécessaires à son activité antimicrobienne puisque la combinaison de deux fractions résultant d'une purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), sur matrice de C₁₈, est nécessaire pour que cette bactériocine exprime son activité.

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

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

L'activité de la *lactococcine R* reste stable après un traitement de 15 minutes à 121 °C, son activité est conservée de pH 2,0 à pH 9,0. Les protéases α -chymotrypsine, pepsine,

Pronase E et Protéinase K affectent son activité, tandis que l'amylase, la catalase, la cellulase, la dextranase, la lipase, le lysozyme, la papaïne, la peroxydase, la trypsine ainsi que divers solvants organiques ne l'ont pas affectée.

◆ Il existe deux types de nisine, la nisine A et la nisine Z (Mulders et *al.*, 1991 ; Steen et *al.*, 1991). Ces deux bactériocines ne diffèrent que par un seul acide aminé. La nisine A possède, à la position 27 un résidu histidine tandis que sur la nisine Z on y retrouve un résidu asparagine. La nisine est produite par plusieurs souches de *L. lactis* ssp. *Lactis*, dont la souche *L.lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 pour la nisine A et la souche *L. lactis* ssp.*lactis* NIZO22186, dans le cas de la nisine Z, ce lantibiotique possède un large spectre d'inhibition. La nisine inhibe en effet la majorité des bactéries à Gram positif dont *Listeria* et *Clostridium*, tandis que les Gram négatif sont généralement résistantes à la nisine. L'activité de la nisine est moins sensible à la chaleur à pH acide, étant stable à 115,6 °C à pH 2.

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

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

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

2.4.3/ Caractéristiques des déterminants génétiques

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

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

bactériocinogènes et la protéine d'immunité sont portés par le même gène (Le Loir et *al.*, 2001).

2.4.4/ Mode d'action

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

- L'adsorption de la bactériocine sur les récepteurs spécifiques ou non spécifiques de la membrane des cellules sensibles ;

- modification pathologique de la cellule cible.

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

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

Les bactériocines peuvent avoir trois types d'effets :

- Effet bactériostatique : se manifeste par un ralentissement ou arrêt de la croissance telle que la lactocine 27 (Piard et *al.*, 1992).

- Effet bactéricide : se traduit par une perte de la viabilité avec une lyse cellulaire, telles que la nisine et la curvacine IFPL 105 (Casla et *al.*, 1996).

- Effet bactéricide sans lyse cellulaire telle que la pédiocine SII (Schved et *al.*, 1994).

2.4.5/ Facteurs influençant la production de bactériocines

- ♦ **Souche microbienne:** Différentes espèces de bactéries lactiques sont capables de produire des bactériocines. Yang et Ray (1994) ont constaté que le taux de production de nisine et Leucocine varie selon la souche.

De vuyst, (1994) a sélectionné 21 souches de *Lactococcus lactis* productrices de nisine et 06 de la même espèce non productrices. De même que le titre de la nisine variait de 1 à

1886 UI/ml. Cette différence entre les souches d'une même espèce est attribuée à la différence du niveau d'expression et d'activité des enzymes de maturation.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Davey et Richardson (1981) ont trouvé que la diplococcine est synthétisée durant la phase de croissance. Pour la nisine, elle a lieu lorsqu'on dépasse la moitié de la biomasse formée. Cependant un temps d'incubation excessif, conduit à une perte d'activité, ceci est dû à la sécrétion d'enzymes protéolytiques et à l'apparition d'inactivateurs spécifiques à ces substances (Hurst, 1981).

2.4.6/ Domaines d'application des bactériocines

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

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

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

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

Les bactéries lactiques sont depuis des millénaires utilisées pour leur qualité de "préservateurs" alimentaires. Cette préservation vis-à-vis des contaminants bactériens peut s'exercer selon deux schémas non exclusifs qui sont la compétition pour les nutriments et la production de métabolites tels que les acides organiques, dont bien entendu l'acide lactique,

mais également de diacétyl, l'acétoïne, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines. Tous ces composés participent au contrôle de la flore bactérienne et ont un impact important sur la durée de vie de l'aliment ainsi que sur ses qualités gustatives (Morisset et *al.*, 2005).

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

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

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

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

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

Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'utilisation de la nisine (2000UI/g) dans le fromage blanc, au bout de trois jours d'incubation à 20 °C (Ferreira et Lund, 1996). La nisine est également utilisée au cours des procédés de fabrication du yoghourt pour diminuer les contaminations dues aux bactéries à Gram positif (*Bacillus et Listeria*). Cependant l'inhibition de ces germes nécessite de fortes concentrations de nisine (entre 10 000 et 20 000 UI/ml) (Morisset et *al.*, 2005).

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

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

▪ **Produits carnés** : Des études récentes font le point sur les connaissances actuelles sur les bactériocines susceptibles d'être utilisées dans l'industrie de la viande et du poisson.

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

Katla et *al.*, (2001) ont utilisé la Sakacine P (1,1 µg/g) seule ou en combinaison avec une culture de souche productrice *Lb. sakei* (103 CFU/g), ils ont observé une meilleure conservation à 10 °C sous vide en utilisant la mixture que dans le cas où chacun des constituants était utilisé seul.

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

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

PARTIE EXPERIMENTALE

L'ensemble de ce travail a été réalisé au laboratoire de bioressources naturelles locales du département des sciences alimentaires, université Hassiba Benbouali de Chlef, et au laboratoire d'hygiène de la wilaya de Chlef.

I/ MATERIELS ET METHODES

1/ Matériels

1.1/ Matériel biologique

a) Les souches de *Lactococcus lactis*

Les souches de *Lactococcus lactis* utilisées ont été isolées à partir des laits de vaches, chèvres et brebis et identifiées par Nehal (2006). Les cellules sont conservées dans le bouillon M17 à une température de -20°C.

Les souches utilisées sont les suivantes :

13 souches de *Lactococcus lactis subsp lactis* (*Lc. l₁*, *Lc. l₂*, *Lc. l₃*,... et *Lc. l₁₃*), 4 souches de *Lactococcus lactis subsp cremoris* (*Lc. c₁*, *Lc. c₂*, *Lc. c₃* et *Lc. c₄*) et 4 souches de *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacetylactis* (*Lc. d₁*, *Lc. d₂*, *Lc. d₃* et *Lc. d₄*).

b) Bactéries pathogènes

◆ Les bactéries pathogènes ont été isolées au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Chlef à partir des selles des patients présentant des troubles digestifs et des diarrhées infectieuses.

Les souches isolées sont :

- *Escherichia coli*.
- *Salmonella typhi*.
- *Citrobacter freundii*.
- *Clostridium perfringens*.
- *Staphylococcus aureus* (S1)

◆ *Staphylococcus aureus ssp aureus* (S2) utilisée sous forme déshydratée porte la référence : ATCC33862.

◆ *Helicobacter pylori* a été isolée à partir des biopsies gastriques obtenues d'un patient présentant un ulcère, ayant subi une endoscopie digestive.

Les biopsies doivent être prélevées à environ 2 cm du pylore pour l'examen bactériologique. Deux à trois fragments sont mis dans du sérum physiologique, un fragment est mis dans le milieu urée-indole (pour le test rapide à l'urée) (Sobhani et *al.*, 1995).

c) Lait entier en poudre (marque « suisse lait »), utilisé pour étudier l'évolution du pH et de l'acidité Dornic des bactéries lactiques (Larpen, 1996).

1.2/ Milieux de culture

- Le milieu M17 bouillon et agar (réf. 1.15029.Terzaghi-Merck) est utilisé pour l'enrichissement et le dénombrement des Lactocoques (annexe I).
- Le milieu SFM (Sélinite acide de sodium) (Institut Pasteur d'Alger), additionné aux disques SFB, est utilisé pour l'enrichissement des entéropathogènes.
- Le milieu gélose Hektoen (Institut Pasteur d'Alger) est utilisé pour l'isolement de *S.typhi*.
- Le milieu gélose EMB (Eosine méthyle bilié) (Institut Pasteur d'Alger) utilisé pour l'isolement d' *E.coli*.
- Gélose Chapman (Institut Pasteur d'Alger) utilisé pour l'isolement de *S. aureus*.
- Gélose VF (Viande foie) (réf. 259100. DIFCO) employé pour isoler *C. perfringens*.
- Gélose nutritive (Institut Pasteur d'Alger) employée pour isoler *C. freundii*.
- Le bouillon nutritif (Institut Pasteur d'Alger) est utilisé pour le broyage de la biopsie gastrique.
- Le bouillon glucose tamponné (BGT) (Institut Pasteur d'Alger) additionné au sang de cheval est utilisé pour l'enrichissement d' *H. pylori* (annexe I).
- Le milieu gélose chocolat (G.C.II) (réf. 212307.Becton et Dickinson) additionné au sang de cheval, est une base servant pour l'isolement d' *H. pylori* (annexe I).
- Le sang de cheval citraté (en ampoule) (Institut Pasteur d'Alger) utilisé pour enrichir les milieux spécifiques pour *H. pylori*.
- Galeries API 20 E (réf. 20 100 BioMérieux) utilisées pour l'identification des caractères biochimiques de : *S.typhi*, *E. Coli*, *C.freundii*.
- Milieux d'identification des caractères biochimiques de *C.perfringens*, *S.aureus* et *H. pylori*.
- Le milieu TSI (réf. 64384.Bio-rad) utilisé pour la mise en évidence de la fermentation des sucres (lactose, saccharose et glucose).

- Le milieu Mueller Hinton agar (Institut Pasteur d'Alger) utilisé pour l'étude des interactions.

1.3/ Réactifs chimiques

- Sels biliaires en poudre (Réf. 4054-Merck).
- Acide Chlorhydrique pur (HCl).
- Hydroxyde de sodium 1N (NaOH).
- Solution physiologique de chlorure de sodium NaCl (9 g/l)
- Ethanol absolu 96°.
- Lugol
- Fuschine.
- Violet de gentiane

2 / Méthodes

2.1/ Repiquage et revivification des Lactocoques

Les bactéries lactiques utilisées sont sous forme congelée en culture pure. Elles sont activées et maintenues par un repiquage avec 1 ml d'inocula dans 10 ml de milieu de croissance M17 préconisé par Terzaghi et Sandine (1975), et incubées à 30°C pendant 72 heures. Avant leur utilisation, un examen microscopique est nécessaire pour identifier les souches et contrôler leurs états de développement. Les tubes de repiquage sont conservés par congélation à - 18°C.

2.2/ Préparation de l'inoculum

Dans un tube à essai contenant 9 ml de bouillon de croissance M17, 1 ml de la culture pure est ajouté à l'aide d'une pipette stérile. Le bouillon est préalablement chauffé à 30 °C (Charge initiale de 10^7 bactéries/ml). Une bonne agitation est nécessaire pour rendre parfaitement homogène le mélange. L'incubation se fait dans une étuve à 30 °C pendant 3 heures. L'inoculum, contenant approximativement 10^9 bactéries /ml, est prêt à être utilisé pour les différentes expérimentations.

2.3/ Conditions de croissance

Le bouillon de croissance M17 est fraîchement préparé. Il est divisé en deux fractions dont l'une est additionnée de 0,3 % de sels biliaires, puis stérilisée à 121 °C pendant 15 minutes. Cette concentration en sels biliaires est largement supérieure à la

concentration maximale que peut sécréter la bile au niveau du duodénum. Les solutions sont réparties dans des tubes stériles à raison de 10 ml par tube.

Pour suivre la croissance des souches de *Lactococcus lactis* en cultures pures, ou en combinaisons en fonction du temps, nous avons préparé trois fois deux fractions de bouillon de croissance, en absence et en présence de 0,3 % de sels biliaires et à différents pH :

- pH 2,5 : représente le pH de l'estomac à jeûn;
- pH 4,5 : représente le pH de l'estomac au moment ou juste après le repas ;
- pH 6,5 : représente le pH au niveau des intestins (Ce pH est proche du pH du milieu M17).

A ces différentes fractions sont additionnées : 3 % d'inoculum de différentes souches de *Lactococcus lactis* (0,3 ml sont ajoutés à une quantité suffisante, pour 10 ml de M17), pour une concentration cellulaire initiale de l'ordre de 10^9 cellules/ml. Ces fractions sont incubées à 37 °C jusqu'à 72 heures. En parallèle, la préparation du témoin (M17 additionné de culture pure ou culture mixte sans sels biliaires à pH 7,2) est nécessaire. La croissance des souches est contrôlée par le dénombrement sur boîte de pétri à différents intervalles de temps (Dilmi-Bouras, 2002).

2.4/ Analyses microbiologiques

La croissance bactérienne à différents pH, en présence et en absence de 0,3 % de sels biliaires, est estimée par une technique de numération ou comptage direct sur milieu solide.

Cette technique consiste à préparer à partir du mélange (M17 + ferment ± Sels biliaires ± différents pH), des dilutions décimales successives dans de l'eau physiologique. Puis 1 ml des dilutions est ensemencé en profondeur dans le milieu de culture (M17 agar ± Sels biliaires ± différents pH). Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 48 heures (Terzaghi et Sandine, 1975).

2.5/ Etude du pouvoir acidifiant des Lactocoques

2.5.1/ Préparation du lait

120 grammes de poudre de lait entier sont dilués dans une quantité suffisante pour 1 litre de l'eau distillée stérile. Après homogénéisation, un traitement thermique important

est réalisé (90 °C pendant 5 minutes) qui va permettre la destruction de tous les germes indésirables et l'inactivation de nombreuses enzymes (Loones, 1994).

2.5.2/ Pouvoir acidifiant

Le pouvoir acidifiant est déterminé par la mesure de l'acidité Dornic du lait (ensemencé par les Lactocoques) à différents intervalles de temps (de 0 à 96 heures).

L'acidité Dornic est une expression de l'acidité développée dans un lait par transformation du lactose en acide lactique.

L'ensemencement du lait se fait à raison de 3 % d'inoculum (cultures pures ou combinaisons). L'incubation est réalisée à 30 °C pendant 96 heures.

Le titrage de l'acidité est effectué sur 10 ml de lait par une solution d'hydroxyde de sodium (0,11 N) en présence de quelques gouttes d'une solution éthanolique de phénolphtaléine à 1 % utilisée comme indicateur coloré (Bradly et *al.*, 1992).

L'acidité titrable est exprimée en degrés Dornic (°D), dans ces conditions 1 °D correspond à 0,1 ml de soude.

En parallèle à la mesure de l'acidité Dornic, le pH des lait sont mesurés à l'aide d'un pH-mètre type HANNA 211 à électrode combinée.

2.6/ Techniques d'isolement et d'identification des bactéries pathogènes

L'isolement des bactéries pathogènes est effectué à partir des selles de patients présentant les symptômes d'une infection digestive.

2.6.1/ Prélèvements

Les prélèvements s'effectuent par la mise des selles fraîches dans les flacons stériles hermétiquement fermés et munis d'une spatule, soit par un écouvillonnage rectal (dans le cas des nourrissons et enfants).

Les prélèvements doivent être examinés dans les quatre premières heures pour éviter toute dessiccation (la conservation est possible à 4 °C pendant 48 heures) (El hamzaoui et *al.*, 2000).

2.6.2/ Examens bactériologiques

a) **Enrichissement** : La méthode consiste à mettre un fragment de selles en suspension dans 5 ml du bouillon SFM, après homogénéisation, l'incubation se fait à 37 °C pendant 24 heures (Bourgeois et *al.*, 1996).

b) Isolement : A partir du milieu d'enrichissement et à l'aide d'une anse à platine, l'ensemencement d'une goutte du milieu est réalisé en stries sur les milieux sélectifs gélosés (tableau 4). Après 24 heures d'incubation à 37 °C, chaque souche présente des colonies caractéristiques (aspect, taille, couleur, contour).

Tableau 4: Milieux d'isolement des souches pathogènes.

Souches pathogènes	Milieux sélectifs
<i>S. typhi</i>	Hektoen
<i>C. freundii</i>	Gélose nutritive
<i>E. coli</i>	EMB (Eosine méthyle bilié)
<i>S. aureus</i>	Chapman
<i>C. perfringens</i>	VF (Viande foie)

Source: Guiraud, 1998.

Un examen microscopique après coloration de Gram est nécessaire pour confirmer l'identification des souches (annexe III).

c) Identification des caractères biochimiques

A partir des colonies caractéristiques présentes sur géloses sélectives, la détermination des caractères biochimiques spécifiques est réalisée pour vérifier l'appartenance des souches recherchées.

♦ Préparation de la suspension bactérienne

La suspension bactérienne est préparée dans 5 ml de l'eau physiologique à partir d'une colonie suspecte bien isolée à l'aide d'une anse à platine stérile (El hamzaoui et *al.*, 2000). L'incubation se fait à 37 °C pendant 15 minutes.

L'identification des souches (*E.coli*, *S. typhi*, *C. freundii*) est faite par ensemencement des galeries biochimiques API 20 E (annexe III). Les caractères biochimiques recherchés pour identifier *C. perfringens* sont: l'immobilité, la recherche de la nitrate réductase et la fermentation du lactose.

S. aureus est identifiée par la recherche de la coagulase libre et de l'acétoïne ou la réaction de Voges-Proskauer.

◆ Ensemencement d'une galerie API 20 E

Après incubation à 36°C ±2°C pendant 18-24 heures, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (tableau 5).

Tableau 5 : Tableau d'identification par galerie AP20E .

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTI ONS/ENZIMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	B-galactosidase (ortho NitroPhényl- βD-Galactopyranosidase)	incolore	Jaune (1)
ADH	L-argine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge/orangé (2)
LDC	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge/orangé (2)
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine Décarboxylase	jaune	rouge/orangé (2)
CIT	Trisodium citrate	0,756	Utilisation du CITrate	vert pâle/jaune	bleu-vert/bleu (3)
H ₂ S	Sodium thiosulfate	0,075	Production d' H ₂ S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir / fin liseré
URE	urée	0,76	URÉase	Jaune	rouge/orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	jaune	TDA / immédiat marron-rougeatre
IND	L-tryptophane	0,19	Production d'INDole	vert pâle/jaune	JAMES / Immédiat rose
VP	Sodium pyruvate	1,9	Production d'acétoïne (voges Proskauer)	incolore	VP1 + VP2 / 10 min. Rose / rouge (5)
GEL	Gélatine (Origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	Fermentation/oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune - gris
MAN	D-mannitol	1,9	Fermentation/oxydation (MANnitol)(4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	Fermentation/oxydation (INOsitol)(4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	Fermentation/oxydation (SORbitol)(4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	Fermentation/oxydation (RHAmmose)(4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	Fermentation/oxydation (SACcharose)(4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	Fermentation/oxydation (MELibiose)(4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	Fermentation/oxydation (AMYgdaline)(4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	Fermentation/oxydation (ARABinose)(4)	bleu / bleu-vert	jaune

Source: BioMérieux (2006)

- (1) une très légère couleur est également positive.
- (2) une couleur orange apparaissant après 36 – 48 heures d'incubation doit être considérée Négative
- (3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).
- (4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.
- (5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

◆ Ensemencement d'une galerie biochimique classique

Selon Marshall, (1982), la galerie biochimique classique peut contenir les tests présentés par le tableau 6.

Tableau 6 : Tableau de lecture d'une galerie biochimique classique.

Tests	Substrats	Réactions / enzyme	Résultats	
			Négatif	Positif
Uréase	Urée - indole	Possession d'une uréase	Orange	Rouge
Catalase	H ₂ O ₂	Possession d'une catalase	Pas de bulles	Présence de bulles
ONPG	2-Nitro-Phényl-Galactopyranoside	Bêta galactosidase	incolore	Jaune
LDC	L-lysine	L-décarboxylase	Violet	Jaune
ODC	L-ornithine	O-décarboxylase	Violet	Jaune
ADH	L-arginine	A-dihydrolase	Violet	Jaune
Mannitol Mobilité	D-mannitol	Dégradation du mannitol et voir la mobilité du germe	Rouge	Jaune
			Diffusion de la Bactérie à travers la ligne de croissance	
Citrate de Simmons	Citrate	L'utilisation du citrate comme source de carbone	Vert	Bleu

Source : Marshall (1982).

2.7/ Techniques d'isolement et d'identification d'*Helicobacter pylori*

2.7.1/ Techniques d'isolement

◆ *Test rapide à l'urée*

La méthode consiste à mettre un fragment dans un tube à essai stérile contenant 10 ml de l'urée indole. La lecture du résultat peut se faire après un repos de 60 minutes à température ambiante. L'activité uréasique de la bactérie présente dans la biopsie est indiquée par le changement de la couleur de l'urée-indole de l'orange au rose ou rouge (Cassel-Beraud et al., 1996).

◆ *Isolement*

Avant de procéder à l'isolement, la biopsie doit être broyée dans un mortier contenant 0,5 ml de bouillon nutritif, ce qui permet la dispersion des bactéries et leur libération des cellules du mucus.

La totalité du broyat estensemencée en strie dans des boites de pétri contenant la gélose chocolat. L'incubation se fait dans une jarre placée dans une étuve pendant 3 à 5 jours à 37°C (Bourgeois et *al.*, 1996).

◆ *Enrichissement*

Le milieu d'enrichissement utilisé est le bouillon glucose tamponné (BGT) additionné au sang de cheval. L'ensemencement se fait à partir de quelques colonies suspectes. Les tubes doivent être incubés dans une jarre sous atmosphère micro-aérophile à 37°C pendant 24 heures.

◆ *Purification*

A partir du bouillon d'enrichissement, une goutte est prélevée à l'aide d'une anse à platine, puisensemencée en stries dans des boites contenant la gélose chocolat. L'incubation se fait dans une jarre sous atmosphère micro-aérophile à 37 °C pendant 3 à 5 jours (Lamouliatte et *al.*, 1992). Un examen microscopique d'un frottis est nécessaire pour identifier la bactérie, en suivant la méthode de coloration de Gram (annexe III).

2.7.2/ Identification des caractères biochimiques

L'identification d' *Helicobacter pylori* se fait par ensemencement d'une galerie biochimique classique contenant les tests présentés par le tableau VI (Marshall, 1982). L'ensemencement se fait à partir d'un tube contenant 5 ml de l'eau physiologique additionnés d'une colonie suspecte prélevée à l'aide d'une anse à platine, et après une incubation pendant 15 à 30 minutes à 37 °C.

2.8/ Etude du pouvoir antibactérien des souches lactiques

Le pouvoir antibactérien des souches lactiques résulte de la présence de plusieurs substances inhibitrices (peroxyde d'hydrogène, acides organiques et bactériocines). La présence de la bactériocine est confirmée après élimination de l'effet des autres substances inhibitrices.

Les nombreuses méthodes décrites pour la détection de souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi-solide inoculé préalablement avec une souche cible. La production de bactériocine est détectée par le pouvoir inhibiteur du

microorganisme (culture entière ou surnageant) testé sur la croissance de germe cible (Barefoot et Klaenhammer, 1983).

2.8.1/ Préparation des précultures des souches lactiques

Après l'étude de la survie et le pouvoir acidifiant, les souches de *Lactococcus lactis* (pures ou en combinaisons) retenues sont activées avant leur utilisation dans les tests d'inhibition par transfert sur bouillon M17 (Terzagli et Sandine, 1975) puis incubées 24 heures à 30 °C afin d'obtenir des cellules jeunes avec un rendement maximal en substances inhibitrices.

2.8.2/ Préparation des précultures des bactéries pathogènes

Avant leur utilisation dans les tests d'inhibition les cinq bactéries pathogènes (*E.coli*, *S. typhi*, *S.aureus*, *Citrobacter freundii* et *C. perfringens*) sont activées par transfert sur bouillon nutritif. La souche d' *Helicobacter pylori* estensemencée dans le bouillon gélose tamponné (BGT) (Guiraud, 1998). Tous les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 heures.

2.8.3/ Dénombrement des souches avant interaction

Pour déterminer la charge bactérienne initiale (lactique ou pathogène) des numérations de colonies sur boîtes de pétri ont été réalisées.

Le principe consiste à préparer une série de dilutions décimales successives (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) obtenues par la répartition de 9 ml de l'eau physiologique dans des tubes stériles.

Le prélèvement de 1 ml s'effectue à partir de la solution mère (culture lactique pure ou combinaison ou culture pathogène) dans le premier tube pour avoir la dilution 10^{-1} .Après agitation, 1 ml est prélevé de la dilution 10^{-1} et transféré dans le deuxième tube pour obtenir la dilution 10^{-2} et ainsi de suite en ayant soin de changer la pipette entre chaque dilution.

1ml de chaque dilution estensemencé dans des boîtes de pétri qui sont coulées après par le milieu gélosé spécifique pour chaque bactérie (Beerens et Luquet, 1987).Pour l'ensemencement des souches lactiques (pures ou en combinaisons) le milieu utilisé est le M17-agar.

Le dénombrement se fait après 48 heures d'incubation à 30°C. Pour l'ensemencement de chaque souche pathogène, les boîtes sont coulées par le milieu spécifique cité auparavant. L'incubation est observée après 48 heures à 37 °C.

2.8.4/ Spectre antibactérien des souches

Les souches de bactéries lactiques sélectionnées sont testées pour leur pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion des disques (Savadozo et *al.*, 2004).

Les boîtes de pétri contenant le milieu Mueller Hinton agar, sont inondées par 1 ml de la préculture des bactéries pathogènes. Après un séchage de 30 minutes à 37 °C, des disques en papier buvard (6 mm de diamètre) imprégnés par 50 µl du bouillon des souches lactiques, sont déposés à la surface de la gélose, avec trois répétitions pour chaque souche lactique.

Les boîtes de pétri ainsi préparées sont préincubées dans des conditions réfrigérées pendant 2 à 4 heures à +4°C afin de permettre la diffusion de l'agent inhibiteur qui sera suivie par l'incubation pendant 24 heures à 37 °C.

Le diamètre des zones d'inhibition apparaissant autour des disques est mesuré par le calcul de la moyenne des deux diamètres perpendiculaires (exprimés en mm).

L'inhibition est notée positive si le diamètre est supérieure à 2 mm (Vaughan et *al.*, 1992). Pour voir l'action bactéricide ou bactériostatique sur les germes pathogènes, les boîtes de pétri sont déposées à l'étuve à 37°C pendant un mois.

L'action bactériostatique est exprimée par la réapparition des colonies dans la zone d'inhibition. L'absence des colonies indique une action bactéricide (Thomson et *al.*, 1996).

2.8.5/ Dénombrement des souches après interaction

Après les tests d'inhibition, les cultures lactiques sélectionnées sont celles qui montrent les inhibitions les plus importantes vis-à-vis des germes pathogènes utilisés.

Un dénombrement des souches lactiques et pathogènes est réalisé par une numération de colonies sur boîtes de pétri (Beerens et Luquet, 1987).

La solution mère contenant 10 ml du Muller Hinton bouillon, 1 ml de la préculture pathogène et un disque imprégné par 50 µl de la culture lactique est incubée à 37 °C

pendant 24 heures. Les dilutions sont préparées dans de l'eau physiologique à partir de la solution mère. 1 ml est prélevé de la dilution dans la boîte de pétri. Les boîtes sont coulées par le M17 gélose (pour le dénombrement des Lactocoques), incubées à 30°C pendant 48 heures et par les milieux spécifiques pour dénombrer les bactéries pathogènes.

2.9/ Etude de la nature de la substance inhibitrice

Un volume de 100 ml de la préculture lactique (pure ou combinaison) est centrifugé pendant 20 minutes à 10 000 tours/minute et à +4°C. Le surnageant représentant la fraction extracellulaire est filtré sur de l'acétate de cellulose (0,45) µm puis conservé à +4°C, à l'obscurité et pendant une courte durée pour diverses utilisations. Le culot est lavé deux fois avec de l'eau distillée, séché puis additionné de méthanol selon un rapport de volume 2/3. Le méthanol est utilisé pour l'extraction éventuelle de la bactériocine. Le mélange est centrifugé à 10 000 tours/minute pendant 20 minutes et à +4°C. Le surnageant obtenu est appelé extrait cellulaire (Labioui et *al.*, 2005).

2.9.1/ Elimination de l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène

Pour éliminer l'effet des acides organiques, notamment l'acide lactique, un volume du surnageant est neutralisé à pH 6,5 par une solution de NaOH (0,1N). L'effet du peroxyde d'hydrogène accumulé dans le milieu de culture est éliminé par l'addition de la catalase (Institut Pasteur d'Alger) à raison de 5 mg/ml. Le surnageant neutralisé est traité par la catalase pendant deux heures à 30°C (Labioui et *al.*, 2005). Les tests d'inhibition sont réalisés sur le surnageant (fraction extracellulaire) et sur le culot (extrait cellulaire) avec chaque bactérie pathogène et avec trois répétitions.

2.9.2 / Effet des traitements thermiques sur la substance inhibitrice

Les bactériocines étant connues pour être des protéines résistantes à des températures élevées.

Pour la détermination de la thermostabilité des substances inhibitrices, le surnageant de chaque préculture a subi un chauffage pendant 30 minutes à 60°C, 80°C, 90°C, et 100°C, pendant 15 minutes à 100°C, et un cycle d'autoclavage à 121°C pendant 20 minutes (Casla et *al.*, 1996).

Après refroidissement, l'activité de la bactériocine est vérifiée comme précédemment et avec trois répétitions.

2.9.3 / Effet des enzymes protéolytiques

La nature de la bactériocine est déterminée sous l'action des enzymes protéolytiques suivantes :

Pepsine (Merck 2000 UI/g), α -Chymotrypsine (Merck 60 UI/mg), Trypsine (Merck from bovine pancréas 40 UI/mg), Pronase (Merck 4 000 000 UI/g). Chaque enzyme est additionnée à une concentration de 1 mg/ml dans 10 mM/l du tampon phosphate de potassium ajusté à pH 7,0. La pepsine est solubilisée dans du tampon acétate de sodium (5mM/l, pH 3).

Le surnageant de chaque préculture (pure ou combinaison) est divisé en quatre fractions, chaque fraction est additionnée d'une enzyme à raison de 1 mg/ml. Après incubation à 37°C pendant 1 heure, l'activité de la bactériocine est contrôlée par les tests d'inhibition effectués sur chaque souche pathogène et avec trois répétitions (Savadogo et *al.*, 2004).

2.10 /Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique des résultats est réalisée à l'aide de programme "Anova". Nous avons effectué d'une part, une analyse de variance, pour montrer la signification de nos résultats et d'autre part, la comparaison des moyennes par les tests de Newman Keuls et de la probabilité (P). Notons, que nous appelons une différence entre deux chiffres "significative" lorsque la probabilité pour que ces deux chiffres soient identiques, est inférieure à 5 % et F. observé très supérieur à F. théorique.

1/ Survie des Lactocoques dans les conditions extrêmes du tube digestif

La résistance aux hostilités digestives (acidité gastrique, sels biliaires....) constitue un caractère important de sélection des souches probiotiques car elle conditionne le transit et/ou la colonisation du tube digestif par ces microorganismes (Pereira et Gibson, 2002).

La survie de ces souches aux conditions drastiques du tube digestif représente, par conséquent, un premier objectif de cette utilisation de microorganismes comme probiotiques.

En général, les bactéries lactiques en cultures isolées ou en associations montrent une variation importante à pousser dans un milieu synthétique en présence d'acide et de sels biliaires (Dilmi- Bouras, 1991).

C'est dans cette optique que nous avons étudié, *in vitro*, dans un premier temps le comportement de 21 souches de *Lactococcus lactis* vis-à-vis des sels biliaires et de l'acidité et dans un deuxième temps, les effets des associations des souches de *Lactococcus lactis* résistantes (extrémophiles) sur la croissance qui en cultures pures ou en associations a été suivie par la mesure de la densité optique (D.O) et par le dénombrement sur boîte de pétri pendant 72 heures à différents pH (2,5 – 4,5 – 6,5), en absence et en présence de 0,3 % de sels biliaires.

1.1/ Souches pures

1.1.1/ Survie de *Lactococcus lactis* à pH 2,5

Les ensemencements sur boîtes de pétri n'ont pas été possibles à cause de l'addition de l'acide chlorhydrique (pH 2,5) qui n'a pas permis une solidification du milieu. A cet effet, l'évolution du nombre de cellules des différentes espèces a été réalisée par la lecture de la densité optique (D.O) au spectrophotomètre à 660 nm. Les résultats ont été extrapolés par le biais d'une courbe d'étalonnage en nombre de colonies.

En absence des sels biliaires, les différentes souches se développent difficilement à pH 2,5 à l'exception de *Lc.l6*, *Lc.l7*, *Lc.l9*, *Lc.l12*, *Lc.l13*, et *Lc.c1* qui montrent une résistance élevée au pH bas (figure 01).

En présence de 0,3 % de sels biliaires, une bonne résistance a été remarquée avec les mêmes souches (figure 02).

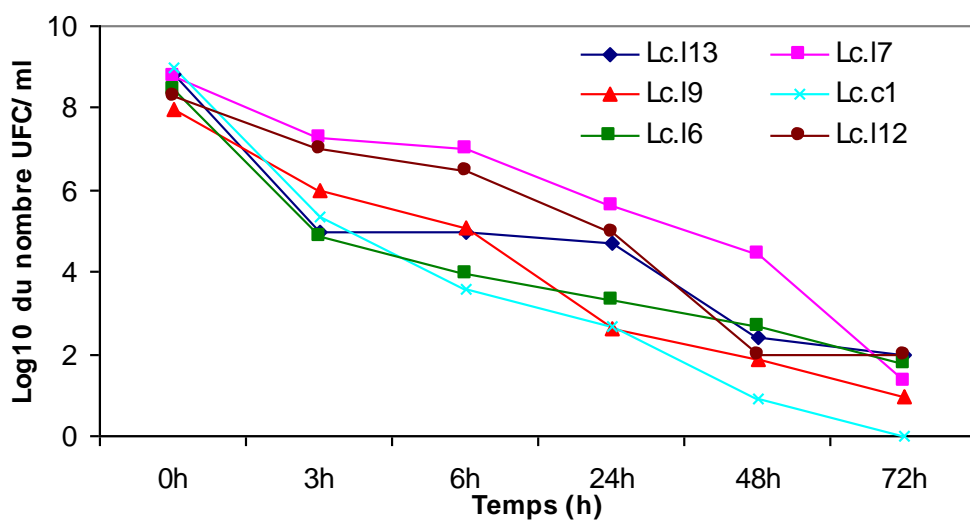


Figure 01 : Evolution de la croissance des souches de bactéries lactiques à pH 2.5 en absence de sels biliaries.

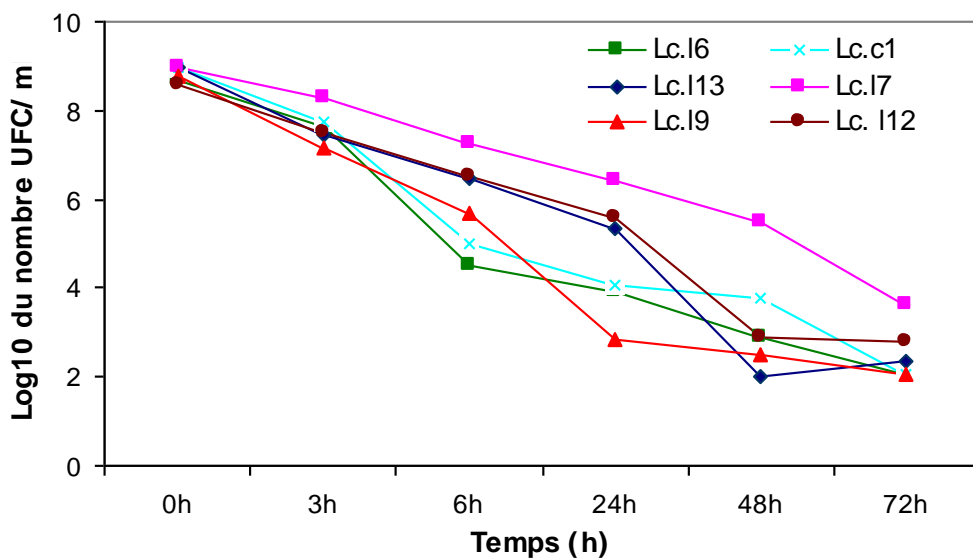


Figure 02 : Evolution de la croissance des souches de bactéries lactiques à pH 2.5 en présence de sels biliaries.

En général, les souches de *Lactococcus lactis* sont très sensibles à l'acidité du milieu. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Bradley (1992) qui trouve que seulement 0,01 % d'inoculum des dix souches de bactéries lactiques exposées à l'effet d'acidité à pH 1, survivent. La croissance est plus ou moins importante à pH 2 et 3.

De même, Dilmi Bouras et Sadoun, (2002) montrent que les pH trop bas (1,2 et 2,1) influent négativement sur la croissance des deux ferments du yaourt YB3 (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) mais ils résistent et se développent presque normalement à des pH moyennement bas (4,3 et 6,6) et en présence d'une concentration élevée de sels biliaires (0,3 %).

1.1.2/ Survie de *Lactococcus lactis* à pH 4,5

A pH 4,5 et en absence de sels biliaires, les souches présentent une bonne résistance vis-à-vis de l'acidité. Le nombre de cellules reste élevé, en particulier celui de: *Lc.l6*, *Lc.l7*, *Lc.l9*, *Lc.l12*, et *Lc.l13*. A partir de la 6^{ème} heure d'incubation le nombre commence à diminuer progressivement pour atteindre respectivement: $3,22 \times 10^3$ cellules/ml, $2,5 \times 10^4$ cellules/ml, $9,99 \times 10^3$ cellules/ml et 5×10^3 cellules/ml, à la fin de la 72^{ème} heure d'incubation (figure 03).

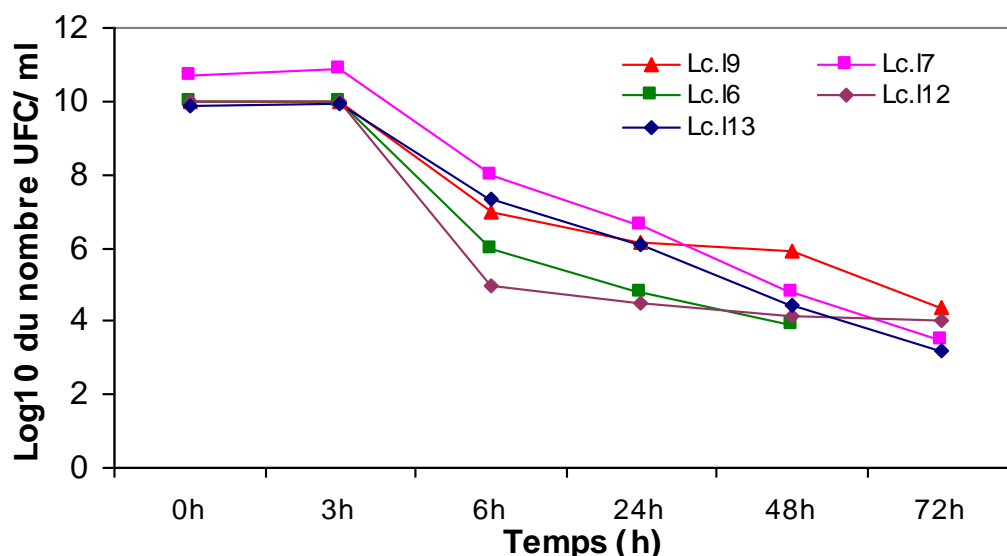


Figure 03: Evolution de la croissance des souches de bactéries lactiques à pH 4.5 en absence de sels biliaires

En présence de 0,3 % de sels biliaires, les souches de *Lactococcus lactis* montrent une bonne résistance pour : *Lc.l6*, *Lc.l7*, *Lc.l9*, *Lc.l12* et *Lc.l13* atteignant respectivement : $7,76 \times 10^{10}$ cellules/ml, $5,52 \times 10^{10}$ cellules/ml, $6,87 \times 10^9$ cellules/ml, $4,98 \times 10^9$ cellules/ml et $3,55 \times 10^9$ cellules/ml, au bout de 6 heures d'incubation. Le nombre diminue pour atteindre respectivement: $3,40 \times 10^7$ cellules/ml, $3,16 \times 10^7$ cellules/ml, $2,05 \times 10^7$ cellules/ml, $7,04 \times 10^7$ cellules/ml et $4,50 \times 10^7$ cellules/ml, après 72 heures d'incubation (figure 04).

Mêmes constatations ont été faites par Saadi 2006, qui trouve que les souches pures mésophiles de *Lactobacillus paracasei* (3, 4, 6 et 7) présentent une bonne résistance et un taux de survie meilleur à pH 4,3 en absence et en présence de 0,3 % de sels biliaries.

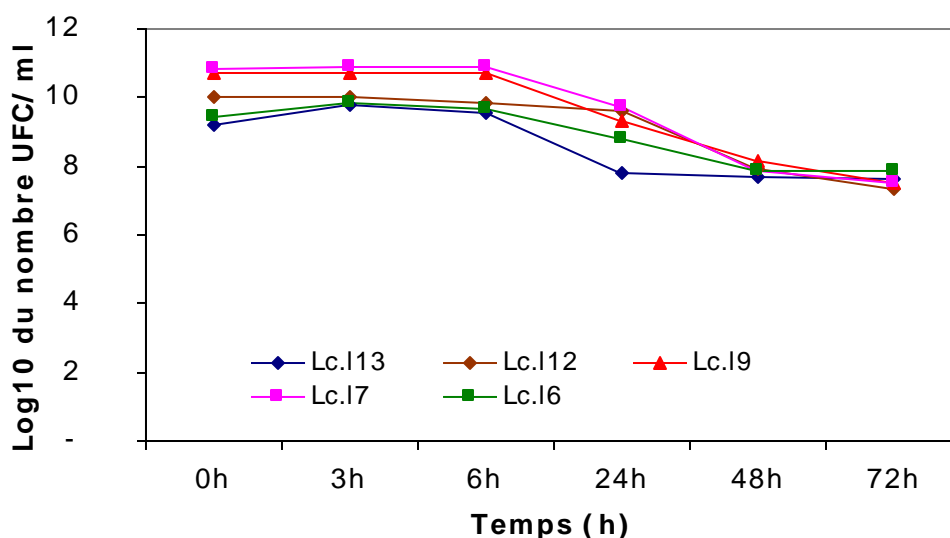


Figure 04 : Evolution de la croissance des souches de bactéries lactiques à pH 4.5 en présence de sels biliaries.

1.1.3/ Survie de *Lactococcus lactis* à pH 6,5

En absence de sels biliaries, les souches de *Lactococcus lactis* se développent normalement. Le nombre des cellules augmente progressivement jusqu'à 48 heures d'incubation où il atteint, par exemple, pour: *Lc.l₉* ($8,30 \times 10^{10}$ cellules/ml), *Lc.l₁₂* ($9,12 \times 10^{10}$ cellules/ml), *Lc.l₆* ($6,2 \times 10^{10}$ cellules/ml), *Lc.d₁* ($1,44 \times 10^{10}$ cellules/ml), *Lc.d₂* ($4,41 \times 10^{10}$ cellules/ml) et *Lc.c₃* ($9,10 \times 10^{10}$ cellules/ml), puis il diminue pour atteindre respectivement : 10^{10} cellules/ml, $4,60 \times 10^{10}$ cellules/ml, $4,90 \times 10^{10}$ cellules/ml, $1,18 \times 10^{10}$ cellules/ml, $2,70 \times 10^{10}$ cellules/ml et $5,10 \times 10^{10}$ cellules/ml, après 72 heures d'incubation (figure 05).

Lorsque 0,3 % de sels biliaries sont ajoutés au milieu de culture de pH 6,5, le nombre de *Lc.lactis* commence à diminuer à partir de la 6^{ème} heure d'incubation pour les souches : *Lc.l₇*, *Lc.l₁₃*, *Lc.l₁₂* et *Lc.l₉* jusqu'à atteindre respectivement: $1,76 \times 10^9$ cellules/ml, $2,04 \times 10^9$ cellules/ml, $1,11 \times 10^9$ cellules/ml, et $1,20 \times 10^9$ cellules/ml, après 72 heures d'incubation.

Par contre, le nombre de cellules ne commence à diminuer qu'à partir de la 24^{ème} heure d'incubation pour les souches : *Lc.l6*, *Lc.d1*, *Lc.d2*, et *Lc.c3* pour atteindre, respectivement, après 72 heures d'incubation : $7,37 \times 10^9$ cellules/ml, $1,12 \times 10^9$ cellules/ml, $3,10 \times 10^9$ cellules/ml et $6,70 \times 10^8$ cellules/ml (figure 06).

Cette diminution de la croissance est due à la sensibilité des souches à la concentration élevée en sels biliaries (0,3 %).

Les recherches de Dilmi Bouras (2002), montrent que les bactéries lactiques utilisées se développent normalement en fonction du temps, en absence et en présence de sels biliaries à pH 6,6.

Dans des expériences similaires, Prasad et *al.* (1999) avaient enregistré l'aptitude à la croissance de trois souches de bactéries lactiques qui, après avoir été incubées 2 heures à pH 3 furent cultivés 12 heures en présence de 0% , 0,5% et 1% de bile.

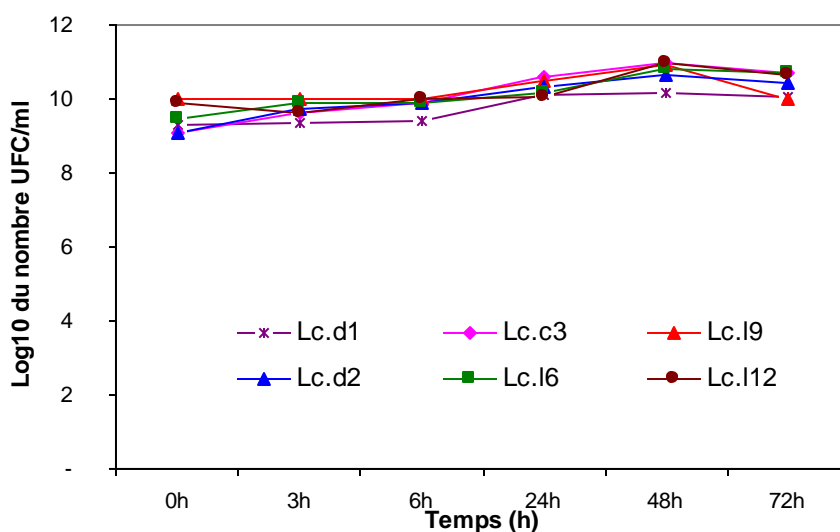


Figure 05 : Evolution de la croissance des souches de bactéries lactiques à pH 6.5 en absence de sels biliaries

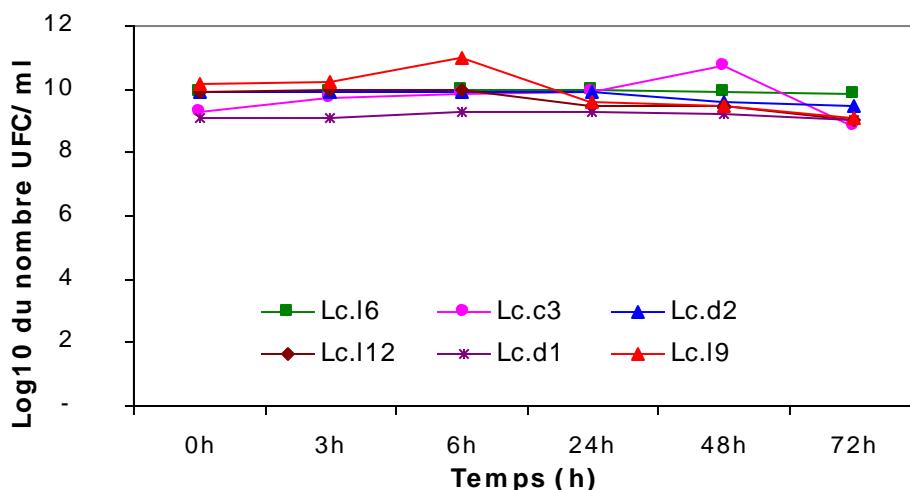


Figure 06: Evolution de la croissance des souches de bactéries lactiques à pH 6.5 en présence de sels biliaries.

En absence de sels biliaries et à pH optimal (6,5), les souches de *Lactococcus lactis* présentent une très bonne croissance, le nombre des cellules est très élevé. Une légère diminution est observée après 72 heures d'incubation, cela peut être dû à l'épuisement des éléments nutritifs du bouillon de culture (figure 07).

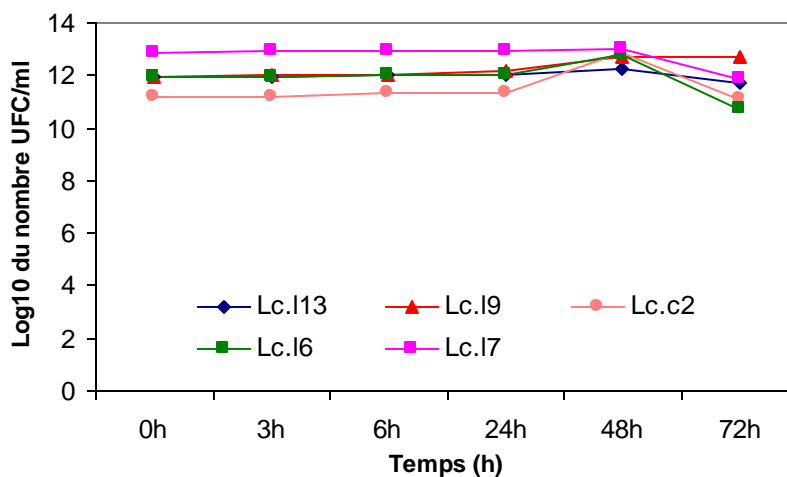


Figure 07: Evolution de la croissance des souches de bactéries lactiques en absence de sels biliaries et à pH optimal (témoin : 6,5).

Le traitement s'est révélé très hautement significative ($P < 0.0001$), la croissance a largement changé selon les facteurs étudiés (temps, pH et sels biliaries); (Annexe V).

Ces résultats permettent de sélectionner les souches qui ont présenté une bonne croissance et une bonne résistance au pH bas (2,5) et à la forte concentration en sels biliaires (0,3 %).

Les meilleures souches retenues sont : *Lc.l7*, *Lc.l12*, *Lc.l6*, *Lc.l13*, *Lc.l9*, *Lc.d1*, *Lc.d2*, *Lc.c1* et *Lc.c3*.

1.2/ Association des différentes souches

Les associations des bactéries ont été réalisées par l'utilisation des meilleures souches pures présentant une bonne résistance vis-à-vis du pH bas (2,5) et de la forte concentration en sels biliaires (0,3 %).

L'objectif est de voir si l'association de ces bactéries provoque un effet de symbiose sur la croissance.

Les cultures ont été préparées par la combinaison entre trois souches de *Lactococcus lactis* par exemple : *L7D1C1* représente l'association *Lc.l7* + *Lc.d1* + *Lc.c1* et *L7D1C3* représente l'association : *Lc.l7* + *Lc.d1* + *Lc.c3*.

1.2.1/ Survie des différentes associations à pH 2,5

L'évolution du nombre de cellules des différentes associations a été réalisée par la lecture de la densité optique (D.O) au spectrophotomètre à 660 nm.

En absence de sels biliaires, les différentes associations présentent une faible croissance. Le nombre de cellules diminue après 3 heures d'incubation. Cette faible résistance est due à l'effet de l'acidité du milieu (figure 08).

La résistance des différentes associations est plus importante en présence de sels biliaires qu'en leur absence (figure 09).

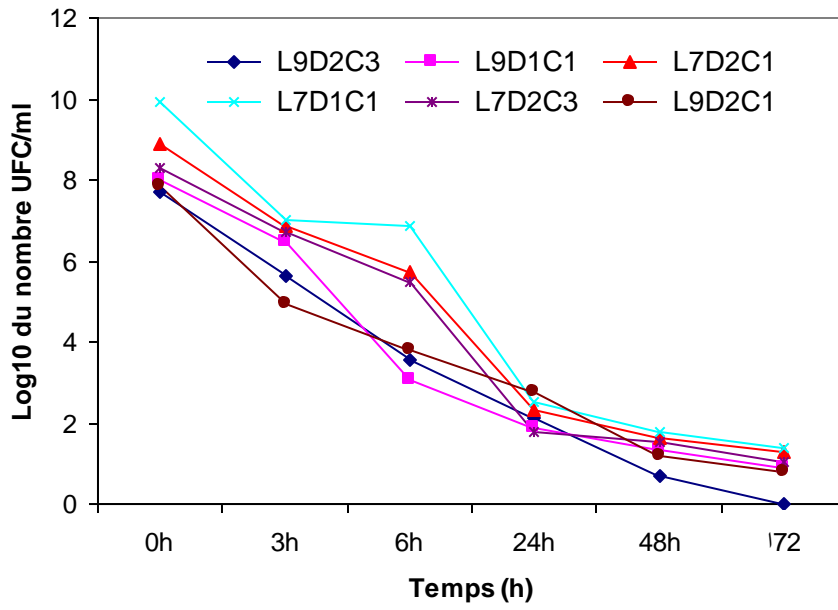


Figure 08 : Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 2.5 en absence de sels biliaires

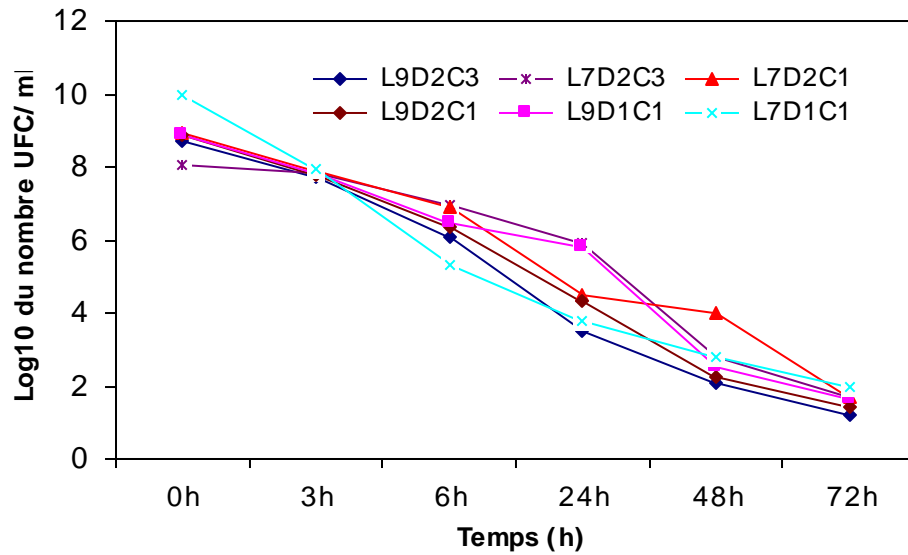


Figure 09 : Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 2.5 en présence de sels biliaires.

1.2.2/Survie des différentes associations à pH 4,5

Les différentes associations survivent normalement dans le milieu synthétique mais avec un nombre de cellules faible par rapport au témoin (figure 10).

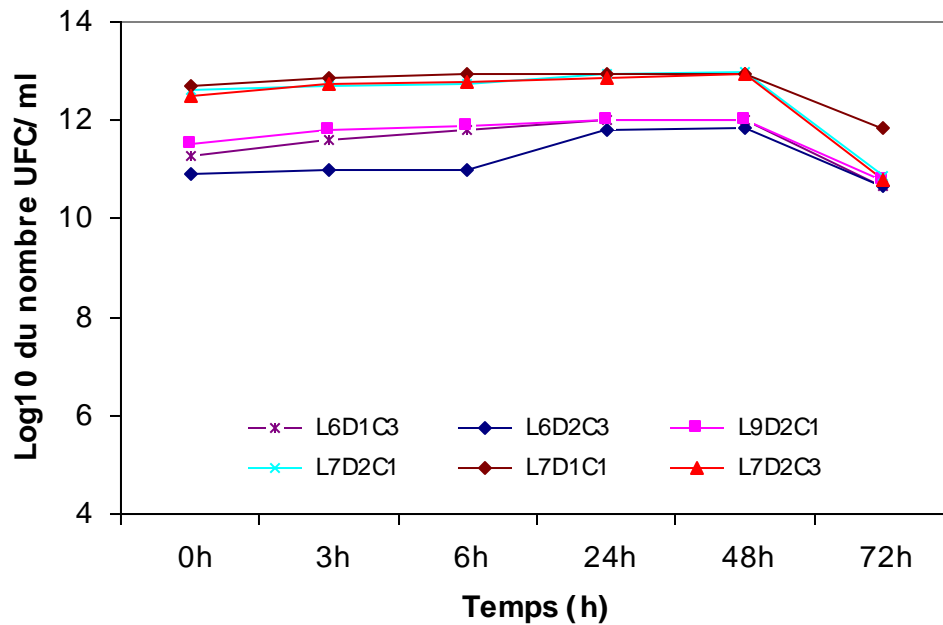


Figure 10 : Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH optimal (2,5) et en absence de 0,3 % de sels biliaires (témoin).

En absence de sels biliaires le nombre de cellules augmente. Après 3 heures d'incubation, la croissance des associations diminue progressivement pour atteindre un nombre faible après 72 heures d'incubation: $1,10 \times 10^7$ cellules/ml pour $L_7D_1C_1$, $6,16 \times 10^7$ cellules/ml pour $L_7D_2C_1$, $1,34 \times 10^7$ cellules/ml pour $L_6D_2C_3$, $1,02 \times 10^7$ cellules/ml pour $L_7D_2C_3$, $3,20 \times 10^7$ cellules/ml pour $L_6D_1C_3$ et $9,97 \times 10^7$ cellules/ml pour $L_9D_2C_1$. (figure 11)

En présence de 0,3 % de sels biliaires, les associations se développent mieux et présentent une bonne résistance.

Le nombre de cellules augmente jusqu'à atteindre $4,50 \times 10^{11}$ cellules/ml pour $L_7D_1C_1$, $5,60 \times 10^{10}$ cellules/ml pour $L_7D_2C_1$, $3,56 \times 10^{11}$ cellules/ml, pour $L_9D_2C_1$, $9,38 \times 10^9$ cellules/ml pour $L_6D_1C_3$, $9,53 \times 10^9$ cellules/ml pour $L_6D_2C_3$ et $6,78 \times 10^{10}$ cellules/ml pour $L_7D_2C_3$, après

la 3^{ème} heure d'incubation, puis il diminue progressivement et avec un taux moins faible qu'en absence de sels biliaires (figure 12).

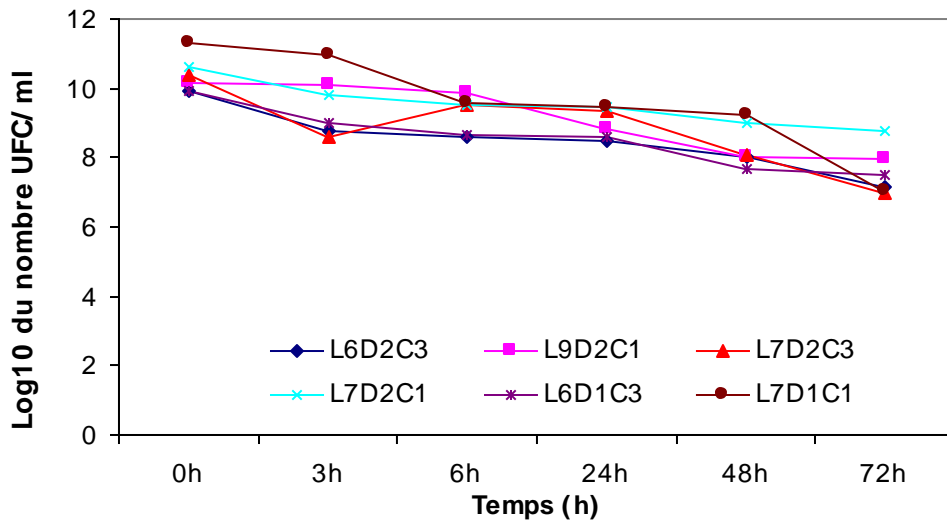


Figure 11 : Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 4.5 en absence de sels biliaires

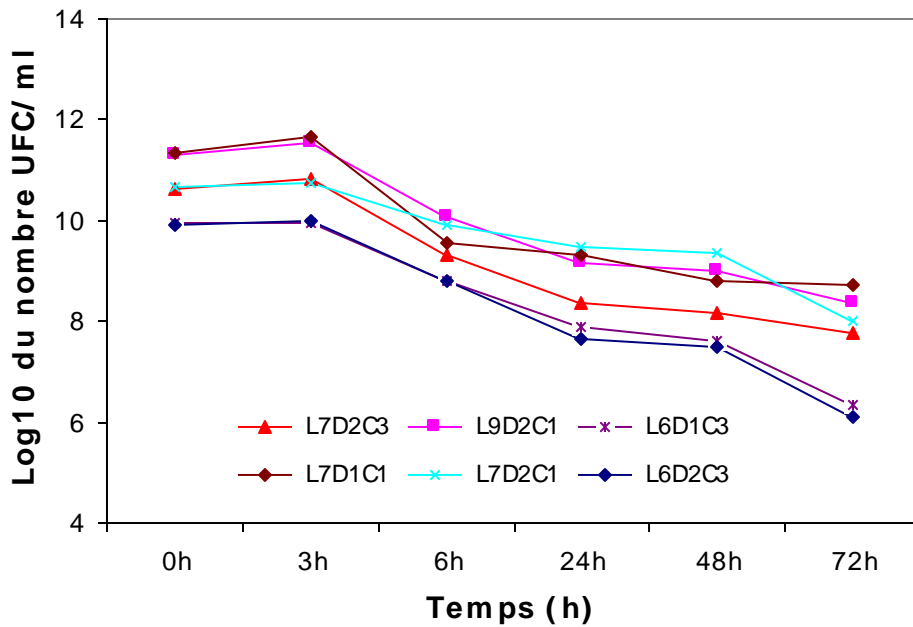


Figure 12 : Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 4.5 en présence de sels biliaires.

1.2.3/ Survie des différentes associations à pH 6,5

Les différentes associations se développent presque normalement à pH 6,5, ce qui confirme l'effet de symbiose entre les souches de *Lactococcus lactis*.

Le nombre de cellules augmente progressivement jusqu'à 48 heures d'incubation puis nous observons une légère diminution: $9,23 \times 10^{10}$ cellules/ml, pour $L_7D_1C_1$, 9×10^9 cellules/ml, pour $L_7D_2C_3$, $3,22 \times 10^9$ cellules/ml, pour $L_{12}D_1C_3$, $5,82 \times 10^{10}$ cellules/ml, pour $L_{12}D_2C_3$, $8,95 \times 10^9$ cellules/ml pour $L_9D_1C_1$, $3,01 \times 10^9$ cellules/ml pour $L_6D_1C_1$ et $4,31 \times 10^{10}$ cellules/ml pour $L_{13}D_2C_3$ après 72 heures d'incubation (figure 13).

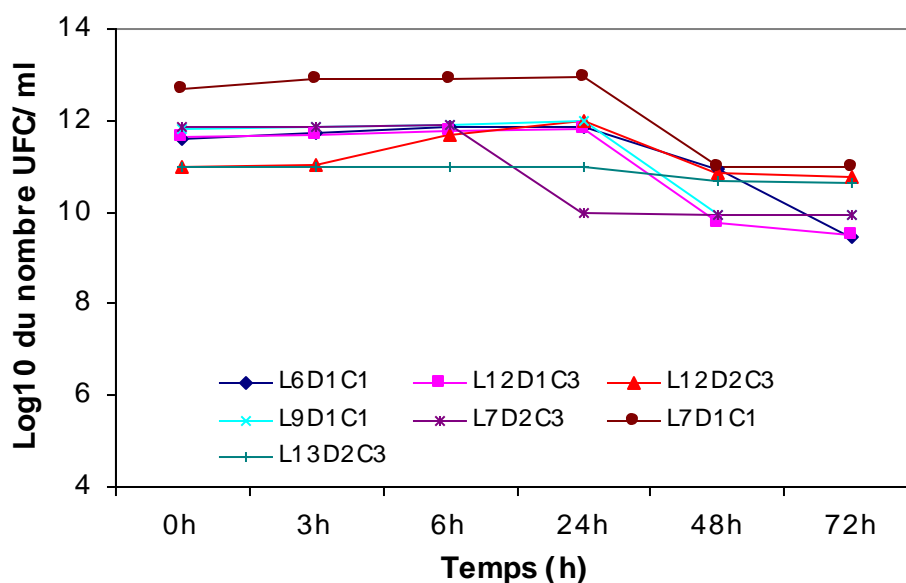


Figure 13 : Evolution de la croissance des cultures mixtes on à pH 6,5 et en absence de sels biliaires.

En présence de sels biliaires, le nombre de cellules diminue à partir de la 3^{ème} heure d'incubation, cela peut être dû à l'épuisement rapide des éléments nutritifs du milieu de culture et à la sensibilité à la forte concentration en sels biliaires (0,3 %) (figure 14).

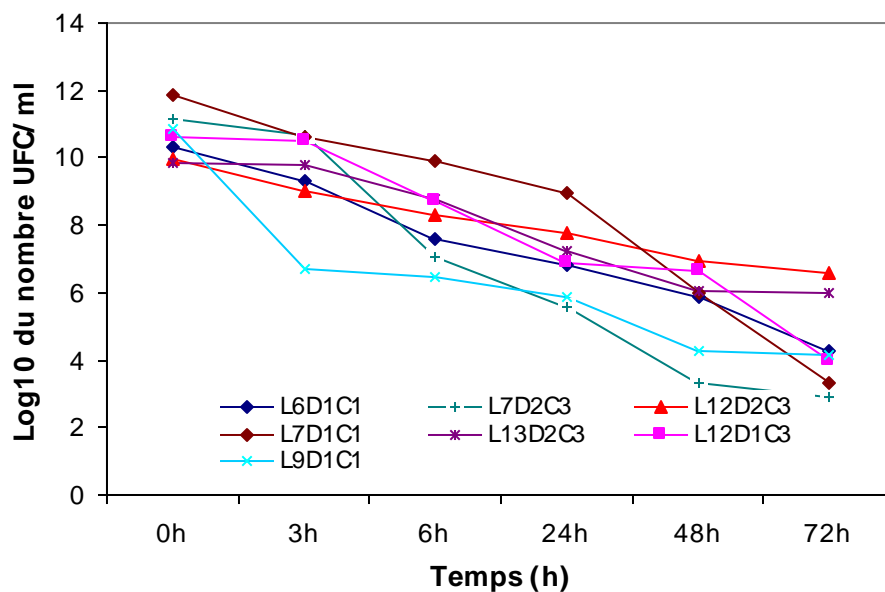


Figure 14: Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 6,5 et en présence de sels biliaires.

Les résultats trouvés montrent que presque toutes les associations résistent et se développent en absence et en présence de sels biliaires et à un pH moyennement bas (4,5) ou neutre (6,5), en particulier les associations suivantes : $L_7D_1C_1$, $L_7D_2C_1$, $L_7D_2C_3$, $L_9D_1C_1$, $L_9D_2C_1$, $L_9D_2C_3$, $L_{12}D_1C_3$, $L_6D_1C_3$, $L_6D_1C_1$, $L_{12}D_2C_3$, $L_6D_2C_3$ et $L_{13}D_2C_3$.

La régression du nombre de bactéries au cours du temps ne peut être due qu'à l'épuisement des éléments nutritifs du bouillon de culture (M17) et au périodes importantes d'incubation.

Le traitement s'est révélé très hautement significative ($P < 0.0001$), la croissance a largement changé selon les facteurs étudiés (temps, pH et sels biliaires); (Annexe V).

Nous pouvons déduire que les souches de *Lactococcus lactis* se multiplient normalement lorsqu'elles sont mises en associations. Donc, il y a un effet de symbiose entre les différentes souches testées.

Les résultats trouvés par Dilmi-Bouras (1991) montrent que les ferments lactiques du yaourt YB3 résistent à des concentrations relativement élevées en sels biliaires (0,3 %) et que plusieurs associations se développent normalement en absence et en présence d'oxgall (bile fraîche déshydratée).

Les souches qui seront utilisées ultérieurement, sont celles présentant une bonne croissance et une meilleure résistance vis-à-vis des sels biliaires et des différents pH utilisés (2,5 – 4,5 – 6,5).

Les souches pures et les associations retenues sont : *Lc.l7*, *Lc.l12*, *Lc.l6*, *Lc.l13*, *Lc.l9*, *Lc.d1*, *Lc.d2*, *Lc.c1*, *Lc.c3*, *L7D1C1*, *L7D2C1*, *L7D2C3*, *L9D1C1*, *L9D2C1*, *L9D2C3*, *L12D1C3*, *L6D1C1*, *L6D1C3*, *L12D2C3*, *L6D2C3* et *L13D2C3*.

2 / Pouvoir acidifiant des souches sélectionnées

Cette étude est effectuée par la mesure du pH et de l'acidité dornic, en cultures pures et en associations incubées à 30°C et dans les intervalles de temps allant de 0 heure jusqu'à 96 heures.

Le suivi du pH montre une diminution progressive des valeurs pour toutes les souches étudiées. Parmi celles-ci: *Lc.l7*, *Lc.l9*, *Lc.c3*, *L6D1C3*, *L12D1C3* et *L7D2C1*, les valeurs initiales enregistrées du pH étaient respectivement : 6,62, 6,66, 6,75, 6,75, 6,73 et 6,69. Ces valeurs diminuent pour atteindre, après 96 heures : 4,03, 4,08, 4,87, 4,60, 4,77 et 4,29 (figures 15 et 16).

Dans des expériences similaires, Labioui et *al.*, (2005), avaient trouvé que les bactéries lactiques ayant une forte activité antibactérienne contre *Escherichia coli* ATCC25921 sont celles possédant un pouvoir acidifiant élevé avec un pH initial de 6,58 et un pH final variant de 3,75 à 4,84.

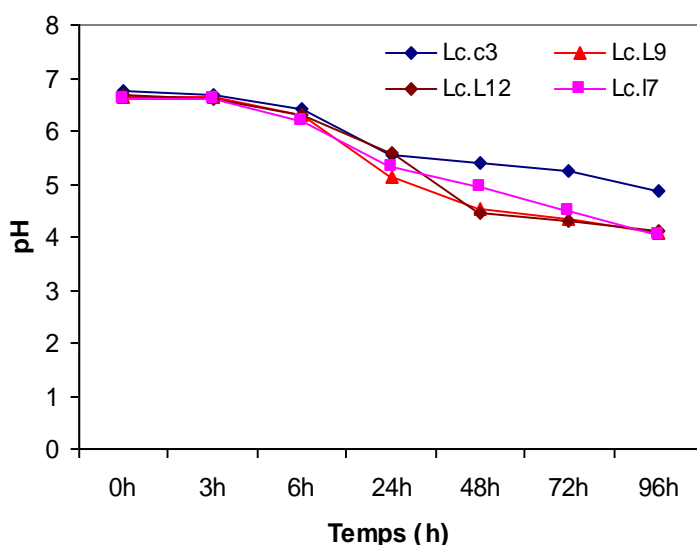


Figure 15 : Evolution du pH des cultures pures à 30 °C en fonction du temps.

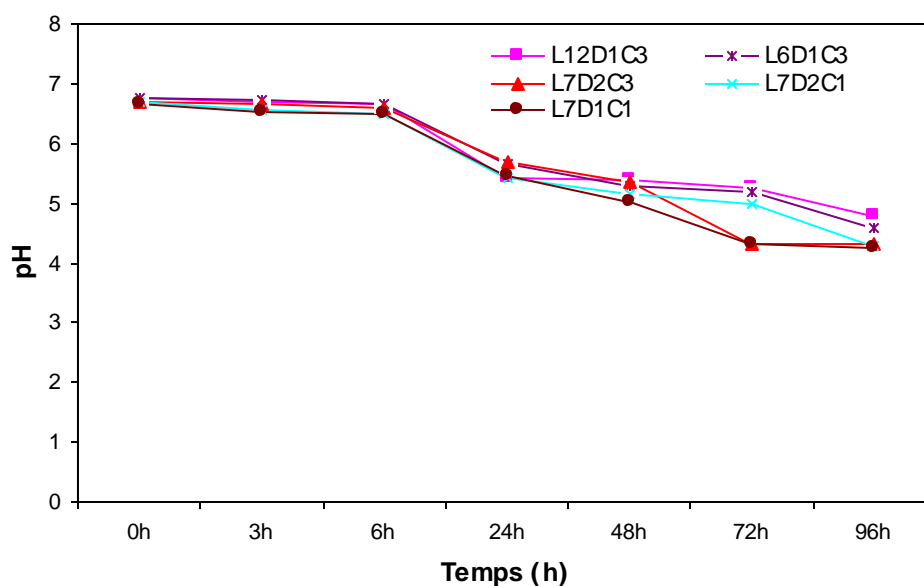


Figure 16: Evolution du pH des cultures mixtes à 30 °C en fonction du temps.

Les valeurs de l'acidité Dornic des cultures pures augmentent progressivement pour atteindre après 96 heures une acidité élevée comprise entre 80 et 98 °D.

L'acidité des souches: *Lc.l7*, *Lc.l9*, et *Lc.l12* augmente respectivement de: 16, 15, et 15 pour atteindre: 99, 90, et 89 après 96 heures d'incubation (figure 17).

En cultures mixtes presque la totalité des souches présente une acidité plus élevée qu'en cultures pures. Pour les associations: *L7D1C1*, *L7D2C1*, et *L7D2C3*, l'acidité augmente pour atteindre respectivement après 96 heures les valeurs suivantes: 105, 102 et 99 °D (figure 18).

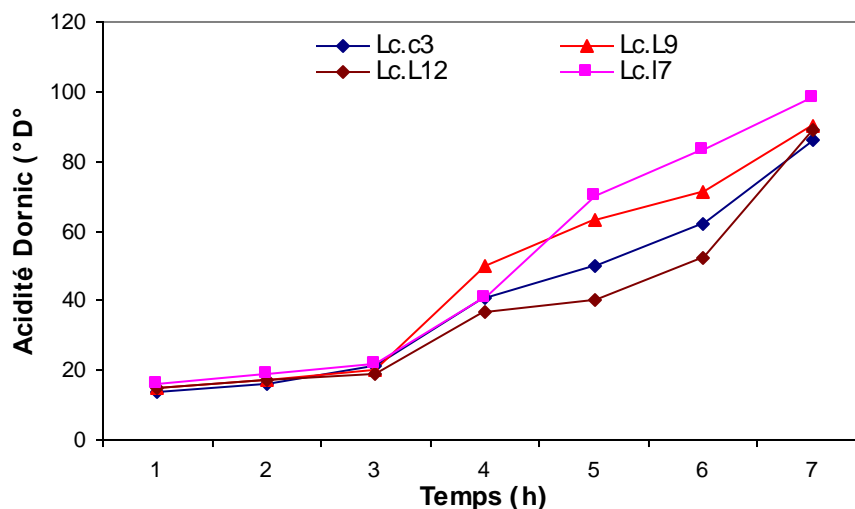


Figure 17: Evolution de l'acidité Dornic des cultures pures à 30 °C en fonction du temps.

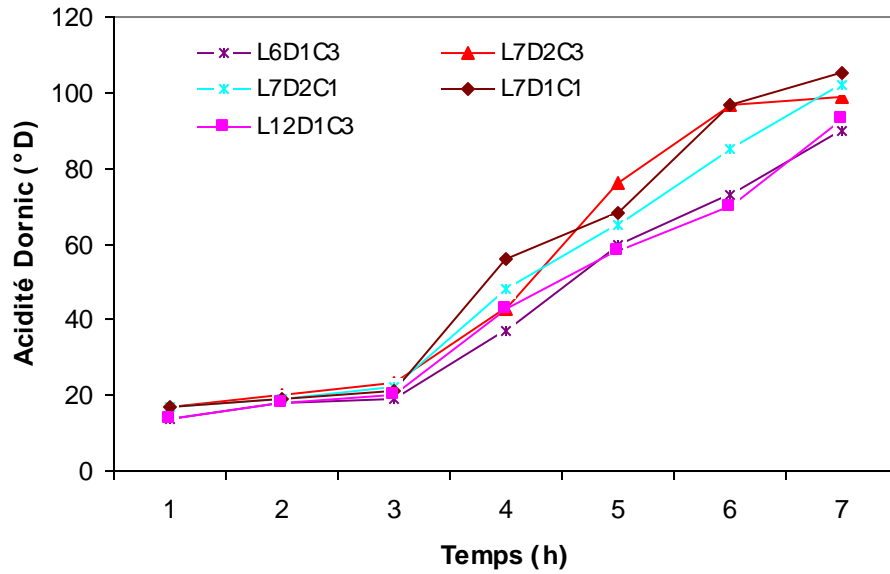


Figure 18: Evolution de l'acidité Dornic des cultures mixtes à 30 °C en fonction du temps.

Nous pouvons déduire que les souches de *Lactococcus lactis* sélectionnées, en cultures pures, ou en associations, possèdent un pouvoir acidifiant élevé comparativement à la souche importée *Lactococcus lactis* étudiée par Bessekri et Zidane (2004), cette souche peut atteindre une acidité de 98 °D au bout de 96 heures. D'autres travaux réalisés par Lucas et Reyrolle (1989) montrent que les souches de *Lactococcus lactis sub sp. lactis* peuvent résister à une acidité dépassant les 75 °D.

3/ Isolement et identification des bactéries pathogènes

3.1/ Isolement et identification de *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* et *Citrobacter freundii*

3.1.1/ Examens bactériologiques

L'ensemencement sur milieu Hektoen montre après 24 heures d'incubation à 37°C, des colonies vertes avec un centre noir suspectées d'être *S. typhi*. Sur milieu EMB, les colonies apparaissent plates, sèches, violettes suspectées d'être *E. Coli*, ces caractéristiques ont été définies par Guiraud, (1998).

Sur la gélose nutritive, les colonies apparaissent lisses, légèrement convexes à contour régulier correspondant au genre *Citrobacter*. Les mêmes observations ont été faites par Euzéby, (2000).

Des examens microscopiques ont été faits pour déterminer la forme de chaque bactérie. Pour *S. typhi* nous avons observé de petits bâtonnets à gram négatif. *E. coli* apparaît sous forme de bâtonnets courts à gram négatif. Le genre *citrobacter* apparaît sous forme de bacilles droits, isolés ou groupés en paires. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par Euzéby, (2000) et Guechi (2002).

3.1.2/ Identification des caractères biochimiques

Les résultats du tableau 07 montrent les caractères biochimiques recherchés pour : *S. typhi*, *E. coli* et *C. freundii* après 24 heures d'incubation à 37°C.

S.typhi possède une lysine décarboxylase, produit du gaz H₂S pendant la dégradation du sodium thiosulfate. Les sucres qui peuvent être fermentés par cette bactérie sont : D-glucose, D-sorbitol et D-melibiose. Les résultats étaient négatifs pour tous les autres tests, ce qui a été constaté par Bourgeois et *al.* (1996) et *sutra et al.*(1998).

E.coli est caractérisée par la présence d'une β-galactosidase, une lysine décarboxylase et une ornithine décarboxylase et par la production d'indole, elle fermente la plupart des sucres, elle ne possède pas la citratase, l'uréase et l'arginine dihydrolase. Ces caractères ont été démontrés par Larpent, (1989).

C. freundii est une bactérie mobile, produit du H₂S et fermente la plupart des sucres : D-glucose, L-rhamnose, D-saccharose, D-melibiose, et L-arabinose. Elle possède une β-

galactosidase et une Citratase, Ces résultats sont conformes à ceux trouvés par Euzéby, (2000).

Tableau 07 : Tableau d'identification biochimique des bactéries pathogènes par galerie API20E.

Tests \ Souches	<i>S.typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>
ONPG	-	+	+
ADH	-	-	-
LCD	+	+	-
OCD	-	+	-
CIT	-	-	+
H ₂ S	+	-	+
URE	-	-	-
TDA	-	-	-
IND	-	+	-
VP	-	-	-
GEL	-	-	-
GLU	+	+	+
MAN	+	+	+
INO	-	-	-
SOR	+	+	+
RHA	-	+	+
SAC	-	+	+
MEL	+	+	+
AMY	-	-	+
ARA	-	+	+

+: Réaction positive -: Réaction négative

3.2/ Isolement et identification de *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*

3.2.1/ Examens bactériologiques

Sur le milieu de Chapman, les colonies de *S. aureus* s'entourent d'un halo jaune dû à l'attaque du mannitol d'après Marchal *et al.* (1987).

Les colonies de *C. perfringens* apparaissent grandes (3 à 5 mm de diamètre) entourées d'un précipité noir sur le milieu VF. D'après Marchal *et al.* (1987) et Bourgeois *et al.* (1996), toutes les colonies de *Clostridium* sont très nettement noires, leur taille varie selon l'espèce bactérienne, la réduction des sulfites génère le dégagement d'H₂S qui réagit avec les sels de fer pour former un précipité de sulfure de fer, noir, insoluble, qui se dépose autour des colonies.

L'examen microscopique de *C. perfringens* a permis d'observer de gros bacilles droits à bouts carrés se présentant seuls ou en paires dont la coloration de Gram est positive. Les espèces de *S. aureus* sont des cocci à Gram positif se divisant en plusieurs plans en formant des amas irréguliers, ces caractéristiques ont été définies par Euzéby (2000) et Joly *et Alain* (2003).

3.2.2/ Identification des caractères biochimiques

Le test de staphylocoagulase montre un résultat positif, une agglutination massive apparaissant en 15 secondes dans la suspension d'hématies sensibilisées, ce qui indique que les *Staphylocoques* testés appartiennent à l'espèce *Staphylococcus aureus*.

D'après Marchal (1987) la recherche d'une coagulase libre est de toute première importance pour l'étude du genre *Staphylococcus*, sa mise en évidence permet, en effet, l'identification de l'espèce *S. aureus*.

La recherche de l'acétoïne ou la réaction de Voges-Proskauer (VP) confirme aussi la présence de *S. aureus* (Bourgeois *et al.*, 1996). Ce test a donné une réaction positive (coloration rouge cerise VP+).

Les tests étudiés pour l'identification de *C. perfringens* montrent que cette bactérie est strictement immobile (pas de trouble dans le milieu mannitol mobilité), réduit les nitrates en nitrites (apparition d'une coloration rouge) et fermente le lactose avec production d'acide entraînant le virage du milieu TSI au jaune. Ces trois caractères ont été étudiés par Bourgeois *et al.* (1996) pour identifier l'espèce *C. perfringens*.

3.3/ Isolement et identification d'*Helicobacter pylori*

3.3.1/ Test rapide à l'urée

La présence de la bactérie dans la biopsie est indiquée par le changement de la couleur de l'urée-indole de l'orange au rose (figure 19). Les travaux de Cassel-Beraud *et al.* (1996) montrent que cette bactérie possède une activité uréasique très intense, cette propriété a été mise à profit pour un diagnostic rapide.

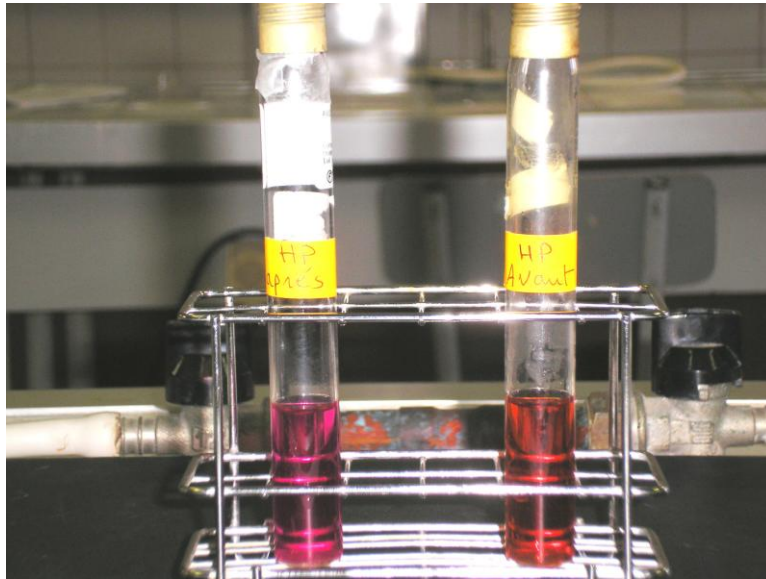


Figure 19 : Test rapide à l'urée après incubation à 37°C pendant 24h.

D'après Sobhani *et al.* (1995), l'uréase produite par cette bactérie hydrolyse l'urée en ammoniac et en bicarbonates dans le but de neutraliser l'acidité de l'estomac, ce qui facilite son adhésion aux cellules du mucus.

3.3.2/ Examens bactériologiques

♦ Isolement

L'examen des boîtes ensemencées a été fait après cinq jours d'incubation sous atmosphère micro-aérophile à 37 °C, de fines colonies, transparentes à grisâtres, luisantes, apparaissent sur milieu gélose chocolat. L'examen microscopique d'une colonie a permis d'observer des bacilles de forme « U » et parfois « S » dont la coloration de Gram est négative. D'après les résultats de Sobhani *et al.* (1995), ces caractères correspondent à ceux d'*H. pylori*.

♦ **Identification des caractères biochimiques d'*H. pylori***

La lecture des résultats a été faite après une incubation de la galerie classique pendant 24 heures à 37°C. Les caractères biochimiques recherchés sont résumés dans le tableau 08.

Tableau 08 : Identification des caractères biochimiques d'*H. pylori*

Tests	Substrats	<i>H. pylori</i>
Uréase	Urée	+
Indole	L. tryptophane	+
Catalase	H ₂ O ₂	+
Oxydase	Cytochrome C	+
ONPG	2-Nitrophényl -β D galactopyranoside	-
LDC	Lysine	+
ODC	Ornithine	+
ADH	Arginine	-
Mannitol	D-mannitol	-
Mobilité		+
Citratase	Citrate	+
TSI	Glucose	-
	Saccharose	-
	Lactose	-
	H ₂ S ou gaz	-

+: Réaction positive -: Réaction négative

Dans notre étude, le résultat du test de l'uréase est positif, d'après Cassel-Beraud et *al.* (1996), le virage de la couleur au rose indique la présence de l'enzyme «Uréase» et la production d'indole se traduit par l'apparition d'un anneau rouge en surface, ceci après addition de 3 à 5 gouttes de réactifs de Kovacs dans le milieu Urée – indole.

H. pylori possède de l'oxydase, la catalase, la citratase mais pas de β – galactosidase.

D'après Bourgeois et *al.* (1996), la fermentation du mannitol peut-être détectée par l'apparition d'une couleur jaune et la mobilité par le trouble du milieu, les bactéries immobiles persistent près de la piqûre centrale.

Le virage de la couleur des milieux LDC et ODC au rouge orangé indique la présence de la Lysine décarboxylase et de l'ornithine décarboxylase. *H. pylori* ne possède pas l'arginine décarboxylase et ne fermente pas les sucres, cette identification à été définie par Avril et *al.* (2000).

4/ Etude du pouvoir antibactérien des souches lactiques

4-1/ Dénombrement des souches avant interaction

La charge bactérienne initiale (pathogène et lactique) a été déterminée par des numérations de colonies sur boîtes de pétri.

Tableau 9 : Charge initiale des souches pathogènes et lactiques avant interaction

Souches	Charge bactérienne (Cellules / ml)
<i>E. coli</i>	$1,12 \times 10^8$
<i>C. freundii</i>	$1,52 \times 10^7$
<i>S. typhi</i>	$2,30 \times 10^4$
<i>H. pylori</i>	$6,80 \times 10^6$
<i>C.perfringens</i>	$9,20 \times 10^9$
<i>S.aureus</i> (1)	$7,10 \times 10^5$
<i>S.aureus</i> (2)	$6,25 \times 10^5$
<i>Lc.l₇</i>	$7,52 \times 10^{12}$
<i>Lc.l₁₂</i>	$9,12 \times 10^{11}$
<i>Lc.l₆</i>	$9,33 \times 10^{11}$
<i>Lc.l₁₃</i>	$8,24 \times 10^{11}$
<i>Lc.l₉</i>	$9,60 \times 10^{11}$
<i>Lc.d₁</i>	$4,88 \times 10^{11}$
<i>Lc.d₂</i>	$4,40 \times 10^{11}$
<i>Lc.c₁</i>	$5,22 \times 10^{11}$
<i>Lc.c₃</i>	$5,12 \times 10^{11}$
<i>L₉D₁C₁</i>	$7,20 \times 10^{11}$
<i>L₉D₂C₃</i>	$3,04 \times 10^{11}$
<i>L₁₃D₂C₃</i>	$7,20 \times 10^{10}$
<i>L₆D₂C₃</i>	$8,00 \times 10^{10}$
<i>L₁₂D₂C₃</i>	$9,80 \times 10^{10}$
<i>L₇D₁C₁</i>	$4,99 \times 10^{12}$
<i>L₇D₂C₃</i>	$3,00 \times 10^{12}$
<i>L₉D₂C₁</i>	$3,20 \times 10^{11}$
<i>L₁₂D₁C₃</i>	$2,00 \times 10^{11}$
<i>L₇D₂C₁</i>	$4,09 \times 10^{12}$
<i>L₆D₁C₁</i>	$3,00 \times 10^{11}$
<i>L₆D₁C₃</i>	$1,80 \times 10^{11}$

Les résultats du tableau 9 montrent que, la charge initiale des bactéries pathogènes est importante: $1,12 \times 10^8$ cellules/ml pour *E. coli*, $1,52 \times 10^7$ cellules/ml pour *C. freundii*, $2,30 \times 10^4$ cellules/ml pour *S. typhi*, $6,80 \times 10^6$ cellules/ml pour *H. pylori*, $9,20 \times 10^9$ cellules/ml pour *C.perfringens*, $7,10 \times 10^5$ cellules/ml pour *S.aureus* (1) et $6,25 \times 10^5$ cellules/ml pour *S.aureus* (2). Des nombres élevés ont été enregistrés aussi pour les bactéries lactiques en cultures pures et mixtes, par exemple $7,52 \times 10^{12}$ cellules/ml pour *Lc.l₇* et $4,99 \times 10^{12}$ cellules/ml pour *L₇D₁C₁*.

Les dénombrements ont été faits dans le but de voir l'influence des interactions sur la charge initiale des souches lactiques et pathogènes.

4-2/ Spectre antibactérien des souches

Les meilleures souches de *Lactococcus lactis* présentant de bonnes inhibitions, possèdent un spectre d'activité très proche. Les zones d'inhibition sont claires et les bordures sont bien distinctes avec des plages d'inhibition variables, suivant la souche lactique testée et la bactérie pathogène utilisée (tableau 10).

Selon Vinod Kumar *et al.* (2006), les bactéries lactiques produisent lors de leur croissance des composés actifs à savoir des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et des substances naturelles de nature protéique douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération.

Tableau 10 : diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après 24 heures d'incubation à 37°C.

S. Pathogène	<i>E. coli</i>	<i>C.freundii</i>	<i>S. typhi</i>	<i>H.pylori</i>	<i>C.perfringens</i>	<i>S.aureus</i> (1)	<i>S.aureus</i> (2)
S. lactique	Diamètres des zones d'inhibition (mm)						
<i>Lc.L7</i>	18,50 ±0,50	22,30 ±0,20	14,50 ±0,50	20,80 ±1,10	20,60 ±0,20	20,50 ±0,50	30,30 ±0,10
<i>Lc.l12</i>	18,30 ±1,00	12,10 ±1,00	12,00 ±1,00	10,20 ±1,00	18,40 ±0,20	16,60 ±0,40	14,50 ±0,50
<i>Lc.l6</i>	15,20 ±0,60	21,6 0±0,50	14,30 ±1,00	12,10 ±1,00	23,20±0,10	21,20 ±0,10	15,20 ±0,30
<i>Lc.l9</i>	25,20 ±1,00	13,40 ±1,00	0,00 ±0,00	18,50 ±0,10	36,30 ±0,10	12,30 ±0,20	30,10±1,00
<i>Lc.l13</i>	17,40 ±0,40	0,00 ±0,00	10,00 ±1,00	12,60 ±0,30	22,30 ±1,00	18,10 ±1,00	14,60 ±0,20
<i>Lc.d1</i>	7,50 ±0,50	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	6,10 ±1,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.d2</i>	0,00 ±0,00	0,00±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	5,50 ±0,50	0,00 ±0,00
<i>Lc.c1</i>	12,00 ±0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	6,10 ± 1,10	9,50 ±0,50	13,20 ±0,10
<i>Lc.c3</i>	12,50 ±0,50	0,00±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	4,40 ±0,50	7,30 ±0,10	9,60 ±0,30
<i>L9D1C1</i>	15,70 ±0,20	0,00 ±0,00	12,10 ±0,30	12,30±1,00	16,60 ±0,30	10,40 ±1,10	15,40±1,00
<i>L9D2C3</i>	13,10 ±1,00	6,10 ±0,10	14,50 ±0,50	0,00 ±0,00	13,40 ±1,00	16,60 ±0,10	11,30 ±1,00
<i>L13D2C3</i>	6,30 ± 0,10	0,00±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	8,50 ±0,50	0,00 ±0,00	6,20 ±1,00
<i>L6D2C3</i>	9,2 0±0,30	11,20 ±0,10	0,00 ±0,00	15,40 ±0,20	13,20 ±0,40	14,40 ±0,30	15,10 ±0,50
<i>L12D2C3</i>	0,0 0±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	11,10 ±0,20	14,50 ±0,50	9,60 ±1,00
<i>L7D1C1</i>	21,40±1,00	22,40 ±1,00	15,70 ±1,10	23,70 ±1,10	15,10 ±1,00	25,70 ±1,10	20,70± 1,10
<i>L7D2C3</i>	15,20±1,00	20,00 ±1,00	12,40±0,20	17,20 ±0,00	14,30 ±1,00	15,20 ±1,00	17,20 ±0,10
<i>L9D2C1</i>	11,20±1,00	7,10 ±0,20	13,10 ±1,00	0,00 ±0,00	10,00 ±0,20	26,20 ±0,10	14,3 ±0,30
<i>L12D1C3</i>	7,10 ±0,20	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	17,40 ±1,00	15,30±1,00	7,50 ±0,50
<i>L7D2C1</i>	15,50 ±0,50	18,30 ±0,20	6,00 ±1,00	25,30 ±0,20	18,50 ±0,50	14,60 ±0,40	17,10 ±1,00
<i>L6D1C1</i>	13,10 ±1,00	12,00 ±0,40	0,00 ±0,00	22,20 ±1,00	19,20 ±0,10	17,10 ±0,20	17,40 ±0,40
<i>L6D1C3</i>	14,80 ±1,10	13,20 ±1,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	17,30 ±0,40	15,20 ±1,00	14,30±1,10

4-2-1/ Effet de *Lactococcus lactis* sur *E. coli*

Le tableau 10 montre les diamètres des zones d'inhibition des souches lactiques en culture pure ou en combinaison vis-à-vis des bactéries pathogènes.

Les souches lactiques utilisées ont un effet inhibiteur plus ou moins important sur *E. coli*. Les travaux réalisés par Nahaïsi (1986), montrent que les ferments lactiques ont la capacité d'inhiber, in vitro l'action des germes pathogènes Gram positif ou négatif.

Les meilleures zones d'inhibition ont été trouvées avec les souches lactiques en culture pure (*Lc.l₆*, *Lc.l₁₂* et *Lc.l₇*) dont les diamètres sont respectivement : 15,20 mm, 18,30 mm et 18,50 mm.

Une activité inhibitrice a été constatée aussi avec les deux souches pures: *Lc.l₁₃* et *Lc.l₉* dont les diamètres étaient respectivement 17,40 mm et 25,20 mm.

Les travaux réalisés par Ryan et al. (1996) et Dougherty et al. (1998) montrent que la lacticine 3147 est une bactériocine produite par *L. lactis* DPC 3147, possède un large spectre d'inhibition. Elle est active contre certaines bactéries des genres suivants : *Escherichia*, *Acetobacter*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Listeria*.

Toutefois, une inhibition moins importante a été enregistrée avec les souches : *Lc.d₁*, *Lc.c₁* et *Lc.c₃* dont les diamètres des zones étaient respectivement 7,50 mm, 12 mm et 12,5 mm. Aucun effet inhibiteur n'a été observé avec la souche *Lc.d₂*.

Les résultats trouvés par Kojic et al. (1991), montrent que la bactériocine 550 produite par la souche *L. lactis*, ssp. *Lactis biovar diacetylactis* 550 possède un spectre d'inhibition restreint puisqu'il n'est actif que contre le genre *Lactococcus*.

D'autre part, la diplococcine produite par plusieurs souches de *L. lactis* ssp. *cremoris* possède un spectre d'inhibition qui se limite à des bactéries de l'espèce *L. lactis* ssp. *cremoris* (Davey et Richardson, 1981).

En culture mixte, les meilleures zones d'inhibition ont été constatées avec les combinaisons: *L₆D₁C₁* (13,10 mm), *L₆D₁C₃* (14,80 mm) et *L₇D₂C₁* (15,50 mm) (figure 20), ainsi qu'avec *L₇D₂C₃* (15,20 mm), *L₉D₁C₁* (15,70 mm) et *L₇D₁C₁* (21,40 mm) (tableau 10).

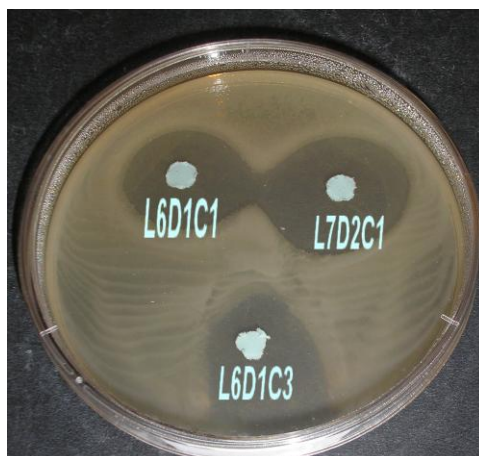


Figure 20 : Effet antibactérien des souches lactiques en cultures mixtes vis-à-vis d' *E.coli*.

Des travaux réalisés *in vitro* par Nader De Macias *et al.* (1993), montrent que les bactéries lactiques en culture mixte ont un effet inhibiteur sur *E. coli*.

Les autres combinaisons : $L_9D_2C_3$, $L_{13}D_2C_3$, $L_6D_2C_3$, $L_9D_2C_1$ et $L_{12}D_1C_3$ présentent des inhibitions moins importantes. La combinaison $L_{12}D_2C_3$ n'avait aucun effet inhibiteur sur *E. coli* (tableau 11). La différence de l'activité inhibitrice se trouvant entre les souches d'une même espèce peut être due à une faible homologie de leurs acides nucléiques responsables des caractères héréditaires (Sutra *et al.* 1998).

4-2-2 / Effet de *Lactococcus lactis* sur *C. freundii*

L'effet de *Lactococcus lactis* sur *C.freundii* a été moins important. Les meilleures zones d'inhibition enregistrées sont celles des souches en culture pure : *Lc.l12* (12,10 mm), *Lc.l6* (21,60 mm) et *Lc.l7* (22,30 mm) (figure21) et les combinaisons : $L_7D_2C_1$ (18,30 mm), $L_7D_2C_3$ (20,00 mm) et $L_7D_1C_1$ (22,40 mm). L'inhibition était moins importante pour les cultures: *Lc.l9*, $L_9D_2C_3$, $L_6D_2C_3$, $L_9D_2C_1$, $L_6D_1C_1$ et $L_6D_1C_3$. Les autres souches en culture pure et en combinaison n'ont présenté aucune activité inhibitrice (tableau 11).

Plusieurs espèces de la souche *L. lactis* ne possèdent aucune activité inhibitrice vis-à-vis du genre *Citrobacter*. La lactococcine R, produite par la souche R de *L. lactis ssp.cremoris*, la lactococcine β , de la souche *L. lactis ssp.lactis* biovar diacetyllactis WM4 et la lactococcine M de la souche 9B4 de *L. lactis ssp. Crémoris* ne sont pas actives contre le genre *Citrobacter* et toutes les bactéries Gram négatif. Ces bactériocines possèdent un large spectre d'inhibition

des bactéries Gram positif (Van Belkum et al., 1992 ; Venema et al., 1997 et Yildirim et Johnson, 1998).

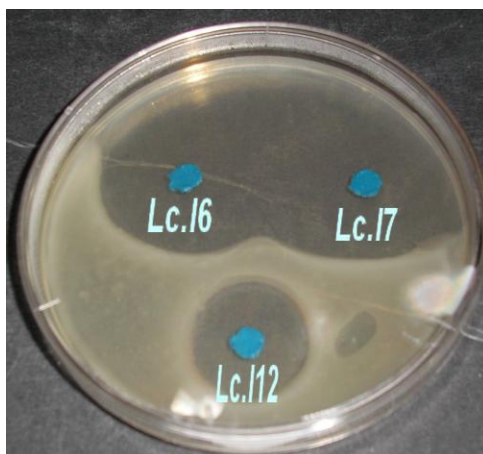


Figure 21 : Effet antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis de *C. freundii*.

4-2-3 / Effet de *Lactococcus lactis* sur *S. typhi*

L'inhibition de *S. typhi* a été constatée avec quelques souches de *L. lactis* en culture pure: *Lc.l₆* (14,30 mm), *Lc.l₇* (14,50 mm) et en combinaisons: *L₉D₂C₁* (13,10 mm) et *L₉D₂C₃* (14,5 mm) (figure22), ainsi que *L₉D₁C₁* (12,10 mm), *L₇D₂C₃* (12,40 mm), et *L₇D₁C₁* (15,70 mm). L'effet de la culture *L₇D₂C₁* était moins important (6,00 mm). Pour les autres cultures (pures ou en combinaisons) aucun effet n'a été constaté (tableau 11).

Les chercheurs Van Niel et al. (2002) et Van Deputte (2004), ont mis en évidence, in vitro, un puissant pouvoir bactéricide du yaourt contre *Salmonella*.

Les travaux de De vuyst (2004) ont montré que quelques bactéries lactiques peuvent détruire *Salmonella* et elles génèrent des substances antimicrobiennes qui contribuent à l'élimination des bactéries pathogènes.

Les résultats in vitro obtenus par Guetarni (2007) suggèrent que l'inhibition de *S. typhi* par les bactéries lactiques est plus importante en culture mixte.

D'après Van Belkum et al. (1992) la lacticine produite par *L. lactis* est active contre *Escherichia* et *Salmonella*.

De même, les résultats trouvés par Mamèche-Doumandji (2008), montrent que la souche lactique, *Lactobacillus acidophilus 11* inhibe quelques espèces pathogènes Gram négatif telles que, *E. coli* et *Salmonella thyphimurium*.



Figure 22 : Effet antibactérien des souches lactiques en cultures mixtes vis-à-vis de *S. typhi*.

4-2-4 / Effet de *Lactococcus lactis* sur *H. pylori*

L'inhibition de *H. pylori* par *L. lactis* en culture pure a été enregistrée avec les souches suivantes: *Lc.l₆* (12,10 mm) et *Lc.l₇* (20,80 mm) (figure 23) ainsi que *Lc.l₁₃* (12,60 mm) et *Lc.l₉* (18,50 mm). Les combinaisons présentant les meilleures zones d'inhibition sont: *L₉D₁C₁* (12,30 mm), *L₆D₂C₃* (15,40 mm) et *L₇D₂C₁* (25,30 mm) (figure 24). Une bonne inhibition a été observée aussi avec les combinaisons: *L₇D₂C₃* (17,20 mm) *L₆D₁C₁* (22,20 mm) et *L₇D₁C₁* (23,70 mm). Les autres souches en culture pure et en combinaisons n'ont présenté aucun effet sur *H. pylori* (tableau 11).

Les travaux réalisés par Wan et al. (1995), ont rapporté que la consommation régulière du yaourt additionné de *Bifidobacterium* induit une suppression effective de l'infection due à *H.pylori*.

Les recherches réalisées in vitro par Guetarni (2007) montrent que les souches lactiques utilisées (*Streptocoques*, *Lactobacilles* et *Bifidobacterium*) en culture pure ou mixte peuvent inhiber *H. pylori*.

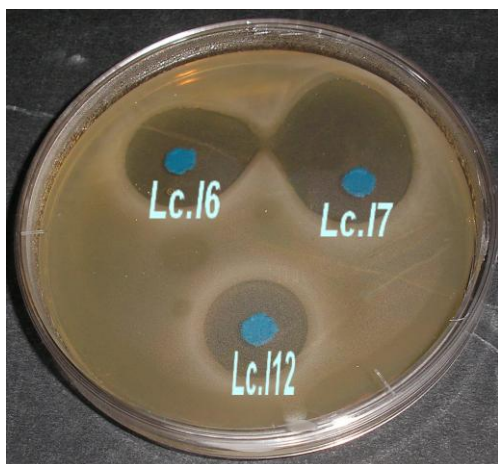


Figure 23 : Effet antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis d'*H. pylori*.



Figure 24 : Effet antibactérien des souches lactiques en cultures mixtes vis-à-vis d'*H. pylori*.

2-4-5/ Effet de *Lactococcus lactis* sur *C perfringens*

L'inhibition de *C. Perfringens* par les souches lactiques était très importante. En culture pure, les souches présentant de bonnes inhibitions sont: *Lc.l*₁₂ (18.40 mm), *Lc.l*₇ (20,60 mm) et *Lc.l*₆ (23,20 mm) (Figure 25). *Lc.l*₁₃ et *Lc.l*₉ ont donné aussi de bonnes inhibitions avec des diamètres de 22.30 mm et 36.30 mm. Par contre Les diamètres des zones d'inhibition étaient moins importants pour les deux souches : *Lc.c*₃ (4,40 mm) et *Lc.c*₁ (6.10 mm) et aucun effet n'a été observé avec les deux souches *Lc.d*₁ et *Lc.d*₂.

En culture mixte, les meilleures zones d'inhibition sont celles des combinaisons suivantes : *L*₇*D*₂*C*₃ (14.30 mm), *L*₇*D*₁*C*₁ (15.10 mm), *L*₉*D*₁*C*₁ (16,60 mm), *L*₆*D*₁*C*₃ (17.30 mm), *L*₁₂*D*₁*C*₃ (17.40 mm), *L*₇*D*₂*C*₁ (18.50 mm) et *L*₆*D*₁*C*₁ (19.20 mm) (tableau 11).

D'après les résultats trouvés, nous pouvons constaté que les souches de *L. lactis* sont très actives contre *Clostridium perfringens*.

Des résultats similaires ont été trouvés par Piard et al. (1990, 1992) et Rincé et al. (1997) qui montrent que la lacticine ou lactococcine produite par *L. lactis* 481 est très active contre le genre *Clostridium*.

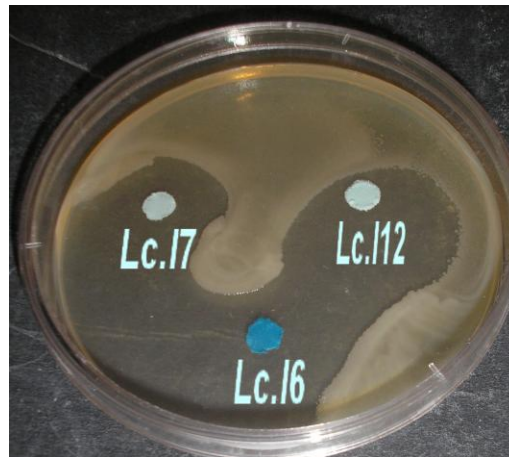


Figure 25 : Effet antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis de *C. perfringens*.

4-2-6/ Effet de *Lactococcus lactis* sur *S. aureus* (1)

D'après les résultats obtenus, toutes les cultures pures et mixtes des Lactocoques utilisées ont une activité inhibitrice envers *S. aureus* (1). Les meilleures zones d'inhibition ont été trouvées avec les cultures pures suivantes : *Lc.l₁₂* (16,60 mm), *Lc.l₇* (20,50 mm), et *Lc.l₆* (21,20 mm) (Figure 26).

Les souches *Lc.l₉* et *Lc.l₁₃* possèdent aussi un effet inhibiteur sur *S. aureus* (1) dont les diamètres des zones d'inhibition étaient respectivement: 12,30 mm et 18,10 mm. Un faible effet inhibiteur a été observé pour les souches: *Lc.d₂* (5,50mm), *Lc.d₁* (6,10 mm), *Lc.c₃* (7,30 mm) et *Lc.c₁* (9,50 mm).

Pour les cultures mixtes, les meilleures zones d'inhibition ont été observées avec les combinaisons suivantes : *L₇D₂C₁* (14,60 mm), *L₆D₁C₃* (15,20 mm) et *L₆D₁C₁* (17,10 mm).

Nous avons enregistré, également, des diamètres des zones d'inhibition importants pour les combinaisons suivantes : *L₉D₁C₁* (10,40 mm), *L₆D₂C₃* (14,40 mm), *L₁₂D₂C₃* (14,50 mm), *L₇D₂C₃* (15,20 mm), *L₁₂D₁C₃* (15,30 mm), *L₉D₂C₃* (16,60 mm), *L₇D₁C₁* (25,70 mm) et *L₉D₂C₁* (26,20 mm). Aucun effet n'a été observé avec la combinaison *L₁₃D₂C₃* (tableau 10).

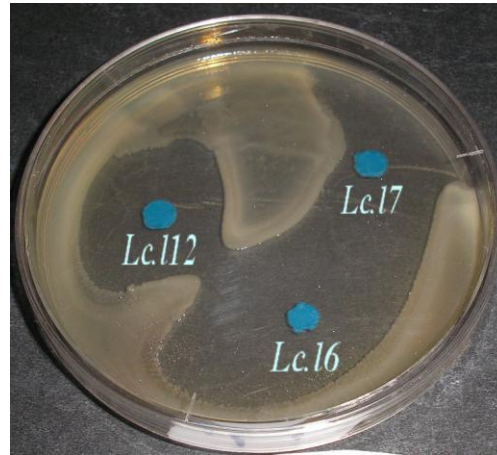


Figure 26 : Effet antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis de *S. aureus* (1).

4-2-7/ Effet de *Lactococcus lactis* sur *S. aureus* (2)

Une activité antagoniste très importante a été enregistrée avec *S. aureus* (2). Les souches pures présentant les meilleurs diamètres des zones d'inhibition sont : *Lc. l₇* (30,30 mm) et *Lc. l₆* (15,20 mm) (figure 27). Un diamètre élevé (30,10 mm) a été aussi enregistré avec *Lc. l₉*. Aucun effet n'a été constaté avec les souches *Lc. d₁* et *Lc. d₂*.

Les meilleures combinaisons sont celles présentant les diamètres suivants : 17,10 mm pour *L₇D₂C₁*, 17,20 mm pour *L₇D₂C₃*, 17,40 mm pour *L₆D₁C₁* et 20,70 mm pour *L₇D₁C₁* (tableau 10).

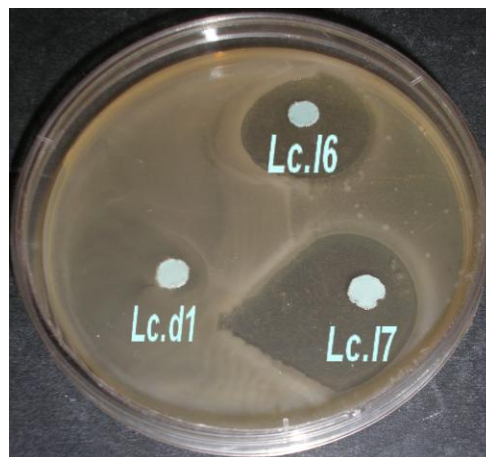


Figure 27: Effet antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis de *S. aureus* (2).

Ces résultats vont dans le même sens que ceux trouvés par des études antérieures. Ryan et al. (1996) et Dougherty et al. (1998) montrent que la lacticine produite par la souche *L. lactis* possède une activité inhibitrice très importante vis-à-vis du genre *Staphylococcus*. Yildirim et

Johnson (1998) trouvent que *Staphylococcus aureus* est très sensible à la lactococcine R produite par une souche de *L. lactis ssp. Cremoris*. Dans une autre étude *in vitro*, Allouche (2003) montrent que les souches lactiques testées peuvent inhiber les deux souches *S. aureus* et *S. aureus* 209. Les diamètres des zones d'inhibitions enregistrés pour ces deux souches étaient respectivement : 21,5 mm et 22 mm.

D'après nos résultats, nous pouvons constater que toutes les souches lactiques testées sont plus actives contre les bactéries pathogènes Gram positif que celles Gram négatif. Les meilleures zones d'inhibition ont été trouvées avec les souches en cultures pures qu'en cultures mixtes.

Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par Labioui et *al.* (2005) qui trouvent que les bactéries Gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet des bactéries lactiques. Trois souches lactiques utilisées dans leur étude sont actives contre les bactéries Gram positif et une seule souche lactique est efficace contre *Proteus mirabilis* (Gram négatif).

Après l'étude du pouvoir antibactérien des souches lactiques, nous pouvons déduire que toutes les souches de *Lactococcus lactis* testées possèdent un effet bactéricide vis-à-vis les germes pathogènes utilisés, à l'exception de : *Lc.l13*, *Lc.l9* et *Lc.l6* qui possèdent une action bactériostatique vis-à-vis d' *H. pylori*. Cette observation a été faite après une semaine d'incubation à 37°C (figure 28 et 29).

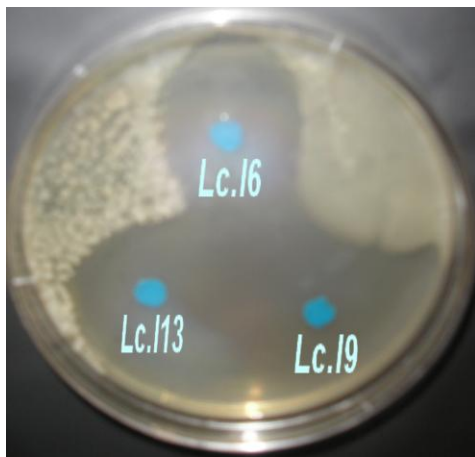


Figure 28 : Pouvoir antibactérien de *Lc.l13*, *Lc.l9* et *Lc.l6* vis-à-vis d' *H. pylori* après 24h d'incubation à 37° C.

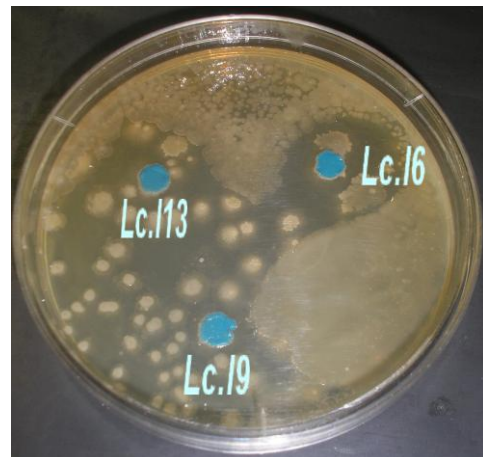


Figure 29 : Pouvoir antibactérien de *Lc.l13*, *Lc.l9* et *Lc.l6* vis-à-vis d' *H. pylori* après une semaine d'incubation à 37° C.

Selon Piard et Desmazeaud (1992) ; Schved et *al.* (1994) et Casla et *al.* (1996) les bactéries à pouvoir antibactérien peuvent avoir trois types d'effets :

Un effet bactériostatique qui se manifeste par un ralentissement ou arrêt de la croissance, ou bien un effet bactéricide qui se traduit par une perte de la viabilité avec une lyse cellulaire, ou alors un effet bactéricide sans lyse cellulaire .

4-3 / Dénombrement des souches après interaction

Après les tests d'inhibition, les bactéries lactiques sélectionnées sont celles qui ont donné des zones d'inhibition importantes. Des dénombrements ont été faits pour déterminer les charges des cultures lactiques sélectionnées ainsi que les bactéries pathogènes utilisées.

Les résultats montrent que le nombre des bactéries pathogènes diminue considérablement après interaction. Par exemple pour *E. coli*, la charge initiale était de $1,12 \times 10^8$ cellules/ml puis elle diminue pour atteindre respectivement après interaction avec : *Lc.l7*, *Lc.l6*, *L7D2C1* et *L6D1C3*, $2,00 \times 10^7$ cellules/ml, $1,10 \times 10^7$ cellules/ml, $1,13 \times 10^5$ cellules/ml et $9,80 \times 10^4$ cellules/ml.

La même constatation a été faite pour *C. freundii*, son nombre initiale est de $1,52 \times 10^7$ cellules/ml puis il diminue pour atteindre respectivement avec *Lc.l12*, *Lc.l9*, *L7D2C3* et *L6D1C3*, $5,66 \times 10^5$ cellules/ml, $4,44 \times 10^5$ cellules/ml, 10^4 cellules/ml et $7,20 \times 10^5$ cellules/ml après interaction.

La charge de *S.typhi* a aussi diminué commençant par une charge de $2,30 \times 10^4$ cellules/ml et arrivant jusqu'à 10^2 cellules/ml avec *Lc.l7*, $4,56 \times 10^3$ cellules/ml avec *Lc.l6*, 99 cellules/ml avec *L9D2C3* et $3,03 \times 10^2$ cellules/ml avec *L7D1C1*.

H.pylori présente une charge initiale de $6,80 \times 10^6$ cellules/ml puis elle diminue après interaction jusqu'à $2,75 \times 10^5$ cellules/ml avec *Lc.l9*, $2,30 \times 10^4$ cellules/ml avec *L6D2C3* et $4,43 \times 10^4$ cellules/ml avec *L7D2C1*.

Une diminution du nombre de *C. perfringens* a été observée, en effet il était de $9,20 \times 10^9$ cellules/ml au début, après 24 heures il atteint par exemple : $2,60 \times 10^6$ cellules/ml avec *Lc.l12*, $5,60 \times 10^7$ cellules/ml avec *Lc.l9*, $1,11 \times 10^6$ cellules/ml avec *L9D2C3* et $4,33 \times 10^6$ cellules/ml avec *L12D1C3*.

La charge initiale de *S.aureus* (1) est de $7,10 \times 10^5$ cellules/ml, elle arrive par exemple à : $8,70 \times 10^4$ cellules/ml avec *Lc.l12*, $4,04 \times 10^5$ cellules/ml avec *Lc.l13*, $9,50 \times 10^3$ cellules/ml avec *L7D2C1* et $3,10 \times 10^4$ cellules/ml avec *L6D1C3* après 24 heures d'incubation à 37°C.

S.aureus (2) présente un nombre de $6,25 \times 10^5$ cellules/ml au début alors qu'il arrive jusqu'à $6,4 \times 10^4$ cellules/ml avec *Lc.l13*, $7,63 \times 10^4$ cellules/ml avec *Lc.l6* et $4,10 \times 10^4$ cellules/ml avec *L7D2C1*. Cette diminution de la charge initiale des bactéries pathogènes peut être due à l'effet inhibiteur de ces bactéries lactiques.

Une légère diminution du nombre de cellules a été observée pour les souches lactiques aussi bien en cultures pures qu'en cultures mixtes, cela peut être expliqué par l'épuisement des éléments nutritifs du milieu de culture.

4-4/ Etude de la nature des substances inhibitrices

Pour la réalisation de cette partie, nous avons sélectionné pour chaque bactérie pathogène les souches lactiques et les combinaisons qui ont donné les meilleures zones d'inhibition.

4-4-1/ Elimination de l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène

Afin d'étudier la nature des substances inhibitrices, il est nécessaire de travailler dans des conditions expérimentales éliminant l'influence des acides organiques, notamment l'acide lactique, et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Les résultats de la recherche du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion des disques ont montré une absence totale d'une activité antimicrobienne dans les extraits cellulaires (culots). Par contre, la fraction extracellulaire correspondant au surnageant présente un fort pouvoir antibactérien (Tableau 11).

Pour *E. coli*, les meilleures zones d'inhibition ont été trouvées avec *Lc.l13* (17,40 mm), *Lc.l7* (18,20 mm) et *Lc.l12* (18,60 mm) ainsi qu'avec les cultures mixtes : *L7D2C1* (14,20 mm), *L7D2C3* (14,10 mm) et *L7D1C1* (16,30 mm) (figure 30).



Figure 30 : Pouvoir antibactérien des cultures lactiques vis-à-vis d' *E.coli* après élimination des acides organique et du H_2O_2 .

Une bonne activité antibactérienne a été observée envers *C. freundii* avec les cultures: $L_7D_2C_1$ (16,40 mm), $L_7D_2C_3$ (17,50 mm), $L_7D_1C_1$ (18,30 mm), *Lc.l₆* (19,10 mm) et *Lc.l₇* (19,20 mm) (Tableau 11).

Nous avons aussi enregistré une activité inhibitrice élevée vis-à-vis de *S. typhi* avec les cultures: *Lc.l₆* (14,10 mm), *Lc.l₇* (15,30 mm) et $L_7D_1C_1$ (15,40 mm) (figure 31).

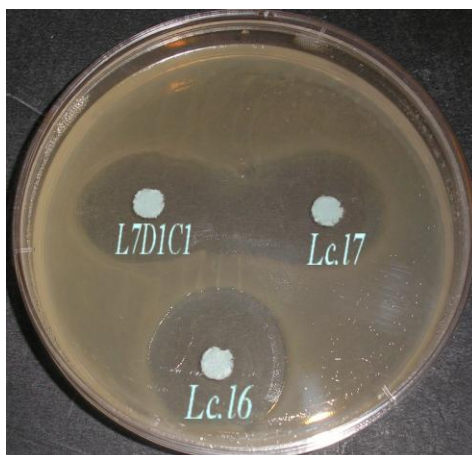


Figure 31 : Pouvoir antibactérien des cultures lactiques vis-à-vis de *S. typhi* après élimination des acides organique et du H₂O₂

Tableau 11 : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après élimination de l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène

S. Pathogène	<i>E. coli</i>	<i>C.frendii</i>	<i>S. typhi</i>	<i>H.pylori</i>	<i>C.perfringens</i>	<i>S.aureus</i> (1)	<i>S.aureus</i> (2)
S. lactique	Diamètres des zones d'inhibition (mm)						
<i>Lc.l₇</i>	18,20 ±0,10	19,20 ±0,30	15,30 ±0,20	17,20 ±1,00	22,30 ±1,00	17,20 ±0,30	20,30 ±0,50
<i>Lc.l₁₂</i>	18,60 ± 1,00	-	-	-	14,10 ±0,20	-	-
<i>Lc.l₆</i>	13,00 ±0,40	19,10 ±1,00	14,10 ±1,10	-	23,20±1,10	17,10 ±1,00	-
<i>Lc.l₉</i>	17,10 ±1,10	-	-	15,60 ±1,10	24,20 ±0,10	-	19,50 ±0,50
<i>Lc.l₁₃</i>	17,4 0±1,00	-	-	-	16,10 ±1,00	16,50 ±0,50	
$L_7D_1C_1$	16,30 ±1,00	18,30 ±1,00	15,40 ±0,20	23,30 ±0,20	-	-	20,40±1,10
$L_7D_2C_3$	14,10 ±0,20	17,50 ±1,00	-	11,20 ±0,40	-	-	16,30±0,50
$L_7D_2C_1$	14,20 ±0,50	16,40 ±0,40	-	21,10 ±1,00	17,70 ±1,10	-	14,60±1,00
$L_9D_1C_1$	13,20 ±1,00	-	-	-	-	-	-
$L_9D_2C_3$	-	-	13,20 ±0,00	-	-	-	-
$L_6D_1C_1$	-	-	-	13,70 ±1,00	19,50 ±0,50	17,20 ±1,00	15,50 ±0,50
$L_6D_1C_3$	-	-	-	-	17,10 ±1,00	-	-
$L_{12}D_1C_3$					15,30 ±0,50	-	
$L_9D_2C_1$						20,10 ±0,20	

- : Test d'inhibition non réalisé.

Une importante inhibition d'*H. pylori* a été observée par les cultures lactiques : *Lc.l₉* (15,60 mm), *Lc.l₇* (17,20 mm) et *L₇D₁C₁* (23,30mm) (figure 32).

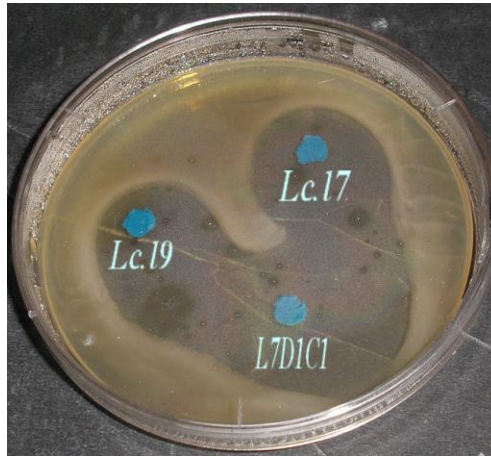


Figure 32 : Pouvoir antibactérien des souches lactiques vis-à-vis d' *H. pylori* après élimination des acides organique et du H₂O₂.

Les résultats obtenus montrent que l'activité inhibitrice des bactéries pathogènes Gram positif est plus importante que celles observées avec les bactéries Gram négatif.

Pour *C. perfringens* les meilleures zones d'inhibition ont été enregistrées avec les cultures pures: *Lc.l₇* (22,30 mm), *Lc.l₆* (23,20 mm) et *Lc.l₉* (24,20 mm) (figure 33), ainsi qu'avec les cultures mixtes : *L₆D₁C₃* (17,10 mm), *L₇D₂C₁* (17,70 mm) et *L₆D₁C₁* (19,50 mm) (tableau 10).

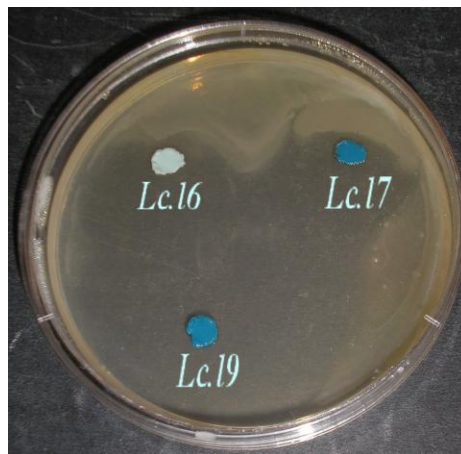


Figure 33 : Pouvoir antibactérien des souches lactiques sur *C. perfringens* après élimination des acides organique et du H₂O₂.

L'effet inhibiteur des souches lactiques a été observé avec les souches de *S. aureus* après élimination des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène.

Pour *S. aureus* (1) les zones d'inhibition ayant des diamètres élevés sont observées avec : *Lc.l₁₃* (16,50 mm), *Lc.l₆* (17,10 mm), *Lc.l₇* (17,20 mm), *L₆D₁C₁* (17,20 mm), *L₇D₁C₁* (18,40

mm) et $L_9D_2C_1$ (20,10 mm) (tableau 11). La souche *S. aureus* (2) présente une activité inhibitrice très importante avec les cultures : $L_6D_1C_1$ (15,50 mm), *Lc.l₉* (19,50 mm) et *Lc.l₇* (20,30 mm) (figure 34). Un effet inhibiteur important a été constaté avec les deux souches : $L_7D_2C_3$ (16,30 mm), et $L_7D_1C_1$ (20,40 mm).

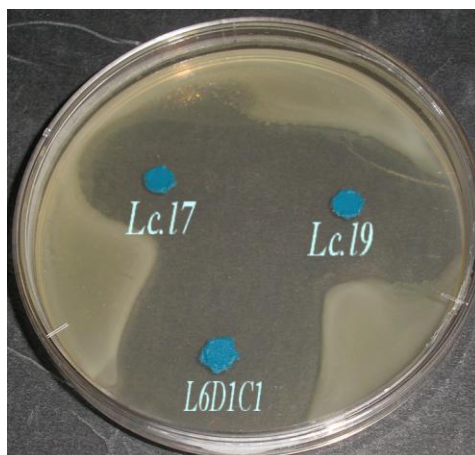


Figure 34 : Pouvoir antibactérien des cultures lactiques vis-à-vis *S. aureus* (2) après élimination des acides organique et du H_2O_2 .

En comparant les résultats du tableau 10 avec ceux du tableau 9 , nous trouvons que les diamètres d'inhibition restent toujours élevés même après l'ajout de la catalase et la neutralisation du surnageant. Nous avons enregistré une activité inhibitrice des souches lactiques dans la culture entière ainsi que dans le surnageant. L'absence de l'effet inhibiteur dans le culot suggère que la substance inhibitrice se trouve exclusivement dans le milieu de culture donc c'est une substance extracellulaire.

Les mêmes constatations ont été faites par Labioui et *al.*,(2005), qui ont montré que la substance inhibitrice des souches lactiques testées (*Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*) se trouve dans le surnageant après élimination de l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène.

Les travaux de Aïchouba, (2007), réalisés *in vitro* ont montré que les surnageants récupérés des deux souches de *L. lactis* (*Lc.l₂* et *Lc.l₉*) ont pu inhiber les bactéries pathogènes *E. coli*, *S. aureus* (1), *S. aureus* (2), *S. aureus* (3), *Pseudomonas aerogenosa* et *Clostridium perfringens*.

Tabib, (2006), a trouvé des zones d'inhibition variant entre 10 et 13 mm lors de l'interaction de *L. lactis* et *E. coli*.

4-4-2/ Effet des traitements thermiques sur la substance inhibitrice

L'effet des traitements thermiques a été étudié en traitant le surnageant de chaque culture pure et mixte pendant 30 minutes à 60°C ; 80°C ; 90°C et 100°C, pendant 15 minutes à 100°C et pendant 20 minutes à 121°C.

Les résultats du traitement thermique à 60 °C pendant 30 minutes montrent que le surnageant de chaque culture lactique utilisé garde son activité antibactérienne (tableau 11).

Par exemple des inhibitions importantes de *E.coli* ont été constatées avec les cultures : *L7D2C3* (15,20 mm) et *L7D1C1* (16,20 mm) (figure 35). Ainsi qu'avec les cultures *Lc.l13* (17,30 mm) et *Lc.l7* (20,20 mm).

Une bonne activité antimicrobienne a été aussi constatée par les cultures lactiques vis-à-vis de *C. freundii* et *S. typhi* (tableau 12).

Avec *H. pylori*, nous constatons que l'activité inhibitrice reste stable à 60 °C pendant 30 minutes. Des diamètres des zones d'inhibition importants ont été enregistrés (figure 36).

Un effet inhibiteur élevé a été observé avec les bactéries Gram positif après un chauffage de 30 mn à 60°C (tableau 12). La figure 37 montre les zones d'inhibition trouvées après interaction de *S. aureus* (1) et les cultures mixtes des souches lactiques.



Figure 35 : Pouvoir antibactérien des cultures Lactiques vis-à-vis d' *E. Coli* après traitement thermique à 60° C/ 30 mn.



Figure 36 : Pouvoir antibactérien des cultures lactiques vis-à-vis d' *H. pylori* après traitement thermique à 60° C/ 30 mn.

Tableau 12 : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après traitement thermique à 60 °C/30 mn.

S. Pathogène	<i>E. coli</i>	<i>C.freundii</i>	<i>S. typhi</i>	<i>H.pylori</i>	<i>C.perfringens</i>	<i>S.aureus</i> (1)	<i>S.aureus</i> (2)
S. lactique	Diamètres des zones d'inhibition (mm)						
<i>Lc.L7</i>	20,20± 0,10	17,50 ± 0,50	16,60 ± 1,00	14,60± 1,10	17,40 ± 0,10	20,10 ± 1,10	28,30± 0,40
<i>Lc.l12</i>	11,50 ± 0,50	-	-	-	12,20 ±0,20	-	-
<i>Lc.l6</i>	13,30 ± 0,10	16,40 ± 1,00	15,50 ± 1,10	-	19,10 ± 0,10	15,20 ± 1,00	-
<i>Lc.l9</i>	15,70 ± 1,10	-	-	13,10 ±1,00	22,10 ± 0,40	-	17,10 ± 1,00
<i>Lc.l13</i>	17,30 ± 0,20	-	-	-	14,10 ± 1,00	15,30 ± 1,00	-
<i>L7D1C1</i>	16,20 ± 1,00	15,6 ± 1,00	10,10 ± 0,30	20,20 ± 1,00	-	16,50 ± 0,50	15,30 ± 0,30
<i>L7D2C3</i>	15,20 ± 0,10	14,20 ± 0,20	-	12,10 ± 1,00	-	-	15,30 ±0,20
<i>L7D2C1</i>	11,10 ± 1,00	14,10 ± 0,20	-	17,10 ± 1,00	20,30 ± 0,20	-	15,20 ±1,10
<i>L9D1C1</i>	12,30 ± 1,00	-	-	-	-	-	-
<i>L9D2C3</i>	-	-	8,20 ± 0,50	-	-	-	-
<i>L6D1C1</i>	-	-	-	15,60 ±0,50	21,60 ± 1,10	12,50 ± 0,50	11,20 ± 0,10
<i>L6D1C3</i>	-	-	-	-	14,3 0± 0,50	-	-
<i>L12D1C3</i>	-	-	-	-	12,30 ± 1,00	-	-
<i>L9D2C1</i>	-	-	-	-	-	18,20 ± 1,00	-
<i>L9D2C1</i>	-	-	-	-	-	18,20 ± 1,00	-

- : Test d'inhibition non réalisé.

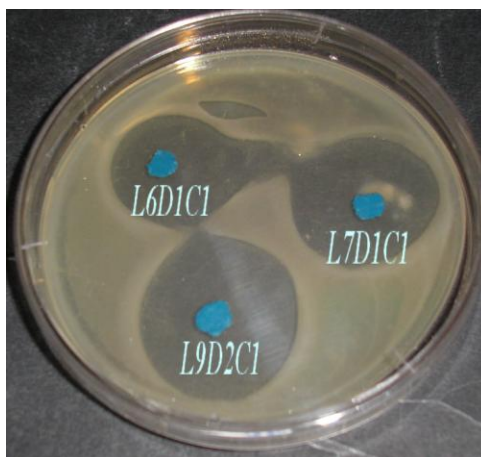


Figure 37 : Pouvoir antibactérien des cultures lactiques vis-à-vis de *S. aureus* (1) après traitement thermique à 60 °C/ 30 mn.

En comparant ces résultats avec ceux du tableau 11 on trouve que l'activité inhibitrice reste stable et parfois elle augmente lorsque le surnageant a subi un traitement de 60 °C/30 minutes. Ces résultats vont dans le même sens que ceux trouvés par Allouche (2003), qui a

trouvé que le traitement à 60 °C pendant 10 minutes n'influe pas sur l'activité antibactérienne des bactéries lactiques. De même Kojic et al. (1991), ont trouvé que la bactériocine 550 produite par la souche *L. lactis* 550 est résistante à un traitement d'une heure à 60 °C.

Les cultures lactiques possèdent une activité inhibitrice élevée vis-à-vis des sept souches pathogènes après l'application d'un traitement thermique à 80 °C pendant 30 minutes (tableau 14). Par exemple les meilleures zones d'inhibition d'*E. coli* ont été trouvées avec les souches pures : *Lc.l₁₃* (15,30 mm) et *Lc.l₇* (21,10 mm).

L'inhibition d'*H. pylori* a été enregistrée avec les cultures : *Lc.l₇* (14,60 mm), *Lc.l₉* (13,30 mm) et *L₇D₁C₁* (19,10 mm) (figure 38).

L'effet des cultures lactiques était important pour les souches pathogènes Gram positif. Nous avons enregistré des diamètres des zones d'inhibition élevés : 22,20 mm avec *L₆D₁C₁* envers *C.perfringens*, 27,10 mm avec *Lc.l₇* envers *S. aureus* (1) et 28,10 mm avec *L.l₇* envers *S. aureus* (2).

Les travaux de Mamèche-Doumandji (2008), montrent que la substance inhibitrice produite par la bactérie lactique étudiée (*lactobacillus acidophilus* 11) reste stable pendant 30 minutes à des températures de 70°C jusqu'à 90°C.

Tableau 13 : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après traitement thermique à 80 °C/30 mn.

S. Pathogène	<i>E. coli</i>	<i>C.freundii</i>	<i>S. typhi</i>	<i>H. pylori</i>	<i>C.perfringens</i>	<i>S. aureus</i> (1)	<i>S. aureus</i> (2)
S. lactique	Diamètres des zones d'inhibition (mm)						
<i>Lc.L₇</i>	23,10 ± 1,00	16,70 ± 0,40	13,20 ± 0,30	14,6 ± 1,00	15,20 ± 1,10	27,10 ± 1,00	28,10 ± 1,10
<i>Lc.l₁₂</i>	12,20 ± 0,10	-	-	-	14,20 ± 0,40	-	-
<i>Lc.l₆</i>	11,10 ± 1,00	15,30 ± 1,00	12,30 ± 0,20	-	17,30 ± 1,00	15,10 ± 1,00	-
<i>Lc.l₉</i>	13,10 ± 0,20	-	-	13,30 ± 0,30	20,40 ± 1,00	-	14,10 ± 0,50
<i>Lc.l₁₃</i>	15,30 ± 0,40	-	-	-	12,30 ± 1,00	12,20 ± 0,20	-
<i>L₇D₁C₁</i>	15,60 ± 0,50	15,10 ± 0,40	11,80 ± 1,10	19,10 ± 0,10	-	14,30 ± 1,00	20,20 ± 1,00
<i>L₇D₂C₃</i>	7,10 ± 1,00	13,40 ± 0,10	-	11,30 ± 0,20	-	-	15,50 ± 0,50
<i>L₇D₂C₁</i>	14,20 ± 0,20	12,10 ± 0,10	-	20,20 ± 1,00	20,60 ± 0,50	-	15,30 ± 0,20
<i>L₉D₁C₁</i>	9,20 ± 1,00	-	-	-	-	-	-
<i>L₉D₂C₃</i>	-	-	10,20 ± 1,00	-	-	-	-
<i>L₆D₁C₁</i>	-	-	-	12,30 ± 1,00	22,20 ± 0,20	12,2 ± 1,10	8,10 ± 0,30
<i>L₆D₁C₃</i>	-	-	-	-	15,10 ± 1,00	-	-
<i>L₁₂D₁C₃</i>	-	-	-	-	14,20 ± 0,40	-	-
<i>L₉D₂C₁</i>	-	-	-	-	-	21,10 ± 0,30	-

- : Test d'inhibition non réalisé.

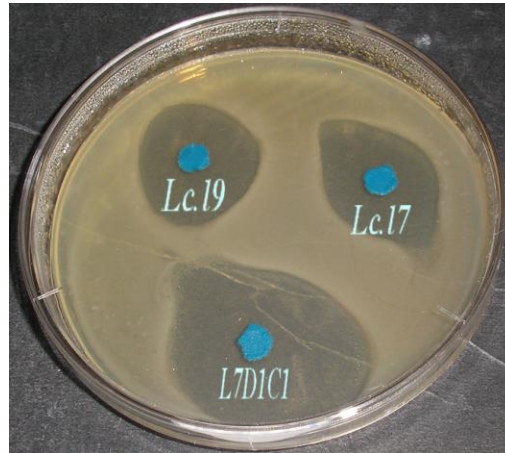


Figure 38 : Pouvoir antibactérien des cultures lactiques vis-à-vis d' *H. pylori* après traitement thermique à 80° C/ 30 mn.

Les résultats du tableau 14 montrent l'effet des souches lactiques sur les bactéries pathogènes après un traitement thermique des surnageants de 90 °C pendant 30 minutes.

Des diamètres des zones d'inhibition élevés ont été enregistrés, par exemple pour *E. coli* : 19,50 mm avec *Lc.l7* (figure 39), pour *H. pylori* : 21,20 mm avec *L7D1C1*, pour *C. perfringens* : 24,10 mm avec *L6D1C1*, pour *S.aureus* (1) : 19,10 mm avec *Lc.l7* et pour *S.aureus* (2) : 22,20 avec *Lc.l7* (tableau 14).

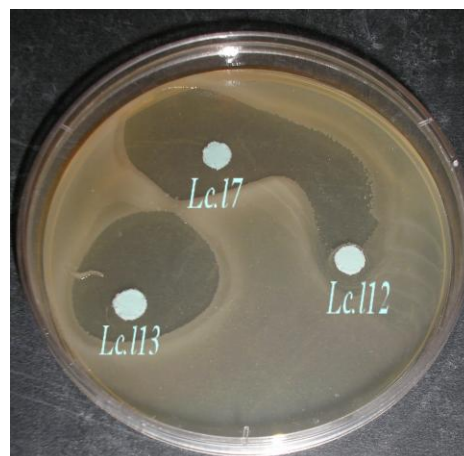


Figure 39 : Pouvoir antibactérien des souches lactiques sur *E. coli* après traitement thermique à 90° C/ 30 mn.

Tableau 14 : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après traitement thermique à 90 °C/30 mn.

S. Pathogène	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	<i>S. typhi</i>	<i>H. pylori</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>S. aureus</i> (1)	<i>S. aureus</i> (2)
S. lactique	Diamètres des zones d'inhibition (mm)						
<i>Lc.L7</i>	19,50 ±0,50	16,10 ±0,20	15,20 ±1,00	15,20 ±0,20	14,40 ± 1,00	19,10 ±0,20	22,20 ±1,00
<i>Lc.l12</i>	14,20 ±1,00	-	-	-	13,1 ±1,00	-	-
<i>Lc.l6</i>	9,10 ±0,40	12,20 ±1,00	12,50 ±0,50	-	16,20 ±1,00	15,30 ±0,10	-
<i>Lc.l9</i>	10,20 ±0,20	-	-	10,10 ±1,00	21,30 ±0,20	-	17,40 ±0,20
<i>Lc.l13</i>	16,50 ±0,50	-	-	-	12,20 ±0,50	12,20 ±1,00	-
<i>L7D1C1</i>	16,20 ±1,00	13,10 ±0,30	9,10 ±1,10	21,20 ±1,00	-	15,50 ±0,50	20,30 ±0,10
<i>L7D2C3</i>	12,10 ±0,10	11,20 ±1,00	-	9,50 ±0,50	-	-	19,10 ±0,20
<i>L7D2C1</i>	13,30 ±1,10	12,3 ±0,40	-	17,50 ±0,50	16,30 ±0,10	-	17,20 ±1,10
<i>L9D1C1</i>	10,10 ±0,20	-	-	-	-	-	-
<i>L9D2C3</i>	-	-	8,10 ±1,00	-	-	-	-
<i>L6D1C1</i>	-	-	-	13,30 ±0,20	24,10 ±0,20	14,10 ±0,20	11,50 ±0,50
<i>L6D1C3</i>	-	-	-	-	15,50 ±0,50	-	-
<i>L12D1C3</i>	-	-	-	-	13,30 ±0,30	-	-
<i>L9D2C1</i>	-	-	-	-	-	15,50 ±0,50	-

- : Test d'inhibition non réalisé.

Les résultats du traitement thermique à 100 °C pendant 30 mn montrent que la plupart des souches de *L. lactis* en cultures pures ou mixtes ne présentent aucun effet inhibiteur à l'exception de quelques cultures.

Nous avons constaté pour *E. coli* des zones d'inhibition avec *Lc.l7* (13,10 mm) et *Lc.l12* (12,00 mm). L'inhibition de *C. freundii* était avec une seule souche *Lc.l7* (21,20 mm). Aucune inhibition n'a été observée avec *S. typhi*. *H. pylori* a été inhibée par les trois cultures : *Lc.l7* (6,00 mm), *Lc.l9* (4,00 mm) et *L7D1C1* (22,00 mm) (figure 40).

Nous avons enregistré un effet inhibiteur avec *C. perfringens* par deux souches pures : *Lc.l7* (12,50 mm) et *Lc.l6* (16,00 mm).

Des diamètres des zones d'inhibition importants ont été observés pour *S. aureus* (1) par *Lc.l7* (16,20 mm), *Lc.l6* (15,00 mm) et pour *S. aureus* (2) par *Lc.l7* (24,00 mm).

D'après ces résultats, nous constatons que l'activité inhibitrice des souches de *L. lactis* en culture pure ou mixte décroît rapidement après un traitement de 100 °C pendant 30 mn.

Un résultat semblable a été obtenu par Amrouche (2003), montrant que l'activité antagoniste d'une souche de *L. lactis* décroît rapidement après un traitement de 100 °C pendant 30 minutes.

Une étude réalisée par Davey et Richardson (1981), montre que la diplococcine produite par *L. lactis* se montre beaucoup plus sensible à la chaleur, perdant jusqu'à 75 % de son activité après une minute à 100 °C.

La lacticine 48L est un lantibiotique produit par la souche *L. lactis* : CNRZ 481 résiste à un traitement d'une heure à 100 °C (Piard et al., 1990 et Piard et al., 1992).

Le tableau 16 montre que l'activité inhibitrice des souches de *L. lactis* reste stable après un traitement de 100 °C pendant 15 minutes. Les sept souches pathogènes utilisées ont été inhibées par les souches lactiques testées.

Des zones d'inhibition importantes ont été constatées avec *E. coli* par les cultures pures : *Lc.l13* (14,10 mm) et *Lc.l7* (15,50 mm) (figure 41) et les cultures mixtes *L7D1C1* (14,50 mm) et *L7D2C1* (14,50 mm). Une activité antibactérienne importante a été constatée avec *C. freundii* et *S. typhi* par la souche *Lc.l7* dont les diamètres étaient respectivement : 17,50 mm et 16,20 mm.

L'inhibition d' *H. pylori* était moins importante pour *Lc.l7* (7,10 mm), *Lc.l9* (6,30 mm) et *L7D2C3* (7,40 mm), par contre les autres cultures lactiques ont présenté de meilleures zones d'inhibition: 12,20 mm pour *L6D1C1*, 16,20 mm pour *L7D2C1* et 18,2 mm pour *L7D1C1*.

Des zones d'inhibition importantes ont été trouvées avec les bactéries pathogènes Gram positif, par exemple pour *C. perfringens*, le diamètre enregistré avec la culture *L6D1C1* est de 19,20 mm, pour *S. aureus* (1) le diamètre est de 22,40 mm avec *Lc.l7* et pour *S. aureus* (2) le diamètre est de 25,50 mm avec *Lc.l7* (tableau 15).

Par ailleurs, aucune activité inhibitrice n'a été détectée après autoclavage des surnageants à 121 °C pendant 20 minutes.

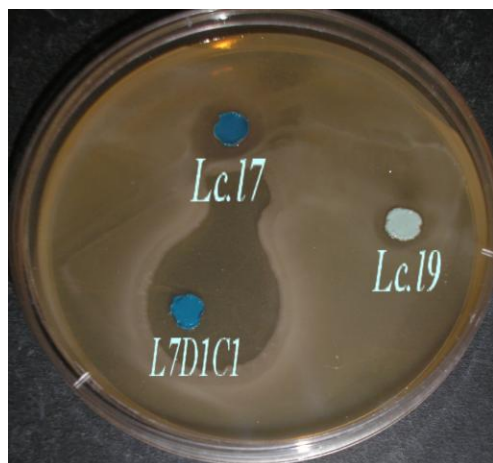


Figure 40 : Pouvoir antibactérien des souches lactiques vis-à-vis d' *H. pylori* après traitement thermique à 100° C/ 30 mn.



Figure 41 : Pouvoir antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis d' *E. coli* après traitement thermique à 100° C/ 15 mn.

Tableau 15 : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après traitement thermique à 100°C/15 mn.

S.Pathogène	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	<i>S. typhi</i>	<i>H. pylori</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>S. aureus (1)</i>	<i>S. aureus (2)</i>
S. lactique	Diamètres des zones d'inhibition (mm)						
<i>Lc.l7</i>	15,50±0,50	17,50 ±0,50	16,20 ± 0,10	7,10 ±0,20	14,50 ± 0,50	22,4 0±0,20	25,50 ±0,40
<i>Lc.l12</i>	13,10±1,00	-	-	-	12,10 ±1,00	-	-
<i>Lc.l6</i>	10,30±0,20	11,20 ±0,50	12,30 ±1,10	-	15,10 ±1,00	15,50 ±0,50	-
<i>Lc.l9</i>	10,20±1,00	-	-	6,30 ±0,10	18,30 ±0,20	-	17,50 ±0,50
<i>Lc.l13</i>	14,10±0,10	-	-	-	12,30 ±1,10	9,10 ±1,00	-
<i>L7D1C1</i>	14,50 0,50	12,60 ±0,30	7,50 ±0,50	18,2 0±0,40	-	13,20 ±1,00	18,40 ±0,30
<i>L7D2C3</i>	10,30±0,10	12,10 ±1,00	-	7,4 0±1,00	-	-	12,20 ±0,10
<i>L7D2C1</i>	14,50±0,50	12,30 ±0,50	-	16,20 ±1,00	17,60 ±0,50	-	6,10 ±1,00
<i>L9D1C1</i>	8,20 ±0,10	-	-	-	-	-	-
<i>L9D2C3</i>	-	-	9,30 ±0,20	-	-	-	-
<i>L6D1C1</i>	-	-	-	12,20 ±1,00	19,20 ±1,00	9,20 ±1,00	7,10 ±0,20
<i>L6D1C3</i>	-	-	-	-	14,70 ±1,10	-	-
<i>L12D1C3</i>	-	-	-	-	11,10 ±0,10	-	-
<i>L9D2C1</i>	-	-	-	-	-	14,10 ±0,10	-

- : Test d'inhibition non réalisé.

D'après nos résultats, nous avons remarqué que les substances inhibitrices présentes dans les surnageants des cultures lactiques, sont stables pendant 30 mn à 60°C et 90°C. Elles sont stables aussi pendant 15 minutes à 100 °C mais leur activité décroît lors de traitement de 100 °C pendant 30 minutes et de 121 °C pendant 20 minutes.

D'autres travaux montrent que l'activité des substances inhibitrices produites par *L. lactis* résiste à la chaleur ; Yildirim et Johnson, (1998) ont trouvé que la lactococcine produite par *L. lactis* reste stable après un traitement de 15 minutes à 121 °C. Hurst, (1981), et Mulders et al. (1991) montrent que la nisine produite par plusieurs souches de *L. lactis ssp. Lactis* est moins sensible à la chaleur, elle est stable à 115 °C pendant 15 minutes.

Par contre la Lactococcine 972 produite par la souche *L. lactis ssp. Lactis* est sensible à un traitement de 15 minutes à 50 °C.

Les travaux de Allouche (2003), montrent que l'activité antimicrobienne de la souche *Lactobacillus acidophilus (L.ba1)* est totalement détruite après un cycle d'autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

Selon Klaenhammer, (1998), les bactériocines présentent une sensibilité aux traitements thermiques qui varie en fonction de leur poids moléculaire et de leur structure.

Ainsi, les bactériocines de faible poids moléculaire sont généralement thermorésistantes, tel est le cas de la nisine, de la lactostrepsine, de la lacticine, à l'exception de la diplococcine qui est inactive à 100 °C (Piard et Desmazeud, 1992) alors que celles qui sont de haut poids moléculaire sont thermolabiles ; la bactériocine like issue d'un streptocoque lactique mésophile est sensible à un chauffage de 100 °C et 121 °C pendant 15 minutes (Gomez et al., 1997).

4-4-3/ effet des enzymes protéolytiques

Le surnageant de chaque culture lactique (pure ou en combinaison) a été soumis à l'action de plusieurs enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine, α -chymotrypsine et pronase).

La pronase, la trypsine et l' α -chymotrypsine altèrent complètement l'activité antagoniste des substances inhibitrices contenues dans les surnageants.

La pepsine affecte l'activité inhibitrice de toutes les cultures lactiques testées à l'exception des deux cultures pures *Lc.l₇* et *Lc.l₆*.

Nous avons enregistré des zones d'inhibition avec chaque bactérie pathogène. Pour *E. coli*, les diamètres des zones étaient de 12,10 mm avec *Lc.l₇* et 11,20 mm avec *Lc.l₆* (figure 42).



Figure 42 : Pouvoir antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis d'*E. coli* après traitement par la pepsine.

Une inhibition de *C. freundii* par *Lc.l7* et *Lc.l6* a été constatée dont les diamètres des zones d'inhibition étaient respectivement de : 12,30 mm et 11,10 mm. Pour *S. typhi*, les diamètres enregistrés étaient de : 11,20 mm pour *Lc.l7* et 10,10 mm pour *Lc.l6*. Pour *H. pylori*, le diamètre d'inhibition enregistré par la souche *Lc.l7* est de 13,10 mm.

L'inhibition de *C. perfringens* a montré des diamètres de : 13,40 mm par *Lc.l7* et 12,50 mm par *Lc.l6* (figure 43).

Pour la souche *S. aureus* (1), nous avons enregistré les diamètres suivants : 12,30 mm par *Lc.l7* et 12,10 mm par *Lc.l6*. Pour *S. aureus* (2) le diamètre de la zone d'inhibition est de 26,10 mm après interaction avec *Lc.l7*.



Figure 43 : Pouvoir antibactérien des souches lactiques en cultures pures vis-à-vis de *C. perfringens* après traitement par la pepsine

L'altération de l'activité antibactérienne des substances inhibitrices suggère que ces composés sont soit de nature protéique ou contiendraient des groupements protéiques responsables de l'activité antibactérienne.

Il est bien établi à présent que toutes les bactériocines sont de nature protéique, ou du moins contiennent un peptide qui est responsable de leur fonction bactéricide (Coventry *et al.*, 1997 ; Lima *et al.*, 2002 et Savadogo *et al.*, 2006).

Seulement leur sensibilité aux enzymes protéolytiques est variable. La lactococcine est inactivée par l' α -chymotrypsine, la ficine, la pronase et la protéinase K; par contre l' α -amylase et la trypsine n'affectent pas son activité (Piard *et al.*, 1993 et Rincé *et al.*, 1994).

La nisine est inactivée par l' α -chymotrypsine, la pancréatine et la subtilopeptidase alors qu'elle n'est pas inactivée par la pepsine, trypsine et la carboxypeptidase (Steen *et al.*, 1991).

Les travaux de Kojic *et al.* (1991) montrent que la bactériocine 550 produite par *L. lactis ssp.lactis 550*, est sensible à la pepsine, trypsine, α -chymotrypsine, pronase E et la protéinase K.

La diplococcine est sensible à l' α -chymotrypsine, la pronase et la trypsine mais elle résiste à l'action de la pepsine (Davey et Richardson, 1981).

Gomez *et al.* (1997), trouvent que la bactériocine like est sensible à l'action de la plupart des enzymes testées (protéases, α -chymotrypsine, trypsine, pronase E, papaïne) seul 40 % de son activité a été récupérée après traitement à la pepsine.

Conclusion

Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité de produire lors de leur croissance des composés actifs à savoir les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et des substances naturelles de nature protéique douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes pathogènes.

21 souches de *Lactococcus lactis* ont fait l'objet de cette étude, 13 souches de *Lactococcus lactis sub.sp.lactis*, 4 souches de *Lactococcus lactis sub.sp. cremoris* et 4 souches de *Lactococcus lactis sub.sp lactis biovar diacetylactis*.

Dans une première partie de notre expérimentation, la viabilité de *Lactococcus lactis* a été suivie en fonction du temps et à différents pH (2,5 ; 4,5 et 6,5), en absence et en présence de 0.3 % de sels biliaries.

Les résultats trouvés permettent de déduire que les neuf souches *Lc.l7*, *Lc.l12*, *Lc.l6*, *Lc.l13*, *Lc.l9*, *Lc.d1*, *Lc.d2*, *Lc.c1* et *Lc.c3* résistent et se développent presque normalement à des pH moyennement bas (4,5) ou neutre (6,5) et à une concentration élevée de sels biliaries (0.3%).

Cette première sélection a permis d'étudier l'effet des associations de ces meilleures souches sur la croissance dans les mêmes conditions précédentes. Il semble que les associations *L7D1C1*, *L7D2C1*, *L7D2C3*, *L9D1C1*, *L9D2C1*, *L9D2C3*, *L12D1C3*, *L6D1C3*, *L6D1C1*, *L12D2C3*, *L6D2C3* et *L13D2C3* résistent au pH bas et à la forte concentration en sels biliaries. Ce qui confirme l'effet de symbiose entre les souches de *Lactococcus lactis*.

Dans une deuxième partie, l'étude de l'évolution du pH et de l'acidité Dornic a montré que les souches pures et les associations sélectionnées possèdent un pouvoir acidifiant élevé. Les valeurs de l'acidité Dornic des cultures pures sont comprises entre 80 et 98°D et celles des cultures mixtes entre 87 et 105°D après 96 heures d'incubation à 30 °C.

Dans une troisième partie, l'activité antimicrobienne des cultures pures et mixtes sélectionnées a été étudiée à l'égard de 7 espèces pathogènes: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* (1)

Staphylococcus aureus (2) et *Helicobacter pylori*. L'isolement de ces bactéries pathogènes a été confirmé par l'identification bactériologique et biochimique.

Une deuxième sélection des souches lactiques est effectuée sur la base de l'activité inhibitrice vis-à-vis des germes pathogènes. Les effets inhibiteurs ont été constatés avec toutes les souches pathogènes. Les meilleures zones d'inhibition ont été trouvées avec les cultures pures: *Lc.l7*, *Lc.l12*, *Lc.l6*, *Lc.l13*, *Lc.l9*, et les cultures mixtes: *L7D1C1*, *L7D2C1*, *L7D2C3*, *L9D1C1*, *L9D2C1*, *L9D2C3*, *L12D1C3*, *L6D1C3*, et *L6D1C1*

D'après les résultats trouvés nous pouvons déduire que les bactéries pathogènes Gram positif sont plus sensibles à l'effet des souches lactiques. Les souches lactiques testées possèdent un effet bactéricide, pour les bactéries pathogènes étudiées, à l'exception de *Lc.l6*, *Lc.l13* et *Lc.l9*, qui ont un effet bactériostatique vis-à-vis d'*H. pylori*.

L'étude des dénombrements des souches pathogènes après interaction a montré que le nombre de celles-ci a diminué, cela est dû à l'effet inhibiteur des bactéries lactiques.

La nature de la substance inhibitrice a été confirmée par l'étude du pouvoir antibactérien des surnageants et des culots des cultures lactiques retenues. L'activité inhibitrice des souches lactiques se retrouve exclusivement dans le milieu de culture. Il y'a donc formation de substances extracellulaires. Ces dernières diffèrent des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène.

Après traitements thermiques à 100 °C pendant 15 et 30 minutes, l'apparition de zone d'inhibition importantes suggère que les molécules inhibitrices sont thermostables.

Le traitement par les enzymes protéolytiques a montré que toutes ces substances sont sensibles à la pronase, la trypsine et l' α -chymotrypsine. Les substances produites par les souches *Lc.l7* et *Lc.l6* ne sont pas dégradées par la pepsine. Nous pouvons déduire que ces substances sont de nature protéique, et il s'agit donc de bactériocines.

Les résultats trouvés montrent qu'il est possible d'utiliser ces souches locales comme probiotiques pour la prévention de maladie gastro-intestinales.

En perspectives il serait intéressant de :

- Réaliser une étude du pouvoir antibactérien des souches lactiques *in vivo*.
- Faire une purification et une caractérisation physico-chimique et biochimique des substances inhibitrices de ces souches.
- Localiser les déterminants génétiques responsables de la production de ces substances.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AATTOURI N. et LEMONIER D. (1997).** Production of interferon induced by *Streptococcus thermophilus* : rôle of CD₄⁺ and lymphocytes. J. Nutr. Biochim, 8 : 25-31.
- AÏCHOUBA M. H. (2007).** Contribution à l'étude de l'effet inhibiteur des bactériocines de *Lactococcus lactis* locales sur quelques souches lactiques pathogènes et d'altération. Mémoire d'Ingénieur. Faculté des sciences agronomiques et biologiques, UHB. Chlef. : 25-51.
- ALAIS C. (1984).** Science du lait, principes des techniques laitières. Edition SEPAIC IV, P : 814P.
- ALLOUCHE F.N (2003).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. Thèse de Magister, INA, EL Harrach , Alger : 45-56.
- AMMOR S., TAUVERON G., DUFOUR E. et CHEVALLIER I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food control 17: 454-461.
- AMROUCHE L. (2003).** Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par Streptocoques lactiques mésophiles (lactocoques) isolés localement. Thèse de Magister, INA-El Harrach, Alger: 58-91.
- AVRIL J. L., DABERNAT H., DENIS F. et MONTAIL H. (2000).** *Helicobacter pylori* Bacteriol. Clin. 30 : 406 – 410.
- BAREFOOT S. F. et KLAENHAMMER T. R. (1983).** Detection and activity of Lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*-Appl. Environ. Microbiol., 45 (6), 1808 – 1815.
- BEERENS H. et LUQUET F. M. (1987).** Guide pratique d'analyse microbiologique des laits et produits laitiers. Ed. Lavoisier, Paris, 144 : 107-108.
- BELIARD E. et THUAULT D. (1989).** Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. In : Microbiologie alimentaire. Ed. : Lavoisier : 282-293.
- BERGERON M. et DUFOUR J. C. (2004).** Protagonistes de l'immunité innée dans les infections à *salmonella*. Médecine Sciences, 31 : 12P.
- BESSEKRI M. et ZIDANE F. (2004).** Essai d'isolement de souches de *Lactococcus lactis* à partir du lait de vache, de chèvre et de brebis et leur caractérisation phénotypiques

Références bibliographiques

et technologiques. Mémoire d'ingénieur. Faculté des sciences agronomiques et biologiques. Uni. Chlef : 42P.

- BIAVATI B., VESCOVO M., TORRIANI S. et BOTTAZI V. (2000).** Bifidobacteria : history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50 : 117-131.
- BIELECKA M., BIEDREZYLIK E., SLORAGIEWIC Z. et SMIESZEK M. (1998).** Interaction of Bifidobacterium and Salmonella during associated growth. *Int. J. Food. Microbiol.*, 45 : 151-155.
- BIGARD M. A. (2004).** L'ulcère gastroduodéal associé à l'*Helicobacter pylori*. *Rev. de Formation Médicale Continue*, n°29, 24 : 6 – 9.
- BIOMERIEUX S.A. (2006).** Système d'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux (API 20 E)
- BIWAS S.R., JOHNSON M.C. et RAY B.(1991).** Influence of growth conditions on the production of bacteriocin, Pediocin Ach by *Pediococcus acidilactic*. *H. Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 1265-1267.
- BJORKSTEN B. (2004).** Effect of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer seminras in immunopathology* 25 : 257 – 270
- BLEICHNER G., BLEHAUT H., MENTEC H. et MOYSE D. (1997).** *Saccharomyces boufardii* prevents diarrhea in critically ill tube-Fed patients. A multicenter, randomized, double-blind placebo controlled trial. *Intensive care. Med.*, 23 : 17 – 23.
- BOUFFENARA S.N. et BOUNAB F., (1995)** Mise en évidence de la production de bactériocines par certaines souches de bactéries lactiques locales. Mémoire d'Ingénieur d'Etat, INA ,El Harrach, Alger.
- BOULEY C. (1993).** Effets du lait fermenté contenant du Bifidobacterium sur le temps de transit colique *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 17A : 127.
- BOURGEOIS C.M. et LARPENT J.P. (1989).** Microbiologie alimentaire Vol. 2. Ed. Tec et Doc.Lavoisier, , Paris : 343 – 408.
- BOURGEOIS C. M., MESCLE J. F. et ZUCCA J., (1996).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Vol(1), 174P.
- BOURLIOUX P., (1998).** Composition et rôles de la flore intestinale. *Revue Nutrition* N°41.

- BRADLY R. L., ANOLD E. et BARBANO D. M. (1992).** Chemical and physical methods. In : Standard methods for the examinations of dairy products, Ed. Marshall: 433-531.
- BRAEGGER C. (2002).** Le rôle des probiotiques dans la prévention et le traitement de la Gastro-entérite aiguë chez l'enfant. Vol. 13, 55 : 29-33.
- CASLA D., REQUENA T. et GOMEZ R. (1996).** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus carvatus* IFPL 105. J. Appl. Bacteriol, 81: 1, 35 – 41.
- CASSEL-BERAUD A. M., PEGHINI M. MOUDEN J. C. et RAJAONARISON P. (1996).** Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* à Tananarive, Madagascar. Bactériologie n° 1441, 4P.
- CHINACHOTI N., MATSUSAKI H., SONOMOTO K. et ISHIKAZI A. (1997).** Utilization of xylose as an alternative carbon source for nisin Z production by *Lactococcus lactis* 10 – 1. J. Fac. Agric. Kyushu. Univ. 42 : 171 – 181.
- CHOISY C. (1987).** Les levains lactiques et les bactéries lactiques. In : Le Fromage. Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris : 108-115.
- CHUNG H. T., MONTEVILLE J. J. et CHIKINDAS M. L. (2000).** Nisin depletes ATP and proton motive force in mycobacteria. Lett. Appl. Microbiol, 31 , 6: 416 – 420.
- CORBIER C., KIER I., MULLIERT G., VITOUX B. et REVOL-JUNELLES A. M. (2001).** Biological activities and structural properties of the atypical bacteriocins mesenterocin 52B and Leucocin B-TA33a. Appl. Environ. Microbiol. 67 : 4 -10.
- COVENTRY M. J., GORDON J. B., WILCOCK A., HARMARK K., DAVIDSON B. E., HICKEY M. W., HILLIER A. J. et WAN J. (1997).** Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. J. Appl. Microbiol. 83 : 248-258.
- DABA H., LACROIX C., HUANG J. et SIMARD R. (1993).** Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. Appl. Microbiol. Biotech. 39 : 166 – 173.
- DAVEY G. P. ET RICHARDSON B. C. (1981).** Purification and some properties of diplococin from *Streptococcus cremoris* 346. Appl. Environ. Microbiol. 41 : 46-54.
- DE ROISSART H. B. (1986).** Bactéries lactiques. In : Lait et produits laitiers (Vache-chèvre-brebis). Vol. 3 . Ed. Tec. et Doc. Lavoisier et Apria, Paris : 343-386.

- DE VUYST L. et VANDAMME E. J. (1993).** Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis subsp lactis* batch fermentation using a complex medium. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 40 : 17 – 22.
- DE VUYST L. (1994).** Nisin production variability between natural *Lactococcus lactis Subsp lactis* strains. *Biotechnol. Lett.* 16 : 287 – 292.
- DE VUYST L. (1995).** Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis subsp lactis* NIZO 22 186 in a synthetic medium. *J. Appl. Bacteriol.* 78 :28-33.
- DE VUYST L., (2004).** Découverte de nouveaux composés contre les bactéries nocives. Proeuhealth-Propath [http:// proeuhealth.vtt.fi](http://proeuhealth.vtt.fi)
- DELLAGLIO F.(1994)** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques. Vol1. Ed. Loriga lavoisier, Paris: 1 – 37.
- DESMAZEAUD M. J. (1990).** Le lait milieu de culture. *Microbiologie aliments Nutrition*, 8 (4) : 313-325.
- DILMI BOURAS A. (1991).** Assimilation du cholestérol par les bactéries lactiques. Thèse de Magister, INA El Harrach, Alger. 149 P.
- DILMI BOURAS A. (2002).** Survie de *streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* et leur action sur le métabolisme du cholestérol. Thèse de Doctorat. INA El Harrach, Alger. 99 P.
- DILMI BOURAS A. et SADOON D., (2002).** Effet du yaourt à *streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* et leur action sur le cholestérol sanguin chez le lapin. *Rev. Medecine et nutrition*, 38 (1) : 24 – 32.
- DILMI BOURAS A. (2006).** Assimilation (*invitro*) of cholesterol by yogurt bacteria. *Ann. Afric. Environ. Med.*, 13 : 49 – 53.
- DILMI BOURAS A., KOICHE M. et TABTI M. (2007).** The effect of *Lactobacillus paracasei* on the rabbit's cholesterolemia. *African Journal of biotechnology.* vol.6 (24) : 2840-2845.
- DOUGHERTY B. A., HILL C., WEIDMAN J. F., RICHARDSON D. R., VENTER J. C. et ROSS R. P. (1998).** Sequence and analysis of the 60 Kb conjugative, bacteriocin-producing plasmid PMRCO1 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Mol. Microbiol.* 29 : 1029-1038.
- DWARAKANATH A. D., TSAI H. H., HART C. A. et RHODES J. M. (1994).** Sialidase production by *Helicobacter pylori*. It's possible rôle in pathogenesis. *Digestive. Week. Aga* (abstract 2521).

- EL-HAMZAOUI-AMARA S., CHANI M., DIKOUMBA A., AZOUADELLY E., MBOUMBA L. C., HAZOUME N., MOSSOUNDA J., BAAJ A. J. et NEJMI S. (2000).** Analyses bactériologiques des selles. *Revue Biologie-Infectiologie*-Tome VI (2) : 21-33 .
- EUZEBY J. P. (2000).** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, Ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris :26-30.
- FAUCHER J. L. (1999).** Caractères bactériologiques et diagnostic de *Helicobacter pylori*. *La Borama Rev. D'information médicale*, 35 : 4 – 8.
- FELLEY C. et MICHETTI P. (2003).** Probiotics and *Helicobacter pylori* : Best Pract Resclin Gastroenterol, 17 : 785 – 791.
- FENNERTY M. B. (1994).** *Helicobacter pylori*. *JAMA*, Vol. 19 n° 295 : 27-35.
- FERREIRA M. A. S. S. ET LUND B. M., (1996)** The effect of misin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long life cottage cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 22 6: 433-438.
- FLISS I., LA POINTE G. et VUILLEMARD J. C. (2001).** Réseau de recherche sur les bactéries lactiques, Ed Tec. et Doc. Lavoisier, Paris :72-90.
- FUJIWARA S., HASHIBA S., HIROTA T. ET FORSTNER J. F. (1997).** Pertinacious factors in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *E. coli* to ganglioside L ceramide. *Appl. Environ. Microbiol*, 77 : 412 – 420.
- FULLER R. (1991).** Probiotics in human medicine. *Gut*, 32 : 439 – 442.
- GIBSON G. R. et WANG X. (1994).** Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 77 (4) : 412-420.
- GIBSON G. R. et ROBERFROID M. B. (1995).** Dietary modulation of the human colonic microbiota : Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr*, 125 : 1401 – 1412.
- GLEDEL J. (1988).** Les Salmonelles. In : *Microbiologie alimentaire*. Vol. 1. Ed : Lavoisier, Paris : 51 – 53.
- GOLDIN B. R. et GORBACHE S. L. (1992).** Probiotics for humans in : Fuller R., Ed. *Probiotics, the scientific basis*. London : Chapman and Hall: 76-355.
- GOMEZ S., COSSON C. et DESCHAMPS A. M. (1997).** Evidence for a bacteriocin like substance produced by a new strain of *Streptococcus sp.* Inhibitory to gram positive food-borne pathogens, *Research Microbiol.* 108: 7757-766.

- GOSSELINK M. P., SCHOUTEN W. R., VAN LIE SHOUT L. M., HOP W. C., LAMAN J. D. et RUSELER-VAN EMBDENJ G. (2004).** Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Diseases of Colon and Rectum*, 47 : 876 – 884.
- GOURNIER –CHATEAU N., LARPENT J. P., CASTILLANOS M. I. et LARPENT J. L. (1994).** Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Ed. : Lavoisier, Paris: 1 – 192.
- GUECHI Z. (2002).** Microbiologie des viandes et des produits carnés. Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments. Institut Pasteur d'Algérie.
- GUETARNI H. (2006).** Etude de l'effet des bactéries lactiques sur l'inhibition des bactéries impliquées dans la physiopathologie digestive *in vitro*. Thèse de Magister, Uni. Hassiba Ben Bouali-Chlef: 45-72.
- GUIRAUD J. P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris: 54-571
- HAO W. L. et LEE Y. K. (2004).** Microflora of the gastrointestinal tract : a review. *Methods in Molecular Biology*, 268 : 491 – 502.
- HERRANZ C., CHENY Y., CHUNG H. J., CINTAS L. M. HERNANDEZ P. E., MONTVILLE T. J. et CHIKINDAS M. L. (2001).** Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 , 4 : 1689 – 1692.
- HOLZAPFEL W. H., HABERER P., SNEL J., SCHILLINGER U. et HUISVELD J. H. J. (2001).** Overview of gutflora and probiotics. *International Journal of food Microbiology*, 41 : 85-101.
- HOPKINS M. J., SHARP R. ET MACFARLANE G. T., (2002).** Variation in human intestinal microbiota with age digestive and liver discases, 34 : 12 – 18
- HURST A. (1981).** Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* 27: 85-123.
- IBRAHIM S. A. et BEZKOROVAINY A. (1993).** Inhibition of *E. coli* by Bifidobacteria. *J. food protein*, 56 : 713-715.
- JACK R. W., TAGG R.J. et RAY B. (1995).** Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 2 : 171-200.
- JIANG T., MUSTAPHA A. et SAVAIANO D. A. (1996).** Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy sciences*, 79 : 750 – 757.

- JIMENEZ DIAZ R., RUIZ-BARBA J. L., CATHCART D. P., HOLO H., NES I. F., SLETTEN K. H. et WARNER P. J. (1995).** Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 4459 – 4463.
- JOLY B. ET ALAIN R. (2003).** Genre *shigella* in Entérobactéries systématique et méthodes de diagnostic. Ed : médical international cedex, Lavoisier, Paris. 3 : 53 – 62.
- JONES D., (1978).** Composition and differentiation of the genus streptococcus. In : Streptococci. Ed. Academic press, London : 1 – 49.
- KATLA T., MORETRO T., AASEN I. M., HOLCH A., AXELSSON L. et NATERSTARD K., (2001).** Inhibition of listeria monocytogens in cold smoked salmon by addition of satanic P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiol* 18, 4 : 431 – 439.
- KIM W. S., (1997).** Nisin production by *Lactobacillus Lactis* using two phase batch culture. *Lett.Appl.Microbiol.* 25,3: 169-171.
- KLAENHAMMER T. R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiol. Rev.* 12 : 39 – 86
- KLAENHAMMER T. R. (1998).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70 : 337-349.
- KOJIC M., SVIRCEVIC J., BANINA A. et TOPISIROVIC L. (1991).** Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis sub sp.diacetylactis* 550. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 1835-1837.
- KONINGS W. N. (1994).** Mécanismes de transport des nutriments dans les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques Vol. 1 : Ed. Loriga Lavoisier, Paris, 198-218.
- KORWIN J. D. (2004).** Infection à *Helicobacter pylori* et résistance aux antibiotiques. *Medecine interne,* 25 : 54-64.
- LABIOUI H., ELMOUALDI L., EL YACHIOUI M. et OUHSSINE M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux,* 144 : 237-250.
- LACHANCE M. (2000).** Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lactococcus lactis ssp. Lactis MJC15*. Thèse de grade de maître des sciences (MSC).
- LAMOULIATTE H., MEGRAUD F. ET CAYLA R. (1992).** *Helicobacter pylori* et pathologies gastroduodénales. *Encyclopédie médicochirurgical,* 9021 : 1 – 11.

Références bibliographiques

- LARPENT J. P. (1989).** Les bactéries lactiques. In : Microbiologie alimentaire Vol. 2: Ed. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris : 3-13.
- LARPENT J. P. (1996).** Activité antibactérienne due à la production d'inhibiteurs à large spectre d'action. In : Microbiologie alimentaire. Edition Tec. et Doc., Lavoisier, Tome 2 : 437-447.
- LE LOIR Y., NOUAILLE S., RIBEIRO L., COMMISSAIRE J., L'HARIDON R., GRUSS A. et LANGELLA P. (2001).** Sécrétion de protéines d'intérêt thérapeutique chez *Lactococcus lactis*. Lait, 81 : 217 – 226.
- LECLERC H., GAILLARD J. L. et SIMONET M. (1995).** Microbiologie générale : La bactérie et le monde bactérien. Ed : Doin. Paris : 535 P.
- LIEVIN V., PEIFFER I., HUDAULT S., ROCHAR F., NEESER J. R. et SERVINA A. (2000).** Bifidobacterium strains from resident in infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. Gut, 47 : 646 – 652.
- LIMA F. L., FARIAS F. F., COSTA J. E. AUXIADORA M. R., ALVIANO C. S. et FARIAS L. M. (2002).** Bacteriocin production by *Actinobacillus actinomyces* isolated from oral cavity humans with periodontal disease periodontal healthy subjects and marmosets. Res. Microbiol. 153, 1 : 45-52.
- LINDGREN S. E. et DOBROGOSZ W. J. (1990).** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. FEMS Microbiol. Rev., 87 : 149 – 163.
- LINK-AMSTER H., ROCHAT F., SAUDAN K. Y., MIGNOT O. et AESCHLIMANN J. M. (1994).** Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. FEMS. Immunol. Med. Microbiol, 10 : 55-64.
- LOONES A. (1994).** Les laits fermentés par les bactéries lactiques. Bactéries lactiques, coord. Lorica édition, 2 : 135 – 154.
- LUCAS S. et REYROLLE J. (1989).** Etude d'un lot de ferments lactiques mésophiles. Equilibre de flores au cours de la première étape de la fabrication du levain. Rev. Le lait, 69 (2) : 121-130.
- MAMECHE-DOUMANDJI A. (2008).** Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées localement. Thèse de Doctorat, Université de Blida: 44-85.
- MARSHALL V. M. (1982).** Flavour compounds in fermented milks. Perfumer and flavorist, 7 (2) : 27-34.

- MARCHAL N., BOURDON J. L. et RICHARD Cl. (1987).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. DOIN-Paris : 483P.
- MARTEAU P., FLOURIE B., POCHART P., CHASTANG C., DESJEUX J. F. et RAMBAUD J. C. (1990).** Effet of the microbial lactase (Ec 3 - 2 - 1 - 23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an *in vivo* study in lactase - deficient humans. Br. J. Nutr, 64 : 71 - 79.
- MARTEAU P., POCHART P., BOUHNİK Y. et RAMBEAUD J. C. (1993).** The fate and effects of transiting, non pathogenic microorganisms in the human intestine. In Word review of nutrition and dietetics. Intestinal flora, immunity, nutrition and health, ed. AP. Simopoulos T coring and A Rérat. Paris , Karger : 1 - 21.
- MATSUMOTO M. ET BENNO Y. (2004).** Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM 512 yogourt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. Mutation Research, 568 : 147 - 153.
- MATSUSAKI H. N., ENDO N., SONOMOTO K. et ISHIZAKI I. (1996).** Lantibiotic nisin -Z fermentive production by *Lactococcus lactis* 10.1- relationship between production of the lantibiotic and Lactate and all-growth. Appl. Microbiol. Biotecnol. 45 : 36-40.
- MATSUZAKI T., YAMAZAKI R., HASHIMOTO S. et YOKOKARA T., (1998).** Effect of oral feeding of *lactobacillus casei* Strains shirota on immunoglobulin E production in mice J. Dairy su : 81 : 48 - 53.
- MEGRAUD F. (1994).** *Helictobacter pylori*. Manuel de bacterial. Clin N°3: 1311-1324.
- MEGRAUD F., FRANCIS, BROUET et NATHALIE. (2000).** Epidémiologie acquisition et transmission d' Helicobacter pylori. Rev. Du Praticien, 50 : 1414-1417.
- MISRA A. K. et KULIA R. K. (1995).** Antimicrobial substances from *bifidobacterium bifidum*. Indian. J. Sci, 48 : 612-614.
- MODLER H. W., MC KELLAR R. C. et YAGUCHI M., (1990).** Bifidobacteria and bifidogenic factors. Can. Inst. Food. Sci. Technol., J, 23 : 29 - 41.
- MONTEIRO L. (1995).** *Helicobacter pylori*. Facteurs payhogènes bactériens. Hépatogastroenterol, suppl. In°2 pp : 30-227.
- MONTVILLE T. J., CHUNG H. J., CHIKINDAS M. L. et CHEN Y., (1999).** Nisin A depletes intracellular ATP and acts in bactericidal manner against *mycobacterium smegmatis*. Lett. Appl. Microbiol. 28: 189 - 193.
- MOREAU M. C., (2005).** Bactéries lactiques probiotiques et immunité in « Bactéries lactiques et probiotiques ». Ed. Tec. & Doc. Lavoisier, 211 - 253.

- MORISSET D., BERJEAUD J. M., FRERE J. et HECHARD Y. (2005).** Bacteriocines de bactéries lactiques in « Bactéries lactiques et Probiotiques ». Ed. Tec et Doc. Lavoisier p 113 – 194.
- MULDERS J. W. M., BOERRIGIER I. J., ROLLEMA H. S., SIEZEN R. J. et DE YOS W. M. (1991).** Identification and characterization of a lantibiotic nisin Z, a naturel nisin variant. *Eur. J. Biochem.* 201 : 581-584.
- NADER DE MACIAS M.E., ROMERO N., APELLA M.C., GONZALEZ S.N et OLIVIER G.(1993).** Prevention of infections produced by *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by feeding milk fermented with *Lactobacilli*. *J. Food prot.*, 56: 401-405.
- NAHAÏSI M. H. (1986).** *Lactobacillus acidophilus* : Therapeutic properties, products and enumeration. In : Developments in food microbiology. 2 Appl. Sci : 6 : 153-178.
- NAIDU A. S. , BIDLACK W. R. et CLEMENS R. A., (1999).** Probiotic spectra of lactic acid bacteria (L. A. B.). *Crit. Rev. Food Sci., Nutr.*, 38.1: 13 – 126.
- NAKAJIMA K., HATA Y., OSMO Y., HAMURA M. et NAKAJIMA I., (1995).** Antrihypertensive effect of extract of *Lactobacillus paracasei* in patients with hipertensión *J. Clin. Biochem. Nutr.* 18 : 181 - 187
- NICOLI A. M. et PENAUD A., (1985).** Elements de microbiologie relationnelle. La vie. Interrelations des êtres vivants. MEDSI.
- NILSON L., CHEN Y., CHIKINDAS M. L., HUSS H. H., GRAM L. ET MONTVILLE T. j. (2005).** Cardon dioxide and nisin act synergistically on *listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2: 769 – 774.
- NISSEN-MEYER J., HAUGE H. H., FIMLAND G., EIJSINK V. G. H. et NES I. F. (1997).** Ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria : their function, structure, biogenesis and their mechanism of action. *Recent. Res. Devel. Microbiol.* 1 : 141-154.
- OUWEHAND A. C. et VESTERLUND S. (2003).** Health aspects of probiotics. *Drugs*, 6 : 573 – 580.
- OZBAS Z. Y. et AYTAC S. A. (1995).** Behaviour of yersinia enterocolitica and Aeromonas hydrophila in yogurt with probiotic bacteria : Bifidobacterium infantis and Lactobacillus acidophilus. *Milchmissens chaft*, 50 : 626 – 629.
- PARKER R. B. (1974).** Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health*, 29 : 4-8.

- PEREIRA D. I. et GIBSON G. R. (2002).** Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*, 37 (4) : 81-259.
- PERNOUD S., SCHNEID-CITRAIN N., AGNETTI V., BRETON S., FAURIE J. M., MARCHAL L., OBIS D., OUDOT E., PAQUET D. et ROBINSON T. (2005).** Application des bactéries lactiques dans les produits laitiers frais et effets probiotiques. in « Bactéries lactiques et Probiotiques » Ed. Tec. et Doc. Lavoisier : 3-12.
- PIARD J. C., DELORME F., GIRAFFA G., COMMISSAIRE J. ET DESMAZEUD M. (1990).** Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. *Neth. Milk dairy J.* 44 : 143 – 158.
- PIARD J. C. ET DESMAZEUD M. (1992).** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2-Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.* 72 : 113-142.
- PIARD J., MURIANA P., DESMAZEUD M. ET KLAENHAMMER T. (1992).** Purification and partial characterization of lacticin 481, a bacteriocine produced by *lactococcus lactis sub sp. lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 58 : 279 – 284.
- PIARD J. C., KUIPERS O. P., ROLLEUR H. S., DESMAZEUD M. J. et DEVOS W. M. (1993).** Structure, organisation and expression of the Ict gene for lacticin 481, a novel lantibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *J. boil.Chem.* 268 : 16361-16368.
- PRASAD J., GILL H., SMART J., GOPAL B. K. (1999).** Selection and charachterization of *Lactobacillus* and *bifidobacterium* strains use as probiotics. *INT. Dairy. J.*, 8 : 993-1002.
- PREMI et BOTTAZI V. (1972).** Hydrogen peroxide formation and hydrogen peroxid splitting activity in lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*, 27 : 265-267.
produced by a new strain of *Streptococcus* sp. inhibitory to Gram positive food-borne pathogens. *Research. Microbiol.* 148: 757-766.
- REGNAULT J. P. (2002).** Infections gastro-intestinales et intra-abdominales in élément de microbiologie et d'immunologie. Decarie éditeur inc et Dumbar bureau, Montréal (Québec).

- REYNOLDS D., TRANTER M. S. et HAMBLETO P., (1986).** Scaled up production and purification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. J. Appl. Bact., 60 : 517 – 525.
- RICHARD J., (1996).** Utilisation de bactériocines pour la production des aliments plus sûrs : Mythe ou réalité ? Lait. 76: 179 – 189.
- RINCE A., DUFOUR A., LE POGAM S., THUAULT D., BOURGEOIS C. M. ET LE PENNEC J. P. (1994).** Cloning expression and nucleotide sequence of genes involved in production of Lactococcin DR, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 1652 – 1657.
- RINCE A., DUFOUR A., UGUEN P., LE PENNEC J.P et HARAS D. (1997).** Characterization of the lactinin 481 operon : the *Lactococcus lactis* genes *LctF*, *LctE* et *LctG* encode a putative ABC transporter involved in bacteriocin immunity. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 4252-4260.
- ROUSSEAU N. (2004).** Ealth and food, Oct/Nov 67 : Diarrhées infectieuses: Les probiotiques font leur trou : 1 – 6.
- RYAN M. P., REA M. C., HILL C. et ROSS R. P. (1996).** An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 612 – 619.
- SAADI F. (2006).** Effet de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* extrêmophiles sur le taux de cholestérol. Mémoire de Magister, Uni. Hassiba Benbouali-Chlef : 65 . 88 .
- SAAVEDRA J. M., BAUMAN N. A. et OUNG I. (1994).** Feeding of *bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. Lancet, 344 : 1046 – 1049.
- SAHI T., (1994).** Hypolactasia and lactase persistence, scand. J. Gastroenterol, 29: 1 – 6.
- SALMINEN S. et SALMINEN E. (1997).** Lactulose, lactic, acid bacteria, intestinal microbiology and mucosal protection. Scandinavian Journal of gastroenterology, 222 : 34-42.
- SANDERS M. E. (2000).** Considérations for use probiotic bacteria to modulate human health. J. Nutr. 130 : 384 – 390.
- SANDINE (1988).** The streptococci : Milk products. In bacterial starter cultures for foods. Ed. CRC press, Boca Raton, Florida: 2 – 23.
- SAVADOGO A., QUATTARA CHEIK A. T., BASSOLE IMAEL H. N. ET TRAORE S. A. (2004).** Antimicrobial activites of Lactic acid Bacteria strain isolated from Burkina Faso fermented milk. Pakistan Journal of Nutrition (3): 174 – 179.

- SAVADOGO A., QUATTARA CHEIK A. T., BASSOLE IMAEL H. N. ET TRAORE S. A. (2006).** Bacteriocins and lactic acid Bacteria. African Journal of biotechnology. vol.5 (9): 678 – 683.
- SCHLEIFER K. H., KRAUS J., DVORAK C., KILPPER-BALZ R., COLLINS M. D. ET FISCHER W. (1985).** Transfert of streptococcus lactis and related streptococci to the genus lactococcus. Gen. Nov. system. Appl. Microbiol, 6: 83 – 195
- SCHVED F., LALZAR A., LINDNER P. et JUVEN B. J. (1994).** Interaction of the bacteriocin produced by *pediococcus acidilactici* SJ1 with the cell envelope of *Lactobacillus spp.* Cett. Appl. Microbiol. 19 : 281-283.
- SEVIN E., SOUSSY C. J. et TANKOVIC J. (1998).** *Helicobacter pylori* en 1998. Feuille de biologie, Vol XIX, 224P.
- SINGLETON (1984).** Abrégés de bactériologie. Ed. Masson, Paris : 353 – 364.
- SKOULOUBRIS, STEPHANE, HILDE, REUSEO, LABIGNE, AGNES (2000).** Bactériologie et pathogénéicité d'*Helicobacter pylori*. Rev. De praticien, 50 : 1409-1413.
- SOBHANI I., VALLOT T. et MIGNON M. (1995).** *Helicobacter pylori* , une bactérie redécouverte son implication dans les maladies gastroduodénales. Presse Médicale n°2, 24 : 67-79.
- SOBHANI I., DOSPAI, MIGNON M. et FLEJOU F.(2000).** *Helicobacter pylori*. Epidémiologie, mécanismes d'altération de la muqueuse gastrique et diagnostic. Gastroentérol. Bactériol., 55 : 301-308.
- STANTON C., GARDINER G., MEEHAN H., COLLINS K., FITZGERALD G., LYNCH P. B. et ROSS R. P. (2001).** Market potential for probiotics. American Journal of Clinical nutrition, 73 : 476-483.
- STEEN M. T., CHUNG Y. J. ET HANSEN J. N. (1991).** Characterization of the nisin gene as part of a polycitronic operon in the chromosome of *Lactococcus lactis* ATCC 11454. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1181-1188.
- STEER T. (2000).** Effect of selected lactic acid bacteria on Growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. Nutrition research reviews, 13 : 229 – 254.
- SUTRA L., FEDERIGHI M. et JOUVE J. L. (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. Ed. : Polytechnica, Paris, 306 (6) : 31-249.

Références bibliographiques

- TABIB F. (2006).** Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne de *Lactococcus lactis sub sp lactis* contre des souches de bactéries lactiques de *Salmonella typhi* et d'*Escherichia coli*. Mémoire d'Ingénieur, Uni. Hassiba Benbouali-Chlef, 54-69
- TAGG J. R., DAJANI A. S. ET WANNAMAKER L. W. (1976).** Bacteriocines of Gram positif bacteria. *Bacteriol.Rev.*40,3: 722-756.
- TAGLANG G. (2005)** .Cours de physiologie de l'appareil digestif. [http:// frank paillard chez tixali fr / in firmier digestif](http://frank.paillard.chez.tixali.fr/infirmier/digestif).
- TERZAGHI B. E. ET SANDINE W. E. (1975).** Improved media for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 29 : 807 – 813.
- THOMAS T. D., TURNER K. W. et CROW V. L. (1980).** Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*: pathways, product and regulation *J. bacteriol*, 144 : 672 – 682.
- THOMAS L. V. ET WIMPENNY Z. T., (1996).** Investigation of the effect of combined variation in temperature and Nacl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 6 : 2006 – 2012.
- THOMSON J. (1985).** Intracellular phosphorylation of glucose analogs via the phosphoenolpyruvate : Mannose phosphotransferase system in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol*, 162 : 224-234.
- THOMSON J. K., COLLINS M. A. et MERLER W. D. (1996).** Characterization of proteïnaecours antimicrobiol produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ 450. *J. Appl. Bacteriol.* 80, 4 : 338-348.
- THUAULT D. et QIMPER A. (1997).** Interactions microbiennes : si leur maîtrise n'était conté. *Food-Techno.* 17: 18 – 19.
- TORTORA G. J. et GRABOWSKI S. R., (2001).** Principes d'anatomie et de physiologie. Ed. Deboeck : 867 – 970.
- TORTORA G. J., FUNKE B. R. et CASE C. L., (2003).** Introduction à la microbiologie. Ed. ERPI : 756 – 819.
- VAN BELKUM M. J., HAYEMA B. J., GEIS A., KOK J. et VENEMA G. (1992).** Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol*, 55 : 1187 – 1191;
- VAN DEPUTTE M. (2004).** Le monde invisible. Guide nutrition et alimentation santé.

- VAN Niel C. W., FEUDTNER C., GARRISON M. N. et CHARISTAKIS D. A. (2002).** Lactobacillus therapy for acute infections diarrhoea in children : a meta analysis. Pediatrics, 109 : 678 – 684.
- VANBELKUM M. J., HAYEMA B. J., JEENINGA R. E., KOK J. et VENEMA G. (1991).** Organization and nucleotide sequences of two Lactococcal bacteriocin operons. Appl. Environ. Microbiol 57 : 492-498.
- VAUGHAN E. E., DALY C. Et FITZGERALD G. F.(1992).** Identification and characterization of helveticin V. 1829. J. Appl. Bacteriol. 73, 4 : 299-308.
- VENEMA K., DOST M. H. R., BEUN P. A. H., HAANDRIKMAN A. J., VENEMA G. et KOK J. (1997).** The genes for secretion and maturation of lactococcins are located on the chromosome of *Lactococcus lactis* IL 1403. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1689 – 1692.
- VINOD KUMAR J., SOMESH S. et NEERJA S. R. (2006).** Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolates of natural lactic acid fermentation of vegetables. Food Technol. Biotechnol. 44 (3) : 435-439.
- WAN J., HIKEY M. W. et COVENTRY M. J. (1995).** Continuous production of bacteriocins, brevecin, misin and pediocin, using calcium alginate. Immobilized bacteria. J. Appl. Bacteriol. 79: 671-676.
- YANG R. et RAY B. (1994).** Factors influencing producing of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food. Microbiol. 11 : 281-291.
- YILDIRIM Z. et JOHNSON M. G. (1998).** Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* R isolated from radish. Cett. Appl. Microbiol. 26 : 297-304.

ANNEXE I : Milieux de cultures

Tableau 1: Composition du milieu M17 agar (Terzaghi et Sandine, 1975).

Composition	g/l
Tryptone	02.50
Peptone pepsique de viande	02.50
Peptone papainique de soja	05.00
B-Glycérophosphate de sodium	19.00
Lactose	05.00
Extrait de levure	02.50
Extrait de viande	05.00
Sulfate de magnésium	00.25
Acide Ascorbique	00.50
Agar-agar	14.00

Pour la préparation

- Dissoudre les ingrédients dans 950 ml de l'eau distillée ;
- Porter à ébullition
- Ajuster le pH à 7,1 - 7,2
- Stériliser à 120°C pendant 20 minutes

Le milieu M17 bouillon est de même composition et même préparation que M17-agar mais sans addition d'agar.

Tableau 2: Composition du milieu BGT. (Guiraud, 2003).

Composition	g/l
Peptone	20.00
Extrait de viande	02.00
Chlorure de sodium	02.50
Phosphate monopotassique	00.70
Phosphate di-sodique	08.30
Glucose	04.00

pH 7.7

Tableau 3: Composition du milieu gélose chocolat (Marchal et *al.*, 1987).

Composition	g/l
Polypeptone	15.00
Amidon	01.00
Phosphate dipotassique	04.00
Phosphate monopotassique	01.00
Chlorure de sodium	05.00
Hémoglobuline	10.00
Agar – agar	10.00

ANNEXES

Mettre le milieu de base à fondre dans le bain marie bouillant, incorporer le sang dans le milieu en surfusion, mesurer les volumes soit par pipette graduée stérile, soit à la pipette pasteur, compter environ 25 à 30 gouttes, remettre le flacon au bain marie à 75 – 80°C pendant 10 minutes. pH final est 7,2.

ANNEXE II : Réactifs et disques

- ◆ Disque d'ONPG : pour la mise en évidence de la β -galactosidase.
- ◆ H₂O₂ volume 10: pour la recherche de la présence de catalase.
- ◆ Réactifs de Kowacs pour la détection de la présence d'indole.
- ◆ Disque OX (Oxydase) : pour la mise en évidence du cytochrome oxydase.

ANNEXE III : Techniques d'identifications

1/ Coloration de Gram (Singleton., 1999).

Mode opératoire

- ◆ Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de gentiane ;
- ◆ il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante ;
- ◆ traité pendant une minute par la solution de lugol ;
- ◆ le frottis est de nouveau, rincé rapidement.
- ◆ Après le traitement avec l'éthanol (95 °), la lame est maintenue inclinée : On fait couler le solvant sur le frottis pendant une à trois secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis ;
- ◆ Rincer à l'eau courante ;
- ◆ Faites une contre coloration de 30 secondes à la Fuschine basique diluée ;
- ◆ Rincer brièvement et sécher le frottis au buvard ;
- ◆ Examiner à l'objectif à immersion (grossissement X 1000) ;
 - Les cellules à Gram positif sont en violet.
 - Les cellules à Gram négatif sont roses.

2/ Principe de la galerie API 20 E (ref.20.100.BioMérieux).

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratées. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique.

ANNEXES

ANNEXE IV: Tableaux des résultats

Tableau 1: Evolution de la croissance des cultures pures à pH 6,5 en absence de sels biliars.

Temps Souche	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.d1</i>	9,31± 0,10	9,36 ± 0,50	9,41 ± 0,10	10,13 ± 0,20	10,16 ± 0,50	10,07± 0,10
<i>Lc.l4</i>	8,45 ± 0,20	8,94 ± 0,10	9,74± 0,50	10,28± 0,10	10,97 ± 0,20	10,64 ± 0,50
<i>Lc.c3</i>	9,08 ± 0,10	9,63± 0,20	9,87 ± 0,10	10,62 ± 0,50	10,96 ± 0,20	10,71 ± 0,50
<i>Lc.l13</i>	9,37 ± 0,00	9,45 ± 0,10	9,56± 0,20	10,30 ± 0,20	10,75 ± 0,10	10,75 ± 0,30
<i>Lc.l7</i>	10,34 ± 0,20	10,38 ± 0,10	10,48 ± 0,00	10,55± 0,10	10,68 ± 0,50	10,48 ± 0,00
<i>Lc.c4</i>	8,11 ± 0,00	8,90 ± 0,10	9,89± 0,10	10,16± 0,20	10,65 ± 0,10	10,56± 0,00
<i>Lc.l2</i>	8,25 ± 0,00	8,47± 0,20	8,91 ± 0,20	10,21± 0,30	10,40 ± 0,50	10,28± 0,10
<i>Lc.l8</i>	8,99± 0,10	8,99± 0,20	9,81 ± 0,10	10,17 ± 0,10	10,98 ± 0,30	10,74 ± 0,50
<i>Lc.l1</i>	9,71 ± 0,00	9,78 ± 0,00	9,78 ± 0,20	9,96 ± 0,20	9,99 ± 0,10	9,99 ± 0,10
<i>Lc.l10</i>	7,71 ± 0,10	7,85 ± 0,00	8,92 ± 0,20	10,08± 0,10	10,95± 0,00	10,64 ± 0,10
<i>Lc.l9</i>	9,97 ± 0,00	9,97 ± 0,10	10,00 ± 0,10	10,48 ± 0,20	10,92± 0,10	10,00± 0,4 0
<i>Lc.d2</i>	9,08 ± 0,4 0	9,73 ± 0,10	9,89± 0,00	10,32± 0,30	10,64 ± 0,50	10,43 ± 0,10
<i>Lc.d3</i>	8,28 ± 0,10	8,90 ± 0,4 0	8,95 ± 0,30	9,88 ± 0,10	10,63 ± 0,00	10,00 ± 0,50
<i>Lc.l11</i>	9,04 ± 0,4 0	9,23 ± 0,10	9,33 ± 0,10	10,20± 0,4 0	10,51 ± 0,10	10,28 ± 0,00
<i>Lc.l6</i>	9,43 ± 0,10	9,47 ± 0,00	9,89± 0,30	10,18 ± 0,00	10,79 ± 0,50	10,69 ± 0,10
<i>Lc.l12</i>	9,89 ± 0,00	9,89 ± 0,10	10,00 ± 0,50	10,05 ± 0,00	10,96 ± 0,10	10,66 ± 0,00
<i>Lc.l5</i>	9,59 ± 0,10	9,60 ± 0,00	9,69 ± 0,10	9,82 ± 0,10	9,90 ± 0,50	9,89 ± 0,20
<i>Lc.c1</i>	9,36 ± 0,50	9,42 ± 0,60	9,43 ± 0,10	9,72 ± 0,10	9,89± 0,00	10,00± 0,50
<i>Lc.d4</i>	8,46 ± 0,10	8,60 ± 0,20	8,83 ± 0,10	8,95 ± 0,50	9,78 ± 0,60	9,56 ± 0,10
<i>Lc.c2</i>	8,91 ± 0,2 0	9,00 ± 0,10	9,02 ± 0,50	10,20± 0,4 0	10,90± 0,10	10,53 ± 0,20
<i>Lc.l3</i>	7,63 ± 0,50	7,86 ± 0,50	7,96 ± 0,00	9,72 ± 0,10	9,92 ± 0,4 0	9,79± 0,00

ANNEXES

Tableau 2: Evolution de la croissance des cultures pures à pH 4,5 en absence de sels biliaires.

Temps Souche	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.l9</i>	9,99 ± 0,30	10,00 ± 0,10	7,00 ± 0,10	6,15 ± 0,20	5,89 ± 0,10	4,40± 0,20
<i>Lc.l2</i>	7,89 ± 0,5 0	7,93 ± 0,30	7,32 ± 0,5 0	6,23 ± 0,6 0	5,90 ± 0,2 0	4,56 ± 0,10
<i>Lc.d4</i>	7,08 ± 0,10	7,48± 0,5 0	6,01± 0,30	2,79± 0,4 0	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l5</i>	7,37 ± 0,20	7,81± 0,10	3,02 ± 0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.d1</i>	8,34 ± 0,6 0	8,49± 0,5 0	7,00 ± 0,10	4,06 ± 0,30	3,35± 0,4 0	1,85± 0,20
<i>Lc.l11</i>	7,96 ± 0,10	7,97 ± 0,10	7,02 ± 0,4 0	4,97 ± 0,5 0	3,00 ± 0,10	2,00 ± 0,0 0
<i>Lc.c4</i>	7,89 ± 0,5 0	7,91± 0,20	5,48 ± 0,10	4,95± 0,20	3,74 ± 0,30	2,32 ± 0,20
<i>Lc.d2</i>	7,99 ± 0,10	7,99 ± 0,10	7,03 ± 0,10	2,76± 0,4 0	1,00 ± 0,10	0,30 ± 0,00
<i>Lc.l7</i>	10,70 ± 0,50	10,89 ± 0,00	7,96 ± 0,10	6,60 ± 0,30	4,76± 0,6 0	3,51 ± 0,20
<i>Lc.l10</i>	6,70± 0,10	6,81 ± 0,4 0	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l8</i>	7,93 ± 0,10	7,95 ± 0,30	7,19 ± 0,30	4,54 ± 0,10	4,51 ± 0,10	3,11± 0,00
<i>Lc.l6</i>	9,97 ± 0,10	9,98 ± 0,4 0	5,94 ± 0,5 0	4,81± 0,4 0	3,90 ± 0,5 0	0,00 ±0,00
<i>Lc.c2</i>	7,92± 0,00	7,96± 0,10	6,11± 0,30	4,63± 0,6 0	3,66 ± 0,10	2,30± 0,0 0
<i>Lc.l12</i>	9,98 ± 0,10	9,99 ± 0,6 0	4,95± 0,20	4,48 ± 0,10	4,12 ± 0,6 0	4,00 ± 0,6 0
<i>Lc.c3</i>	8,43 ± 0,6 0	8,61 ± 0,30	6,80 ± 0,10	5,44 ± 0,00	3,41 ± 0,4 0	3,00 ± 0,10
<i>Lc.l13</i>	9,89 ± 0,10	9,92 ± 0,00	7,30 ± 0,30	6,10± 0,10	4,46± 0,30	3,20± 0,20
<i>Lc.l1</i>	7,57 ± 0,30	5,66 ± 0,10	2,32 ± 0,6 0	2,01± 0,6 0	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l4</i>	6,85 ± 0,00	6,60 ± 0,20	2,18 ± 0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.d3</i>	6,69 ± 0,10	6,79± 0,6 0	5,80 ± 0,30	1,60± 0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.c1</i>	8,86 ± 0,6 0	8,87 ± 0,30	5,83± 0,00	5,12 ± 0,10	3,04± 0,6 0	2,07± 0,00
<i>Lc.l3</i>	6,72 ± 0,10	6,73 ± 0,00	2,80 ± 0,00	1,45± 0,30	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00

ANNEXES

Tableau 3: Evolution de la croissance des cultures pures à pH 2,5 en absence de sels biliaries.

Temps Souche	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.l13</i>	8,84 ± 0,20	5 ± 0,00	4,99± 0,10	4,70± 0,20	2,38 ± 0,10	1,95± 0,20
<i>Lc.d1</i>	8,78 ± 0,00	4,74 ± 0,20	4,56 ± 0,30	2,00± 0,00	1,00 ± 0,30	0,00 ±0,00
<i>Lc.c2</i>	7,95 ± 0,10	4,78 ± 0,50	1,95 ± 0,10	1,56 ± 0,50	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.c4</i>	7,84 ± 0,00	4,52 ± 0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l5</i>	7,74 ± 0,30	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l2</i>	8,28 ± 0,10	3,53± 0,20	1,48 ± 0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l11</i>	7,40 ± 0,20	5,67 ± 0,00	4,00 ± 0,50	2,90 ± 0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l1</i>	7,23 ± 0,20	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.c3</i>	8,99 ± 0,00	6,19 ± 0,10	5,20 ± 0,30	4,62± 0,50	1,08 ± 0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l7</i>	8,75 ± 0,30	7,29± 0,50	6,98 ± 0,10	5,60 ± 0,00	4,43 ± 0,50	1,34± 0,30
<i>Lc.d4</i>	6,68± 0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.d2</i>	8,75 ± 0,10	4,30± 0,20	3,08± 0,50	1,48 ± 0,30	1,00 ± 0,20	0,48± 0,50
<i>Lc.l9</i>	7,95 ± 0,30	5,96 ± 0,50	5,08 ± 0,20	2,60 ± 0,30	1,85 ± 0,00	0,95 ± 0,10
<i>Lc.d3</i>	4,74± 0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l10</i>	5,96 ± 0,30	4,48 ± 0,30	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.c1</i>	8,97 ± 0,10	5,36 ± 0,10	3,59 ± 0,10	2,70 ± 0,10	0,90 ± 0,20	0,00 ±0,00
<i>Lc.l8</i>	8,43± 0,30	5,91± 0,20	1,85 ± 0,20	1,00 ± 0,20	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l12</i>	8,28 ± 0,20	7,02 ± 0,30	6,47 ± 0,10	5,00 ± 0,10	2,00 ± 0,20	1,98± 0,30
<i>Lc.l4</i>	6,65 ± 0,10	2,01 ± 0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l6</i>	8,46 ± 0,30	4,85± 0,20	3,95 ± 0,10	3,30 ± 0,10	2,65 ± 0,20	1,74 ± 0,10
<i>Lc.l3</i>	5,48 ± 0,10	3,79± 0,10	0,30± 0,20	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00

ANNEXES

Tableau 4: Evolution de la croissance des cultures pures à pH 2,5 en présence de 0,3 % de sels biliaires.

Temps Souche	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.l1</i>	7,95 ± 0,10	4,95 ± 0,20	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Lc.l12</i>	8,56 ± 0,20	7,49 ± 0,10	6,53 ± 0,50	5,58 ± 0,10	2,90 ± 0,20	2,77 ± 0,10
<i>Lc.d2</i>	8,98 ± 0,10	7,92 ± 0,20	5,48 ± 0,10	2,87 ± 0,20	2,66 ± 0,10	1,95 ± 0,50
<i>Lc.l6</i>	8,65 ± 0,50	7,65 ± 0,20	4,51 ± 0,20	3,90 ± 0,20	2,88 ± 0,20	2,05 ± 0,20
<i>Lc.c3</i>	8,99 ± 0,20	6,83 ± 0,10	5,96 ± 0,50	4,80 ± 0,10	2,01 ± 0,20	1,82 ± 0,10
<i>Lc.l4</i>	7,68 ± 0,10	4,36 ± 0,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Lc.c1</i>	8,98 ± 0,20	7,74 ± 0,10	5,00 ± 0,20	4,08 ± 0,50	3,78 ± 0,20	2,08 ± 0,20
<i>Lc.l13</i>	8,99 ± 0,20	7,43 ± 0,20	6,49 ± 0,20	5,32 ± 0,10	3,00 ± 0,20	2,36 ± 0,20
<i>Lc.l5</i>	7,82 ± 0,20	6,52 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Lc.l2</i>	8,61 ± 0,10	5,00 ± 0,10	2,15 ± 0,10	1,78 ± 0,20	1,15 ± 0,10	0,00 ± 0,00
<i>Lc.c2</i>	7,99 ± 0,20	5,85 ± 0,20	4,40 ± 0,10	2,08 ± 0,20	1,64 ± 0,20	0,48 ± 0,10
<i>Lc.d1</i>	8,80 ± 0,20	7,50 ± 0,20	4,98 ± 0,20	3,74 ± 0,00	2,48 ± 0,40	1,64 ± 0,20
<i>Lc.l7</i>	8,95 ± 0,10	8,30 ± 0,40	7,26 ± 0,20	6,40 ± 0,10	5,51 ± 0,20	3,63 ± 0,40
<i>Lc.d4</i>	7,73 ± 0,20	5,00 ± 0,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Lc.c4</i>	7,90 ± 0,20	6,60 ± 0,10	3,32 ± 0,00	1,08 ± 0,20	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Lc.d3</i>	7,43 ± 0,20	4,94 ± 0,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Lc.l10</i>	6,96 ± 0,10	2,90 ± 0,40	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Lc.l11</i>	8,32 ± 0,20	7,97 ± 0,10	6,61 ± 0,50	3,71 ± 0,10	2,51 ± 0,10	1,66 ± 0,50
<i>Lc.l9</i>	8,78 ± 0,40	7,13 ± 0,20	5,71 ± 0,50	2,84 ± 0,20	2,49 ± 0,10	2,04 ± 0,10
<i>Lc.l8</i>	8,62 ± 0,10	7,60 ± 0,20	4,90 ± 0,10	2,01 ± 0,40	1,36 ± 0,20	0,70 ± 0,10
<i>Lc.l3</i>	6,86 ± 0,40	6,11 ± 0,50	2,37 ± 0,20	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

ANNEXES

Tableau 5: Evolution de la croissance des cultures pures à pH 6,5 en présence de 0,3 % de sels biliaries.

Temps Souche	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.l5</i>	7,54 ± 0,10	7,54 ± 0,00	7,02 ± 0,30	6,79 ± 0,00	6,16 ± 0,10	4,76 ± 0,00
<i>Lc.l4</i>	7,28 ± 0,00	7,66 ± 0,10	7,04 ± 0,30	6,85 ± 0,10	6,49 ± 0,00	5,60 ± 0,60
<i>Lc.c4</i>	8,03 ± 0,10	8,93 ± 0,30	8,95 ± 0,00	7,83 ± 0,10	7,74 ± 0,30	6,03± 0,10
<i>Lc.l7</i>	10,16 ± 0,0	10,16 ± 0,60	10,71 ± 0,10	9,99 ± 0,30	9,60± 0,10	9,25± 0,60
<i>Lc.l11</i>	9,77 ± 0,10	9,78 ± 0,30	9,55 ± 0,00	9,00 ± 0,60	8,54 ± 0,00	6,38 ± 0,00
<i>Lc.c1</i>	9,54± 0,60	9,81 ± 0,10	9,98 ± 0,10	10,77± 0,10	9,92 ± 0,10	8,88 ± 0,60
<i>Lc.l13</i>	8,87 ± 0,10	9,88± 0,60	10,01± 0,40	9,97 ± 0,60	9,57 ± 0,60	9,31± 0,00
<i>Lc.c2</i>	8,64± 0,00	8,79 ± 0,30	9,98 ± 0,00	9,61± 0,10	8,58 ± 0,10	6,15 ± 0,30
<i>Lc.l3</i>	5,48 ± 0,00	6,11 ± 0,10	6,71 ± 0,10	5,86 ± 0,60	5,81 ± 0,10	5,63 ± 0,00
<i>Lc.l6</i>	9,90 ± 0,60	9,91 ± 0,00	9,99 ± 0,00	10,00± 0,10	9,90 ± 0,10	9,87 ± 0,30
<i>Lc.d3</i>	7,24± 0,00	7,27 ± 0,10	7,58 ± 0,10	8,71 ± 0,10	7,85 ± 0,30	7,33 ± 0,60
<i>Lc.l8</i>	9,66 ± 0,10	8,90 ± 0,10	8,95 ± 0,00	8,92± 0,30	8,37 ± 0,10	6,30 ± 0,60
<i>Lc.d4</i>	7,30 ± 0,10	8,26 ± 0,10	8,83 ± 0,30	9,20 ± 0,10	7,99 ± 0,60	5,97 ± 0,00
<i>Lc.l2</i>	8,07 ± 0,00	8,98 ± 0,10	8,98 ± 0,10	8,26 ± 0,30	7,61 ± 0,10	6,11± 0,10
<i>Lc.c3</i>	9,27 ± 0,10	9,75 ± 0,10	9,88 ± 0,10	9,89 ± 0,10	10,71± 0,60	8,83 ± 0,10
<i>Lc.d2</i>	9,89 ± 0,60	9,90 ± 0,00	9,93± 0,10	9,94 ± 0,10	9,58 ± 0,10	9,49± 0,10
<i>Lc.l10</i>	7,08 ± 0,10	7,83± 0,00	7,79 ± 0,00	6,89 ± 0,00	6,31 ± 0,00	5,06 ± 0,10
<i>Lc.l12</i>	9,90 ± 0,10	9,97 ± 0,00	9,98 ± 0,10	9,48± 0,10	9,46 ± 0,10	9,05 ± 0,10
<i>Lc.d1</i>	9,06 ± 0,10	9,07 ± 0,00	9,28 ± 0,10	9,29 ± 0,10	9,23 ± 0,00	9,05± 0,50
<i>Lc.l9</i>	10,19± 0,10	10,21± 0,10	10,98 ± 0,50	9,60 ± 0,50	9,49 ± 0,00	9,08 ± 0,00
<i>Lc.l1</i>	7,99 ± 0,00	7,98 ± 0,20	7,56± 0,50	6,83 ± 0,00	6,52± 0,50	4,38± 0,50

ANNEXES

Tableau 6 : Evolution de la croissance des cultures pures à pH 4,5 en présence de 0,3 % de sels biliaries.

Temps Souche	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.d4</i>	7,59± 0,10	7,64± 0,50	6,30 ± 0,00	2,61± 0,50	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l1</i>	7,65± 0,50	7,67± 0,10	3,72± 0,30	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l4</i>	6,98 ± 0,10	6,85± 0,00	1,48± 0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l13</i>	9,22 ± 0,30	9,81± 0,10	9,55 ± 0,60	7,78± 0,50	7,69± 0,50	7,65± 0,50
<i>Lc.l5</i>	7,65± 0,10	5,60± 0,20	2,54± 0,60	2,00 ± 0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.d1</i>	8,08± 0,00	8,57± 0,30	8,70 ± 0,10	5,00 ± 0,00	3,78 ± 0,50	0,00 ±0,00
<i>Lc.l12</i>	9,99 ±0,20	10,00± 0,10	9,84 ± 0,40	9,58± 0,50	7,94 ± 0,10	7,31 ± 0,60
<i>Lc.c3</i>	8,95± 0,10	8,95 ± 0,20	6,03± 0,00	5,64± 0,40	5,42 ± 0,00	5,30 ±0,00
<i>Lc.l9</i>	10,73±0,20	10,74± 0,60	10,74 ± 0,50	9,30± 0,30	8,15± 0,10	7,50± 0,50
<i>Lc.l7</i>	10,8 ± 0,30	10,89± 0,10	10,89± 0,10	9,71± 0,40	7,84± 0,50	7,53± 0,60
<i>Lc.d3</i>	6,92± 0,10	6,85 ± 0,30	6,35± 0,40	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.c2</i>	7,75± 0,20	7,98± 0,10	6,74± 0,30	5,30 ± 0,40	3,88 ± 0,00	3,54 ± 0,50
<i>Lc.c1</i>	9,00± 0,00	9,51± 0,10	8,81 ± 0,60	7,78± 0,30	7,54± 0,10	6,26 ± 0,10
<i>Lc.l11</i>	8,00± 0,00	8,28 ± 0,30	6,56± 0,40	4,10 ± 0,00	3,11± 0,10	2,52 ± 0,00
<i>Lc.d2</i>	8,03± 0,00	8,30 ± 0,30	6,83± 0,10	3,46± 0,40	2,48 ± 0,00	1,70± 0,10
<i>Lc.l8</i>	7,89± 0,20	7,93± 0,30	6,54± 0,40	4,96± 0,10	4,75 ± 0,10	3,83 ± 0,00
<i>Lc.l2</i>	7,66± 0,10	7,74 ± 0,20	7,49± 0,10	6,32± 0,40	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.l10</i>	6,84± 0,30	6,87± 0,10	4,49± 0,50	2,00 ± 0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>Lc.c4</i>	7,92± 0,10	7,96 ± 0,30	6,85 ± 0,20	4,97 ± 0,00	3,79± 0,50	2,53 ± 0,00
<i>Lc.l6</i>	9,46± 0,30	9,84± 0,50	9,70± 0,10	8,78 ± 0,00	7,88± 0,50	7,85 ± 0,50
<i>Lc.l3</i>	6,73± 0,00	6,75± 0,00	3,40 ± 0,60	1,60 ± 0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00

ANNEXES

Tableau 7 : Evolution de la croissance des cultures pures en fonction du temps (témoin).

Temps Souche	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>Lc.l2</i>	11,13± 0,20	11,53± 0,10	11,53± 0,00	11,60± 0,10	11,87± 0,00	11,12± 0,20
<i>Lc.l13</i>	11,92± 0,00	11,92± 0,10	12,00± 0,00	12,05± 0,20	12,26± 0,10	11,75± 0,50
<i>Lc.l6</i>	11,97± 0,10	11,98± 0,20	12,00± 0,10	12,05± 0,50	12,82± 0,10	10,72± 0,30
<i>Lc.l11</i>	11,40± 0,00	11,47± 0,00	11,48± 0,20	11,55± 0,00	11,70± 0,50	11,15± 0,30
<i>Lc.c1</i>	11,72± 0,10	11,75± 0,20	11,77± 0,10	11,81± 0,50	12,92± 0,30	11,97± 0,10
<i>Lc.l1</i>	11,35± 0,00	11,36± 0,10	11,37± 0,00	11,94± 0,10	12,01± 0,20	9,40± 0,50
<i>Lc.l8</i>	11,20± 0,10	11,71± 0,50	11,95± 0,10	12,67± 0,20	12,87± 0,00	11,86± 0,30
<i>Lc.l10</i>	10,86± 0,00	10,99± 0,30	10,99± 0,20	11,38± 0,00	12,27± 0,50	10,18± 0,00
<i>Lc.c4</i>	11,02± 0,10	11,51± 0,10	11,51± 0,10	11,76± 0,30	11,90± 0,20	11,45± 0,00
<i>Lc.l12</i>	11,96± 0,00	12,00± 0,10	12,34± 0,50	12,75± 0,10	12,84± 0,30	11,98± 0,50
<i>Lc.d3</i>	11,95± 0,50	11,00± 0,40	11,02± 0,30	11,60± 0,10	11,68± 0,10	11,51± 0,10
<i>Lc.l4</i>	10,49± 0,10	10,96± 0,10	11,00± 0,20	11,26± 0,10	11,65± 0,50	11,29± 0,50
<i>Lc.d2</i>	11,64± 0,10	11,65± 0,10	11,70± 0,30	11,76± 0,50	11,81± 0,40	11,77± 0,20
<i>Lc.l9</i>	11,98± 0,10	12,00± 0,00	12,00± 0,10	12,18± 0,40	12,74± 0,20	12,67± 0,00
<i>Lc.c2</i>	11,15± 0,10	11,19± 0,20	11,31± 0,50	11,34± 0,30	12,83± 0,20	11,11± 0,40
<i>Lc.d1</i>	11,69± 0,00	11,85± 0,50	11,96± 0,10	11,99± 0,20	12,12± 0,10	10,64± 0,50
<i>Lc.d4</i>	10,91± 0,10	10,96± 0,10	11,22± 0,50	11,66± 0,20	12,00± 0,30	11,19± 0,20
<i>Lc.l7</i>	12,88± 0,10	12,91± 0,00	12,92± 0,10	12,93± 0,10	12,98± 0,50	11,88± 0,40
<i>Lc.l5</i>	11,03± 0,00	11,08± 0,10	11,40± 0,20	11,42± 0,50	11,83± 0,40	10,26± 0,00
<i>Lc.c3</i>	11,71± 0,10	11,71± 0,50	11,75± 0,10	11,79± 0,30	12,92± 0,20	11,60± 0,20
<i>Lc.l3</i>	10,86± 0,10	10,98± 0,20	10,99± 0,50	11,36± 0,10	11,80± 0,30	10,55± 0,40

ANNEXES

Tableau 8 : Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 2,5 en absence de sels biliaires.

Temps Souche	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>L12D1C3</i>	7,58± 0,20	5,57± 0,10	3,26±0,00	2,04± 0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L6D1C1</i>	7,48±0,00	5,45± 0,20	3,08± 0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L9D2C3</i>	7,72± 0,10	5,65± 0,10	3,58± 0,20	2,11± 0,40	0,70± 0,10	0,00 ±0,00
<i>L9D1C1</i>	7,99± 0,20	6,48± 0,10	3,08± 0,30	1,90± 0,10	1,34± 0,40	0,90± 0,00
<i>L7D2C1</i>	8,91± 0,10	6,85± 0,40	5,72± 0,10	2,30± 0,40	1,65± 0,10	1,28± 0,40
<i>L6D2C3</i>	6,96± 0,10	5,65± 0,50	4,77± 0,20	2,64± 0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L7D1C1</i>	9,94± 0,20	7,00± 0,20	6,85± 0,50	2,53± 0,60	1,78± 0,20	1,38± 0,10
<i>L12D2C1</i>	6,66± 0,50	4,94± 0,10	3,09± 0,50	1,41± 0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L6D1C3</i>	7,40± 0,10	5,11± 0,30	4,04± 0,60	2,91± 0,20	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L7D2C3</i>	8,30± 0,60	6,71± 0,20	5,48± 0,10	1,78± 0,30	1,52± 0,10	1,04± 0,20
<i>L13D2C3</i>	6,88± 0,20	5,45± 0,10	4,56± 0,20	2,48± 0,20	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L6D2C1</i>	6,54± 0,10	5,60± 0,30	4,73± 0,30	1,20± 0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L12D2C3</i>	7,26± 0,50	5,04± 0,20	4,89± 0,20	2,00± 0,60	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L13D1C1</i>	6,34± 0,20	5,52± 0,60	4,72± 0,50	1,00± 0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L12D1C1</i>	6,75± 0,60	5,97± 0,20	2,99± 0,20	1,60± 0,30	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L9D2C1</i>	7,85± 0,20	4,94± 0,20	3,79± 0,30	2,78± 0,20	1,20± 0,20	0,78± 0,10
<i>L7D1C3</i>	6,80± 0,20	5,41± 0,30	3,61± 0,60	1,98± 0,30	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L9D1C3</i>	6,75± 0,10	5,00± 0,20	2,02± 0,10	1,82± 0,20	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L13D2C1</i>	6,18± 0,20	5,64± 0,30	3,51± 0,20	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L13D1C3</i>	6,33± 0,10	5,45± 0,10	3,31± 0,40	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00

ANNEXES

Tableau 9: Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 4,5 en absence de sels biliaires.

Temps Souche	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>L6D2C3</i>	9,91±0,00	8,75±0,10	8,58±0,20	8,48±0,00	7,01±0,10	7,13±0,00
<i>L12D2C1</i>	9,31±0,10	7,97±0,00	7,94±0,00	7,82±0,10	6,58±0,00	5,52±0,10
<i>L6D1C1</i>	9,96±0,10	9,0±0,00	8,64±0,10	8,62±0,20	7,81±0,40	7,63±0,20
<i>L9D2C3</i>	10,17±0,00	9,27±0,20	9,05±0,20	8,81±0,00	7,93±0,20	6,88±0,40
<i>L12D1C1</i>	9,54±0,10	8,06±0,10	7,96±0,10	6,90±0,40	6,74±0,10	6,62±0,20
<i>L9D1C1</i>	10,26±0,20	10,59±0,40	9,32±0,20	8,96±0,10	8,04±0,50	8,00±0,10
<i>L13D2C1</i>	8,90±0,10	7,51±0,20	7,34±0,00	6,60±0,40	6,21±0,00	6,01±0,40
<i>L12D1C3</i>	10,17±0,50	9,03±0,10	8,85±0,40	8,84±0,10	7,83±0,10	7,74±0,20
<i>L9D2C1</i>	10,18±0,10	10,08±0,50	9,86±0,20	8,82±0,20	8,01±0,00	8,00±0,10
<i>L7D1C3</i>	9,73±0,00	8,41±0,10	8,15±0,40	8,07±0,10	7,89±0,20	6,99±0,50
<i>L13D1C1</i>	9,03±0,20	7,84±0,50	7,78±0,10	6,73±0,50	6,46±0,10	6,34±0,20
<i>L13D1C3</i>	9,00±0,50	7,73±0,10	7,37±0,50	6,69±0,00	6,24±0,50	6,04±0,10
<i>L9D1C3</i>	9,70±0,00	8,31±0,20	8,06±0,10	8,01±0,20	7,67±0,10	6,79±0,30
<i>L6D2C1</i>	9,04±0,30	7,94±0,50	7,79±0,30	6,76±0,50	6,49±0,30	6,48±0,20
<i>L12D2C1</i>	9,92±0,10	8,89±0,10	8,61±0,10	8,49±0,50	7,45±0,20	7,23±0,10
<i>L7D2C3</i>	10,39±0,10	9,60±0,30	9,52±0,50	9,52±0,10	8,05±0,10	3,05±0,50
<i>L13D2C3</i>	9,74±0,00	8,51±0,10	8,38±0,50	8,19±0,30	8,00±0,20	7,20±0,30
<i>L7D2C1</i>	10,60±0,30	9,78±0,50	9,53±0,20	9,46±0,10	8,99±0,50	8,79±0,10
<i>L6D1C3</i>	9,93±0,20	9,00±0,10	8,64±0,50	8,58±0,20	7,69±0,10	7,51±0,30
<i>L7D1C1</i>	11,32±0,50	10,97±0,30	9,60±0,20	9,47±0,50	9,21±0,30	7,04±0,50

ANNEXES

Tableau 10: Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 6,5 en absence de sels biliaires.

Temps Souche	0h	3h	6h	24h	48h	72h
L6D2C3	11,00±0,30	11,41±0,10	11,67±0,10	11,77±0,10	11,92±0,10	10,71±0,40
L13D2C1	10,62±0,20	10,85±0,20	10,88±0,30	10,97±0,20	10,98±0,10	9,44±0,50
L13D1C1	10,76±0,20	10,91±0,40	10,98±0,20	10,54±0,30	9,65±0,50	9,83±0,40
L7D1C3	10,95±0,10	10,95±0,50	10,98±0,20	10,89±0,40	10,82±0,30	10,61±0,50
L9D1C3	10,94±0,10	10,95±0,20	10,95±0,40	10,95±0,30	9,97±0,50	9,85±0,10
L6D2C1	10,77±0,10	10,77±0,40	10,83±0,30	10,94±0,10	9,70±0,10	9,67±0,10
L6D1C1	11,60±0,40	11,75±0,30	11,85±0,20	11,86±0,50	10,93±0,50	9,48±0,50
L12D1C3	11,64±0,30	11,68±0,50	11,80±0,40	11,80±0,20	9,78±0,20	9,51±0,10
L12D2C3	11,00±0,10	11,02±0,30	11,67±0,20	12,00±0,10	10,85±0,50	10,76±0,20
L9D1C1	11,82±0,20	11,86±0,40	11,89±0,30	11,99±0,50	9,96±0,40	9,95±0,50
L7D2C3	11,85±0,10	11,86±0,10	11,90±0,40	10,00±0,30	9,96±0,20	9,95±0,20
L12D1C1	10,05±0,10	10,18±0,10	10,26±0,10	10,15±0,10	9,98±0,30	8,97±0,10
L9D2C1	11,74±0,10	11,76±0,50	11,79±0,20	11,97±0,50	11,96±0,10	9,94±0,30
L7D1C1	12,70±0,40	12,89±0,10	12,90±0,10	12,94±0,10	10,98±0,30	10,97±0,50
L13D2C3	10,97±0,20	10,98±0,10	10,99±0,20	11,00±0,30	10,70±0,20	10,63±0,10
L9D2C3	11,67±0,10	11,68±0,50	11,71±0,30	11,96±0,10	10,90±0,10	9,70±0,20
L6D1C3	11,00±0,40	11,15±0,30	11,59±0,50	11,89±0,20	11,99±0,50	10,79±0,10
L13D1C3	10,69±0,10	10,80±0,20	10,90±0,10	9,88±0,10	9,74±0,10	9,54±0,50
L7D2C1	12,65±0,30	12,68±0,10	11,78±0,20	11,45±0,20	10,68±0,50	10,11±0,10
L12D2C1	10,85±0,20	10,89±0,30	10,93±0,10	9,95±0,10	9,85±0,10	9,79±0,20

ANNEXES

Tableau 11: Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 2,5 en présence de 0,3 % de sels biliaries.

Temps Souche	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>L12D2C3</i>	7,83±0,50	6,79±0,10	5,51±0,50	3,40±0,10	1,68±0,10	0,00 ±0,00
<i>L12D1C1</i>	6,80±0,10	5,45±0,10	4,18±0,50	2,01±0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L13D2C3</i>	7,56±0,10	6,47±0,50	5,61±0,50	3,92±0,50	1,30±0,10	0,00 ±0,00
<i>L9D2C3</i>	8,73±0,50	7,73±0,10	6,08±0,10	3,48±0,50	2,08±0,50	1,20±0,50
<i>L7D2C3</i>	8,06±0,10	7,84±0,50	6,98±0,50	5,90±0,50	2,79±0,10	1,69±0,10
<i>L7D2C1</i>	8,93±0,50	7,91±0,50	6,88±0,10	4,51±0,10	4,00±0,10	1,72±0,50
<i>L9D2C1</i>	8,85±0,10	7,80±0,10	6,36±0,50	4,33±0,50	2,27±0,50	1,40±0,10
<i>L13D2C1</i>	6,31±0,50	4,18±0,50	3,59±0,20	1,51±0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L12D2C1</i>	6,73±0,10	4,88±0,50	3,99±0,50	2,68±0,50	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L6D1C1</i>	8,49±0,10	7,41±0,20	6,85±0,60	5,07±0,50	2,89±0,10	1,30±0,50
<i>L9D1C3</i>	6,90±0,20	5,39±0,10	4,53±0,50	3,03±0,20	0,78±0,50	0,00 ±0,00
<i>L6D1C3</i>	8,15±0,50	7,36±0,50	6,65±0,10	5,70±0,10	2,00±0,20	1,04±0,10
<i>L9D1C1</i>	8,85±0,10	5,81±0,10	6,49±0,50	5,83±0,10	2,53±0,50	1,64±0,20
<i>L6D2C3</i>	7,78±0,10	6,96±0,20	5,11±0,10	3,30±0,10	1,56±0,20	0,00 ±0,00
<i>L7D1C1</i>	9,98±0,20	7,95±0,60	5,31±0,20	3,76±0,20	2,78±0,10	1,98±0,60
<i>L12D1C3</i>	8,52±0,60	7,62±0,10	6,06±0,10	3,80±0,10	2,01±0,20	1,28±0,10
<i>L6D2C1</i>	6,64±0,10	4,56±0,10	3,91±0,20	2,20±0,20	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L13D1C3</i>	6,61±0,20	4,36±0,60	3,70±0,10	1,82±0,20	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L13D1C1</i>	6,64±0,10	4,61±0,20	3,80±0,60	1,98±0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L7D1C3</i>	7,08±0,60	6,75±0,10	4,87±0,10	3,86±0,60	1,08±0,30	0,00 ±0,00

ANNEXES

Tableau 12: Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 4,5 en présence de 0,3 % de sels biliars.

Temps Souche	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>L13D1C1</i>	9,06±0,50	9,11±0,10	8,46±0,60	7,49±0,10	7,41±0,60	6,49±0,60
<i>L12D2C1</i>	9,33±0,10	9,59±0,50	7,78±0,10	7,50±0,20	6,61±0,10	6,35±0,10
<i>L6D2C1</i>	9,10±0,20	9,19±0,10	8,46±0,20	8,36±0,60	7,76±0,50	6,51±0,60
<i>L7D2C3</i>	10,63±0,50	10,83±0,20	9,32±0,20	8,35±0,10	8,15±0,20	7,78±0,10
<i>L13D2C1</i>	8,97±0,20	9,97±0,10	8,84±0,50	8,39±0,60	7,12±0,50	6,20±0,10
<i>L13D2C3</i>	9,89±0,10	9,96±0,50	8,74±0,60	8,48±0,20	7,89±0,20	7,49±0,50
<i>L7D1C3</i>	9,76±0,50	9,81±0,20	8,66±0,10	8,09±0,20	7,39±0,60	7,00±0,10
<i>L12D2C3</i>	9,94±0,20	9,97±0,50	8,37±0,60	7,49±0,50	7,31±0,10	7,25±0,20
<i>L9D2C3</i>	10,19±0,10	10,56±0,10	9,95±0,10	9,08±0,60	8,00±0,20	7,18±0,50
<i>L9D2C1</i>	11,29±0,30	11,55±0,60	10,06±0,10	9,16±0,10	9,01±0,10	8,38±0,20
<i>L6D1C3</i>	9,94±0,50	9,97±0,10	8,79±0,10	7,90±0,50	7,61±0,10	6,36±0,20
<i>L7D1C1</i>	11,36±0,10	11,65±0,60	9,56±0,50	9,30±0,20	8,79±0,20	8,71±0,10
<i>L7D2C1</i>	10,68±0,30	10,75±0,20	9,90±0,30	9,48±0,20	9,35±0,50	8,00±0,50
<i>L6D2C3</i>	9,91±0,50	9,98±0,50	8,79±0,20	7,65±0,50	7,51±0,10	6,11±0,10
<i>L9D1C3</i>	9,73±0,30	9,80±0,50	8,85±0,10	8,32±0,30	7,31±0,20	6,99±0,50
<i>L6D1C1</i>	9,96±0,10	9,99±0,10	8,84±0,10	8,30±0,10	7,18±0,60	6,52±0,20
<i>L9D1C1</i>	10,61±0,20	10,72±0,30	9,08±0,20	8,30±0,50	7,13±0,20	6,64±0,30
<i>L12D1C1</i>	9,62±0,50	9,71±0,10	7,81±0,60	7,61±0,20	7,00±0,30	6,56±0,10
<i>L12D1C3</i>	10,18±0,10	10,40±0,20	9,20±0,30	8,61±0,10	7,63±0,60	6,78±0,20
<i>L13D1C1</i>	9,04±0,30	9,85±0,50	7,32±0,10	6,61±0,50	6,34±0,30	6,00±0,10

ANNEXES

Tableau 13: Evolution de la croissance des cultures mixtes à pH 6,5 en présence de 0,3 % de sels biliaries.

Temps Souche	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>L6D2C1</i>	9,63±0,30	9,18±0,10	8,24±0,10	7,49±0,10	6,96±0,30	5,38±0,10
<i>L13D1C1</i>	9,32±0,10	8,90±0,20	8,00±0,10	7,43±0,10	7,20±0,10	0,00 ±0,00
<i>L12D1C1</i>	9,79±0,10	9,41±0,10	8,40±0,20	7,97±0,30	7,20±0,20	5,49±0,30
<i>L13D2C1</i>	8,90±0,30	8,52±0,20	7,84±0,10	7,15±0,10	6,72±0,30	5,48±0,50
<i>L6D1C1</i>	10,32±0,10	9,33±0,10	7,61±0,20	6,80±0,30	5,87±0,20	0,00 ±0,00
<i>L7D2C3</i>	11,18±0,20	10,68±0,30	7,04±0,20	5,56±0,10	3,32±0,30	0,00 ±0,00
<i>L12D2C3</i>	9,94±0,30	9,00±0,00	8,32±0,30	7,78±0,30	6,95±0,20	6,60±0,50
<i>L9D2C1</i>	10,81±0,10	10,51±0,30	9,85±0,10	7,99±0,10	5,00±0,00	3,11±0,10
<i>L7D1C1</i>	11,84±0,20	10,59±0,30	9,91±0,20	8,97±0,30	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
<i>L7D2C1</i>	11,32±0,10	10,70±0,10	8,05±0,10	6,60±0,10	3,40±0,20	1,95±0,10
<i>L9D1C3</i>	9,82±0,20	9,48±0,50	8,49±0,20	7,00±0,10	6,48±0,10	5,85±0,30
<i>L9D2C3</i>	10,68±0,10	10,52±0,20	9,83±0,10	6,98±0,30	5,00±0,10	3,23±0,20
<i>L7D1C3</i>	9,83±0,30	9,79±0,00	9,74±0,30	8,01±0,10	7,90±0,00	5,98±0,30
<i>L6D1C3</i>	9,96±0,00	9,15±0,10	8,48±0,00	7,79±0,20	6,58±0,30	0,00 ±0,00
<i>L6D2C3</i>	9,87±0,10	9,86±0,30	8,94±0,20	8,45±0,30	7,34±0,10	6,61±0,20
<i>L13D2C3</i>	9,86±0,20	9,81±0,20	8,80±0,10	7,23±0,30	6,04±0,00	6,01±0,00
<i>L13D1C3</i>	8,97±0,10	8,72±0,30	7,98±0,50	6,26±0,00	5,58±0,10	0,00 ±0,00
<i>L12D1C3</i>	10,60±0,00	10,48±0,00	8,72±0,20	6,87±0,30	6,67±0,20	0,00 ±0,00
<i>L12D2C1</i>	9,78±0,10	9,57±0,50	9,36±0,30	7,85±0,20	6,15±0,00	5,58±0,30
<i>L9D1C1</i>	10,88±0,30	6,70±0,10	6,49±0,00	5,86±0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00

ANNEXES

Tableau 14 : Evolution de la croissance des cultures mixtes en fonction du temps (témoin).

Temps Souche	0h	3h	6h	24h	48h	72h
<i>L7D1C3</i>	10,83±0,30	10,83±0,10	10,90±0,10	10,99±0,00	11,76±0,10	9,85±0,00
<i>L6D2C1</i>	10,59±0,10	10,75±0,30	10,99±0,30	11,77±0,10	11,92±0,00	9,73±0,10
<i>L6D1C3</i>	11,26±0,10	11,61±0,50	11,81±0,30	11,99±0,30	12,00±0,00	10,68±0,30
<i>L12D2C1</i>	10,68±0,00	10,89±0,10	10,91±0,50	11,57±0,00	11,90±0,30	9,75±0,00
<i>L13D2C1</i>	10,51±0,10	10,81±0,30	10,91±0,10	11,97±0,10	12,00±0,10	9,49±0,30
<i>L6D2C3</i>	10,90±0,00	10,99±0,10	11,00±0,50	11,79±0,00	11,86±0,30	10,67±0,00
<i>L12D1C1</i>	10,71±0,30	10,77±0,00	10,80±0,00	11,89±0,30	11,91±0,50	9,76±0,00
<i>L6D1C1</i>	11,48±0,10	11,81±0,10	11,85±0,30	11,88±0,10	11,96±0,30	10,70±0,10
<i>L9D1C3</i>	10,72±0,00	10,77±0,30	10,94±0,50	10,95±0,10	10,97±0,10	9,92±0,00
<i>L12D2C3</i>	10,99±0,30	11,31±0,10	11,61±0,00	11,84±0,00	11,90±0,50	10,68±0,00
<i>L9D2C1</i>	11,51±0,10	11,81±0,30	11,89±0,10	11,99±0,10	11,99±0,10	10,78±0,10
<i>L9D2C3</i>	11,48±0,10	11,72±0,10	11,96±0,30	11,97±0,50	12,00±0,10	10,72±0,50
<i>L13D1C3</i>	10,58±0,50	10,70±0,50	10,88±0,30	11,95±0,30	11,95±0,00	9,57±0,10
<i>L7D2C1</i>	12,61±0,10	12,68±0,10	12,76±0,50	12,96±0,00	13,00±0,30	10,86±0,10
<i>L7D1C1</i>	12,70±0,10	12,87±0,50	12,95±0,30	12,95±0,30	12,96±0,10	11,85±0,30
<i>L9D1C1</i>	11,86±0,30	11,90±0,10	11,92±0,50	11,99±0,10	11,99±0,30	10,80±0,00
<i>L13D1C1</i>	10,59±0,50	10,72±0,30	10,81±0,10	10,95±0,50	10,95±0,10	9,70±0,50
<i>L13D2C3</i>	10,86±0,00	10,89±0,30	10,95±0,00	10,98±0,10	11,00±0,00	10,48±0,10
<i>L12D1C3</i>	11,30±0,50	11,59±0,10	11,74±0,30	12,77±0,50	12,90±0,30	10,71±0,00
<i>L7D2C3</i>	12,48±0,30	12,76±0,10	12,78±0,00	12,88±0,10	12,95±0,30	10,80±0,10

N.B. Chaque valeur représente la moyenne ± l'écart à la moyenne de trois déterminations.

ANNEXES

Tableau 15: Evolution de l'acidité Dornic des souches lactiques à 30 °C suivant le temps.

Souches \ Temps	Temps						
	0h	3h	6h	24h	48h	72h	96h
Lc.c3	14	16	21	41	50	62	86
Lc.l6	14	16	20	32	58	60	88
Lc.L9	15	17	20	50	63	71	90
Lc.L12	15	17	19	37	40	52	89
Lc.L13	16	19	21	44	55	63	85
Lc.c1	15	19	20	38	53	60	80
Lc.D1	14	17	25	40	43	60	85
Lc.l7	16	19	22	41	70	83	98
LCD2	16	19	20	37	50	57	83
L12D1C3	15	18	20	38	55	70	89
L9D2C1	16	19	22	36	62	74	96
L6D1C3	14	18	19	37	60	73	90
L12D1C3	14	18	20	43	58	70	93
L6D2C3	17	19	21	39	53	62	89
L7D2C3	17	20	23	43	76	97	99
L9D1C1	17	19	21	44	57	79	98
L6D1C1	17	19	20	35	45	87	93
L13D2C3	17	20	22	36	46	70	87
L9D2C3	17	19	21	43	45	57	95
L7D2C1	17	19	22	48	65	85	102
L7D1C1	17	19	21	56	68	97	105

Tableau 16: Evolution du pH des souches lactiques à 30 °C suivant le temps.

Souches \ Temps	Temps						
	0h	3h	6h	24h	48h	72h	96h
Lc.c3	6.75	6.68	6.4	5.53	5.41	5.23	4.87
Lc.l6	6.69	6.66	6.33	5.89	5.28	5.25	4.21
Lc.L9	6.66	6.65	6.29	5.15	4.54	4.33	4.08
Lc.L12	6.67	6.62	6.3	5.57	4.47	5.3	4.11
Lc.L13	6.72	6.66	6.52	5.49	5.24	5.1	4.39
Lc.c1	6.75	6.64	6.29	5.9	5.58	5.02	4.56
Lc.D1	6.79	6.72	6.49	5.62	5.02	4.98	4.86
Lc.l7	6.62	6.59	6.2	5.32	4.94	4.5	4.03
LCD2	6.8	6.66	6.28	5.4	5.1	5	4.98
L12D1C3	6.75	6.7	6.67	5.43	5.4	5.27	4.77
L9D2C1	6.71	6.68	6.59	5.28	5.2	5.15	4.5
L6D1C3	6.75	6.72	6.65	5.65	5.29	5.18	4.6
L12D1C3	6.73	6.69	6.64	5.56	5.29	5.11	4.55
L6D2C3	6.75	6.72	6.7	5.7	5.28	5.13	4.88
L7D2C3	6.7	6.66	6.6	5.69	5.35	4.33	4.32
L9D1C1	6.7	6.55	6.52	5.46	5.29	5.2	4.35
L6D1C1	6.73	6.69	6.64	6.09	5.45	5.22	5.18
L13D2C3	6.76	6.7	6.59	5.78	5.42	4.93	4.9
L9D2C3	6.71	6.58	6.52	5.47	5.19	5.12	4.53
L7D2C1	6.69	6.55	6.5	5.42	5.15	4.98	4.29
L7D1C1	6.65	6.54	6.51	5.44	5.02	4.33	4.25

ANNEXES

Tableau 17: dénombrement des souches lactiques après interaction avec *E.coli*.

Souches Lactiques	Nombre de cellules / ml	Nombre de bactéries pathogènes (cellules/ml)
<i>L_c.l₇</i>	$6,32 \times 10^{12}$	$2,00 \times 10^7$
<i>L_c.l₁₂</i>	$3,55 \times 10^{11}$	$3,2 \times 10^7$
<i>L_c.l₆</i>	$7,10 \times 10^{11}$	$1,10 \times 10^7$
<i>L_c.l₁₃</i>	$4,66 \times 10^{11}$	$7,20 \times 10^5$
<i>L_c.L₉</i>	$7,40 \times 10^{11}$	$3,45 \times 10^6$
<i>L_c.d₁</i>	$6,33 \times 10^{10}$	$8,10 \times 10^7$
<i>L_c.d₂</i>	$2,23 \times 10^{10}$	$5,10 \times 10^7$
<i>L_c.c₁</i>	$2,10 \times 10^{11}$	10^8
<i>L_c.c₃</i>	$4,33 \times 10^{11}$	$2,30 \times 10^7$
<i>L₉D₁C₁</i>	$8,90 \times 10^{11}$	$1,09 \times 10^6$
<i>L₉D₂C₃</i>	$5,44 \times 10^{11}$	$8,31 \times 10^5$
<i>L₁₃D₂C₃</i>	$3,10 \times 10^{10}$	$6,10 \times 10^7$
<i>L₆D₂C₃</i>	10^{10}	$1,12 \times 10^7$
<i>L₁₂D₂C₃</i>	$5,20 \times 10^9$	$1,08 \times 10^7$
<i>L₇D₁C₁</i>	$4,66 \times 10^{12}$	$4,35 \times 10^6$
<i>L₇D₂C₃</i>	10^{12}	$3,28 \times 10^5$
<i>L₉D₂C₁</i>	$2,10 \times 10^{11}$	$6,08 \times 10^7$
<i>L₁₂D₁C₃</i>	$5,30 \times 10^{10}$	10^7
<i>L₇D₂C₁</i>	$3,10 \times 10^{11}$	$1,13 \times 10^5$
<i>L₆D₁C₁</i>	$8,7 \times 10^{10}$	5×10^6
<i>L₆D₁C₃</i>	$3,25 \times 10^{11}$	$9,80 \times 10^4$

ANNEXES

Tableau 18: dénombrement des souches lactiques après interaction avec *C. freundii*.

Souches Lactiques	Nombre de cellules / ml	Nombre de bactéries pathogènes (cellules/ml)
<i>Lc.l7</i>	$5,20 \times 10^{12}$	$3,04 \times 10^5$
<i>Lc.l12</i>	$2,40 \times 10^{11}$	$5,66 \times 10^5$
<i>Lc.l6</i>	$7,20 \times 10^{11}$	$4,11 \times 10^6$
<i>Lc.l13</i>	$2,40 \times 10^{11}$	$3,08 \times 10^5$
<i>Lc.l9</i>	$5,33 \times 10^{11}$	$4,44 \times 10^5$
<i>Lc.d1</i>	$1,08 \times 10^{11}$	$1,11 \times 10^7$
<i>Lc.d2</i>	$8,10 \times 10^{10}$	$9,78 \times 10^6$
<i>Lc.c1</i>	$7,34 \times 10^{10}$	$9,65 \times 10^6$
<i>Lc.c3</i>	$6,20 \times 10^{10}$	$8,10 \times 10^6$
<i>L9D2C3</i>	$8,55 \times 10^9$	$8,22 \times 10^6$
<i>L9D2C3</i>	$5,20 \times 10^{10}$	$6,09 \times 10^5$
<i>L13D2C3</i>	$2,11 \times 10^{10}$	10^5
<i>L6D2C3</i>	$3,08 \times 10^{10}$	$4,19 \times 10^5$
<i>L12D2C3</i>	$5,10 \times 10^{10}$	$5,67 \times 10^4$
<i>L7D1C1</i>	$1,07 \times 10^{12}$	$3,09 \times 10^5$
<i>L7D2C3</i>	$9,60 \times 10^{11}$	10^4
<i>L9D2C1</i>	$7,08 \times 10^{10}$	$4,48 \times 10^4$
<i>L12D1C3</i>	$5,00 \times 10^{10}$	$7,10 \times 10^6$
<i>L7D2C1</i>	$1,10 \times 10^{12}$	$8,41 \times 10^5$
<i>L6D1C1</i>	$9,77 \times 10^{10}$	$7,08 \times 10^6$
<i>L6D1C3</i>	$8,10 \times 10^{10}$	$7,20 \times 10^5$

Tableau 19: dénombrement des souches lactiques après interaction avec *S. typhi*.

Souches Lactiques	Nombre de cellules / ml	Nombre de bactéries pathogènes (cellules/ml)
<i>Lc.l7</i>	$1,09 \times 10^{12}$	10^2
<i>Lc.l12</i>	$7,10 \times 10^{11}$	$1,52 \times 10^3$
<i>Lc.l6</i>	$5,00 \times 10^{11}$	$4,56 \times 10^3$
<i>Lc.l13</i>	$2,20 \times 10^{11}$	$2,02 \times 10^3$
<i>Lc.l9</i>	$8,77 \times 10^{10}$	10^4
<i>Lc.d1</i>	$2,30 \times 10^9$	$1,11 \times 10^4$
<i>Lc.d2</i>	$4,11 \times 10^{10}$	$1,52 \times 10^4$
<i>Lc.c1</i>	$5,77 \times 10^{10}$	$9,90 \times 10^3$
<i>Lc.c3</i>	$3,30 \times 10^{10}$	$7,41 \times 10^3$
<i>L9D2C3</i>	$4,10 \times 10^{11}$	$6,08 \times 10^3$
<i>L9D2C3</i>	$9,8 \times 10^{10}$	99
<i>L13D2C3</i>	$6,11 \times 10^{10}$	$1,39 \times 10^4$
<i>L6D2C3</i>	$1,08 \times 10^{10}$	$1,52 \times 10^4$
<i>L12D2C3</i>	$6,87 \times 10^9$	10^2
<i>L7D1C1</i>	$7,18 \times 10^{11}$	$3,03 \times 10^2$
<i>L7D2C3</i>	$1,31 \times 10^{12}$	$2,10 \times 10^3$
<i>L9D2C1</i>	$5,60 \times 10^{10}$	$9,80 \times 10^2$
<i>L12D1C3</i>	$3,00 \times 10^{10}$	$1,09 \times 10^4$
<i>L7D2C1</i>	$1,13 \times 10^{12}$	$5,60 \times 10^3$
<i>L6D1C1</i>	$7,05 \times 10^{10}$	$7,20 \times 10^3$
<i>L6D1C3</i>	$2,20 \times 10^{10}$	$6,45 \times 10^2$

ANNEXES

Tableau 20: dénombrement des souches lactiques après interaction avec *H. pylori*.

Souches Lactiques	Nombre de cellules / ml	Nombre de bactéries pathogènes (cellules/ml)
<i>Lc.l7</i>	$5,22 \times 10^{12}$	$5,20 \times 10^8$
<i>Lc.l12</i>	$6,09 \times 10^{11}$	$2,60 \times 10^6$
<i>Lc.l6</i>	$7,87 \times 10^{11}$	$8,70 \times 10^7$
<i>Lc.l13</i>	$7,20 \times 10^{11}$	$2,34 \times 10^8$
<i>Lc.l9</i>	$6,52 \times 10^{11}$	$5,60 \times 10^7$
<i>Lc.d1</i>	$5,09 \times 10^{10}$	$6,39 \times 10^9$
<i>Lc.d2</i>	$9,00 \times 10^{10}$	$5,44 \times 10^9$
<i>Lc.c1</i>	$1,03 \times 10^{11}$	$3,38 \times 10^9$
<i>Lc.c3</i>	$3,75 \times 10^{11}$	$7,63 \times 10^8$
<i>L9D2C3</i>	$6,90 \times 10^{11}$	$4,45 \times 10^6$
<i>L9D2C3</i>	10^{11}	$1,11 \times 10^6$
<i>L13D2C3</i>	$2,50 \times 10^{10}$	$3,80 \times 10^9$
<i>L6D2C3</i>	$5,33 \times 10^{10}$	$3,35 \times 10^8$
<i>L12D2C3</i>	$8,66 \times 10^{10}$	$7,23 \times 10^8$
<i>L7D1C1</i>	$2,10 \times 10^{12}$	$4,75 \times 10^7$
<i>L7D2C3</i>	$2,50 \times 10^{12}$	$5,70 \times 10^7$
<i>L9D2C1</i>	$2,09 \times 10^{11}$	$3,90 \times 10^9$
<i>L12D1C3</i>	10^{11}	$4,33 \times 10^6$
<i>L7D2C1</i>	$5,33 \times 10^{11}$	$6,70 \times 10^6$
<i>L6D1C1</i>	$1,18 \times 10^{11}$	$9,80 \times 10^7$
<i>L6D1C3</i>	$7,98 \times 10^{10}$	$7,40 \times 10^8$

Tableau 21: dénombrement des souches lactiques après interaction avec *C. perfringens*.

Souches Lactiques	Nombre de cellules / ml	Nombre de bactéries pathogènes (cellules/ml)
<i>Lc.l7</i>	$3,44 \times 10^{12}$	$3,20 \times 10^5$
<i>Lc.l12</i>	$2,30 \times 10^{11}$	$8,70 \times 10^4$
<i>Lc.l6</i>	$5,60 \times 10^{11}$	$2,33 \times 10^5$
<i>Lc.l13</i>	$7,28 \times 10^{11}$	$4,04 \times 10^5$
<i>Lc.l9</i>	$8,11 \times 10^{11}$	$3,99 \times 10^5$
<i>Lc.d1</i>	$3,09 \times 10^{10}$	$7,00 \times 10^5$
<i>Lc.d2</i>	$2,50 \times 10^{11}$	$6,90 \times 10^5$
<i>Lc.c1</i>	$3,10 \times 10^{11}$	$2,40 \times 10^5$
<i>Lc.c3</i>	$9,05 \times 10^{11}$	$1,00 \times 10^5$
<i>L9D2C3</i>	$3,10 \times 10^{11}$	$2,09 \times 10^4$
<i>L9D2C3</i>	10^{11}	$3,33 \times 10^4$
<i>L13D2C3</i>	$5,10 \times 10^{10}$	$7,01 \times 10^5$
<i>L6D2C3</i>	$7,90 \times 10^{10}$	$5,30 \times 10^5$
<i>L12D2C3</i>	$9,52 \times 10^{10}$	$1,90 \times 10^5$
<i>L7D1C1</i>	$1,08 \times 10^{12}$	$4,20 \times 10^5$
<i>L7D2C3</i>	$9,90 \times 10^{11}$	$9,80 \times 10^4$
<i>L9D2C1</i>	$1,33 \times 10^{11}$	$3,30 \times 10^4$
<i>L12D1C3</i>	$9,50 \times 10^{10}$	$4,07 \times 10^4$
<i>L7D2C1</i>	$3,11 \times 10^{12}$	$9,50 \times 10^3$
<i>L6D1C1</i>	$2,55 \times 10^{10}$	$4,50 \times 10^5$
<i>L6D1C3</i>	$7,80 \times 10^{10}$	$3,10 \times 10^4$

ANNEXES

Tableau 22: dénombrement des souches lactiques après interaction avec *S.aureus* (1).

Souches Lactiques	Nombre de cellules / ml	Nombre de bactéries pathogènes (cellules/ml)
<i>Lc.l7</i>	6,30x10 ¹²	3,20x10 ⁵
<i>Lc.l12</i>	7,52x10 ¹¹	9,10x10 ⁴
<i>Lc.l6</i>	8,20x10 ¹¹	7,63x10 ⁴
<i>Lc.l13</i>	6,22x10 ¹¹	6,40x10 ⁴
<i>Lc.l9</i>	8,02x10 ¹¹	3,20x10 ⁵
<i>Lc.d1</i>	2,50x10 ¹¹	6,00x10 ⁵
<i>Lc.d2</i>	9,80x10 ¹⁰	4,01x10 ⁵
<i>Lc.c1</i>	4,30x10 ¹¹	2,30x10 ⁴
<i>Lc.c3</i>	2,13x10 ¹¹	10 ⁵
<i>L9D2C3</i>	6,52x10 ¹¹	3,63x10 ³
<i>L9D2C3</i>	7,90x10 ¹⁰	2,00x10 ⁵
<i>L13D2C3</i>	3,20x10 ¹⁰	1,16x10 ⁵
<i>L6D2C3</i>	2,60x10 ¹⁰	6,30x10 ⁴
<i>L12D2C3</i>	2,60x10 ¹⁰	4,09x10 ⁵
<i>L7D1C1</i>	3,10x10 ¹²	5,10x10 ⁴
<i>L7D2C3</i>	9,70x10 ¹¹	9,30x10 ⁴
<i>L9D2C1</i>	2,22x10 ¹¹	8,70x10 ⁴
<i>L12D1C3</i>	9,80x10 ¹⁰	3,11x10 ⁴
<i>L7D2C1</i>	7,79x10 ¹¹	4,10x10 ⁴
<i>L6D1C1</i>	2,10x10 ¹¹	2,90x10 ⁵
<i>L6D1C3</i>	9,10x10 ¹⁰	4,70x10 ⁵

Tableau 23: dénombrement des souches lactiques après interaction avec *S. aureus* (2).

Souches Lactiques	Nombre de cellules / ml	Nombre de bactéries pathogènes (cellules/ml)
<i>Lc.l7</i>	4,02x10 ¹²	1,15x10 ⁶
<i>Lc.l12</i>	7,16x10 ¹¹	2,5x10 ⁶
<i>Lc.l6</i>	5,42x10 ¹¹	5,2x10 ⁶
<i>Lc.l13</i>	2,04x10 ¹¹	4,32x10 ⁵
<i>Lc.l9</i>	5,71x10 ¹¹	2,75x10 ⁵
<i>Lc.d1</i>	5,32x10 ¹⁰	10 ⁶
<i>Lc.d2</i>	2,1x10 ¹⁰	3,04x10 ⁶
<i>Lc.c1</i>	9,10x10 ⁹	9,81x10 ⁵
<i>Lc.c3</i>	3,35x10 ¹⁰	4,30x10 ⁶
<i>L9D2C3</i>	3,05x10 ¹¹	6,08x10 ⁶
<i>L9D2C3</i>	1,11x10 ¹¹	4,33x10 ⁵
<i>L13D2C3</i>	10 ¹⁰	6,23x10 ⁶
<i>L6D2C3</i>	4,05x10 ¹⁰	2,3x10 ⁴
<i>L12D2C3</i>	3x10 ¹⁰	7,0x10 ⁶
<i>L7D1C1</i>	9,1x10 ¹¹	1,09x10 ⁵
<i>L7D2C3</i>	10 ¹²	3,1x10 ⁴
<i>L9D2C1</i>	8,46x10 ¹⁰	6,63x10 ⁶
<i>L12D1C3</i>	10 ¹¹	7,3x10 ⁵
<i>L7D2C1</i>	2,08x10 ¹²	4,43x10 ⁴
<i>L6D1C1</i>	9,5x10 ¹⁰	3,06x10 ⁵
<i>L6D1C3</i>	8,7x10 ¹⁰	5,71x10 ⁶

ANNEXES

Tableau 24: Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après traitement thermique de 100 °C/30 mn.

S. Pathogène / S. lactique	<i>E. coli</i>	<i>C.freundii</i>	<i>S. typhi</i>	<i>H.pylori</i>	<i>C.perfringens</i>	<i>S.aureus</i> (1)	<i>S.aureus</i> (2)
<i>L_cL₇</i>	13,10 ±1,00	21,20 ±0,30	0,00 ±0,00	6,00 ±0,00	12,50 ±0,00	16,20 ±0,30	24,10 ±0,50
<i>L_cl₁₂</i>	12,00 ± 0,00	-	-	-	0,00 ±0,00	-	-
<i>L_cl₆</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00 ±0,00	-	16,00 ±0,00	15,00 ±0,20	-
<i>L_cl₉</i>	0,00±0,00	-	-	4,00 ±1,00	0,00 ±0,00	-	0,00 ±0,00
<i>L_cl₁₃</i>	0,00±0,00	-	-	-	0,00 ±0,00	0,00±0,00	-
<i>L₇D₁C₁</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00 ±0,00	22,00 ±1,00	-	0,00 ±0,00	0,00±0,00
<i>L₇D₂C₃</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,00 ±0,00	-	-	0,00±0,00
<i>L₇D₂C₁</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	-	0,00±0,00
<i>L₉D₁C₁</i>	0,00±0,00	-	-	-	-	-	-
<i>L₉D₂C₃</i>	-	-	0,00 ±0,00	-	-	-	-
<i>L₆D₁C₁</i>	-	-	-	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00±0,00
<i>L₆D₁C₃</i>	-	-	-	-	0,00 ±0,00	-	-
<i>L₁₂D₁C₃</i>	-	-	-	-	0,00 ±0,00	-	-
<i>L₉D₂C₁</i>	-	-	-	-	-	0,00 ±0,00	-

Tableau 25: Diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après traitement par la pepsine.

S. Pathogène / S. lactique	<i>E. coli</i>	<i>C.freundii</i>	<i>S. typhi</i>	<i>H. pylori</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>S.aureus</i> (1)	<i>S.aureus</i> (2)
<i>L_cL₇</i>	12,1 ±0,20	12,30 ±1,00	11,20 ±1,00	13,10 ±1,10	13,40 ±0,00	12,30 ±1,00	26,10 ±0,50
<i>L_cl₁₂</i>	0,00±0,00	-	-	-	00±0,00	-	-
<i>L_cl₆</i>	11,2 ±0,50	11,10 ±1,10	10,10 ±0,20	-	12,50 ±0,00	12,10 ±0,50	-
<i>L_cl₉</i>	0,00±0,00	-	-	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,00±0,00
<i>L_cl₁₃</i>	0,00±0,00	-	-	-	0,00±0,00	0,00±0,00	-
<i>L₇D₁C₁</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,00±0,00	0,00±0,00
<i>L₇D₂C₃</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,00±0,00	-	-	0,00±0,00
<i>L₇D₂C₁</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,00±0,00
<i>L₉D₁C₁</i>	0,00±0,00	-	-	-	-	-	-
<i>L₉D₂C₃</i>	-	-	0,00±0,00	-	-	-	-
<i>L₆D₁C₁</i>	-	-	-	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
<i>L₆D₁C₃</i>	-	-	-	-	0,00±0,00	-	-
<i>L₁₂D₁C₃</i>	-	-	-	-	0,00±0,00	-	-
<i>L₉D₂C₁</i>	-	-	-	-	-	0,00±0,00	-

ANNEXE V: Résultats statistiques

Tableau 1: Résultats de l'analyse de variance des cultures pures

Modélisation de la variable Croissance :

Résumé pour la variable dépendante :

Variable	Nbr. de valeurs total	Nbr. de valeurs utilisées	Somme des poids	Moyenne	Ecart-type
Croissance	756	756	756	5.781	3.729

Résumé pour les variables quantitatives :

Variable	Moyenne	Ecart-type
SB	0.150	0.150
pH	4.500	1.634

Résumé pour les variables qualitatives :

Variable	Nombre de modalités	Modalités
Temp	6	0 ~ 3 ~ 6 ~ 24 ~ 48 ~ 72

Coefficients d'ajustement :

R (coefficient de corrélation)	0.813
R ² (coefficient de détermination)	0.660
R ² aj. (coefficient de détermination ajusté)	0.652
SCR	3567.988

Source	ddl	Somme des carrés	F de Fisher	Pr > F
Modèle	17	6932.753	84.351	< 0,0001
Résidus	738	3567.988		
Total	755	10500.741		

Analyse du modèle (Type I SS) :

Source	ddl	Somme des carrés	F de Fisher	Pr > F
SB	1	7.627	1.578	0.210

ANNEXES

pH	1	4610.814	953.697	< 0,0001
Temp	5	1485.857	61.467	< 0,0001
SB*Temp	5	18.872	0.781	0.564
pH*Temp	5	809.582	33.491	< 0,0001

Analyse du modèle (Type III SS) :

Source	ddl	Somme des carrés	F de Fisher	Pr > F
SB	1	7.627	1.578	0.210
pH	1	4610.814	953.697	< 0,0001
Temp	5	1410.003	58.329	< 0,0001
SB*Temp	5	18.872	0.781	0.564
pH*Temp	5	809.582	33.491	< 0,0001

Paramètres du modèle :

Paramètre	Valeur	Ecart-type	Pr > t	Borne inférieure 95 %	Borne supérieure 95 %
Constante	7.401	0.607	< 0,0001	6.210	8.592
SB	-1.443	1.306	0.270	-4.007	1.121
pH	0.203	0.120	0.091	-0.032	0.439
Temp-0	0.000	-	-	-	-
Temp-3	-6.457	0.858	< 0,0001	-8.142	-4.773
Temp-6	-8.611	0.858	< 0,0001	-10.296	-6.927
Temp-24	-10.543	0.858	< 0,0001	-12.227	-8.858
Temp-48	-12.040	0.858	< 0,0001	-13.725	-10.356
Temp-72	-12.295	0.858	< 0,0001	-13.980	-10.611
SB*Temp-0	0.000	-	-	-	-
SB*Temp-3	-0.304	1.847	0.869	-3.930	3.321
SB*Temp-6	2.783	1.847	0.132	-0.842	6.409
SB*Temp-24	1.227	1.847	0.506	-2.398	4.853
SB*Temp-48	0.949	1.847	0.608	-2.677	4.574
SB*Temp-72	-0.014	1.847	0.994	-3.640	3.611
pH*Temp-0	0.000	-	-	-	-
pH*Temp-3	1.168	0.170	< 0,0001	0.835	1.501
pH*Temp-6	1.364	0.170	< 0,0001	1.031	1.697
pH*Temp-24	1.652	0.170	< 0,0001	1.319	1.985
pH*Temp-48	1.863	0.170	< 0,0001	1.530	2.196
pH*Temp-72	1.808	0.170	< 0,0001	1.475	2.141

ANNEXES

Tableau 2 : Résultats de l'analyse de variance des cultures mixtes

Modélisation de la variable Croissance :

Résumé pour la variable dépendante :

Variable	Nbr. de valeurs total	Nbr. de valeurs utilisées	Somme des poids	Moyenne
Croissance	720	720	720	6.991

Résumé pour les variables quantitatives :

Variable	Moyenne	Ecart-type
pH	4.500	1.634
SB	0.150	0.150

Résumé pour les variables qualitatives :

Variable	Nombre de modalités	Modalités
Temp	6	0 ~ 3 ~ 6 ~ 24 ~ 48 ~ 72

Coefficients d'ajustement :

R (coefficient de corrélation)	0.800
R ² (coefficient de détermination)	0.641
R ² aj. (coefficient de détermination ajusté)	0.632
SCR	3272.651

Source	ddl	Somme des carrés	F de Fisher	Pr > F
Modèle	17	5830.718	73.572	< 0,0001
Résidus	702	3272.651		
Total	719	9103.368		

Analyse du modèle (Type I SS) :

Source	ddl	Somme des carrés	F de Fisher	Pr > F
pH	1	3421.302	733.886	< 0,0001
SB	1	175.972	37.747	< 0,0001
Temp	5	1991.365	85.432	< 0,0001
pH*Temp	5	147.279	6.318	< 0,0001

ANNEXES

SB*Temp	5	94.801	4.067	0.001
---------	---	--------	-------	-------

Analyse du modèle (Type III SS) :

Source	ddl	Somme des carrés	F de Fisher	Pr > F
pH	1	3421.302	733.886	< 0,0001
SB	1	175.972	37.747	< 0,0001
Temp	5	475.616	20.404	< 0,0001
pH*Temp	5	147.279	6.318	< 0,0001
SB*Temp	5	94.801	4.067	0.001

Paramètres du modèle :

Paramètre	Valeur	Ecart-type	Pr > t	Borne inférieure 95 %
Constante	5.700	0.610	0,0001	< 4.502
pH	0.840	0.121	0,0001	< 0.603
SB	-1.031	1.314	0.433	-3.611
Temp-0	0.000	-	-	-
Temp-3	-2.359	0.863	0.006	-4.054
Temp-6	-3.537	0.863	0,0001	< -5.232
Temp-24	-5.678	0.863	0,0001	< -7.373
Temp-48	-6.939	0.863	0,0001	< -8.635
Temp-72	-6.821	0.863	0,0001	< -8.516
pH*Temp-0	0.000	-	-	-
pH*Temp-3	0.311	0.171	0.069	-0.024
pH*Temp-6	0.459	0.171	0.007	0.124
pH*Temp-24	0.719	0.171	0,0001	< 0.384
pH*Temp-48	0.805	0.171	0,0001	< 0.470
pH*Temp-72	0.678	0.171	0,0001	< 0.343
SB*Temp-0	0.000	-	-	-
SB*Temp-3	0.500	1.858	0.788	-3.149
SB*Temp-6	-1.181	1.858	0.525	-4.830
SB*Temp-24	-1.998	1.858	0.283	-5.646
SB*Temp-48	-4.842	1.858	0.009	-8.491
SB*Temp-72	-6.066	1.858	0.001	-9.715