

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES BACTÉRIOCINES PRODUITES PAR DES BACTÉRIES LACTIQUES MAROCAINES ET ALGÉRIENNES ISOLÉES DE DIFFÉRENTS MILIEUX

K. BAYOUB¹, A. DOUMANDJF², A. SOUKRI¹

1 - Université Hassan II, Faculté des Sciences Aïn Chock, Département de biologie, Laboratoire de physiologie et génétique moléculaire, Km 8 route d'El Jadida, BP. 5366 Maarif, Casablanca Maroc.

2 - Université Saâd Dahlab, Faculté des sciences Agro-vétérinaires, Département des sciences agronomiques, route de Soumaâ, B.P. 270 – 9000, Blida, Algérie.

RÉSUMÉ

Les bactériocines sont des peptides ou protéines produites par des genres bactériens possédant des activités antimicrobiennes, habituellement spécifiques contre les bactéries des espèces apparentées sans être létales à la souche productrice. Les bactériocines produites par les bactéries Gram + sont dans la plupart des cas petites. Elles perméabilisent la membrane de la cellule hôte. Elles ont une grande activité antimicrobienne spécifique contre les microorganismes pathogènes et d'altération. Le spectre d'activité des bactériocines issues des bactéries Gram + varie de l'étroit au large mais surtout spécifique aux bactéries Gram +.

Dans notre recherche, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une activité antibactérienne des bactériocines produites par une série de bactéries lactiques isolées au Maroc à partir des produits laitiers, alors que d'autres souches ont été isolées en Algérie à partir de selles d'un nourrisson âgé de deux mois allaité exclusivement au sein de l'hôpital de Ben Boulaid de Blida. Nous avons fait une étude biochimique permettant la caractérisation des bactériocines, ainsi qu'une étude physico-chimique et avons détecté l'activité bactériocine sur gel. Parallèlement, nous avons effectué une étude de synergie et d'antagonisme entre ces souches et leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques.

Mots Clés : bactériocines, bactéries lactiques, activité antimicrobienne, antibiotiques, synergie.

SUMMARY

Bacteriocins are proteinaceous substances produced by bacteria to inhibit the growth of similar bacterial strain(s). The bacteriocins produced by the gram + bacteria are generally small size. They have a great specific antimicrobial activity against the pathogenic micro-organisms. In our research, we were interested in the study of an anti-bacterial activity of the bacteriocins produced by some lactic bacteria isolated from Moroccan dairy products and other are Algerian strains isolated from the saddles from infant nursed exclusively with the two months old centre from the hospital from Ben Boulaid de Blida. We made a biochemical study allowing the characterization of the isolated bacteriocins which activity was detected in situ on Tricin-SDS-PAGE. In parallel, we carried out a study of synergy and antagonism between these strains and their sensitivity with respect to antibiotics.

Key Words : bacteriocins, lactic bacteria, antimicrobial activity, antibiotics, synergy.

المساهمة في دراسة البكتيريوسينات الناتجة عن البكتيريا اللبنية المعزولة في عدة أوساط في الجزائر و المغرب

البكتيريوسينات هي بروتينات ذات نشاط مضاد للبكتيريا المشابهة لها و ليس المنتجة لها، تنتجها بعض أنواع البكتيريا و منها بكتيريا "غرام +".

هذه البكتيريوسينات لها نشاط كبير ضد البكتيريا المسببة للأمراض حيث تزيد في نفاذية غشاء الخلية الضيقة. في هذا البحث، تطرقنا إلى النشاط المضاد للبكتيريا للبكتيريوسينات التي تم إنتاجها من طرف بعض أنواع البكتيريا اللبنية المستخرجة من مشتقات الحليب (في المغرب)، و فضلات الرضع البالغين من العمر عامين في مستشفى بن بولعيد في البليدة. و قد قمنا بدراسة بيوكيميائية لتمييز البكتيريوسينات و أخرى فيزيو-كيميائية للتعرف على نشاطها في الجليد. و موازاة مع هذا، قمنا بإجراء دراسة عن تلاؤم و عدم تلاؤم هذه البكتيريا مع المضادات الحيوية.

المفاتيح : بكتيريوسينات، بكتيريا لبنية، نشاط مضاد للبكتيريا، تلاؤم.

INTRODUCTION

Malgré l'application des technologies modernes de transformation des aliments et l'application des principes de qualité, les toxi-infections alimentaires sont à la base de 6,5 à 33 millions de maladies humaines et plus de 9000 morts chaque année dans le monde (MEAD et al., 1999). L'aliment est la source fréquemment mise en cause. Des moyens usuels de prévention tels les traitements physiques (haute pression, rayons ionisants, pasteurisation, stérilisation, congélation, réfrigération,...), chimiques (nitrites, sulfites...), compromettent souvent la qualité nutritionnelle et organoleptique de l'aliment.

Les chercheurs et les industriels de l'agro-alimentaire sont de plus en plus contraints à réduire l'emploi de conservateurs chimiques pouvant avoir des effets néfastes sur la santé humaine. Ceci incite à la recherche d'autres alternatives notamment celles qui utilisent des agents biologiques connus pour leur innocuité. Dans cette optique, l'utilisation de souches bactériennes agissant comme des cultures protectrices sem-

ble être une voie d'avenir pour promouvoir de nouvelles catégories d'aliments tels les produits « Bio » contenant des conservateurs dits « naturels ».

Dans ce sens, les bactériocines qui sont des substances antibactériennes produites par les bactéries, en l'occurrence les bactéries lactiques, sont des candidats prometteurs à la fois pour exploiter leur pouvoir préservateur et pour réconcilier produits « naturels » et qualité hygiénique des aliments.

L'objectif de notre travail est de caractériser ces substances antimicrobiennes produites par des souches isolées du lait traditionnel fermenté marocain, sélectionnées par leur effet bactéricide antagoniste vis-à-vis *Listeria monocytogenes* et étudier l'effet antagoniste et synergique des souches algériennes identifiées isolées à partir des selles d'un nourrisson âgé de deux mois allaité exclusivement au sein de l'hôpital de Ben Boulaid de Blida, activités complétées par l'étude d'une sensibilité de ces souches vis-à-vis des antibiotiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches utilisées dans ce présent travail sont isolées du lait traditionnel fermenté marocain, ces souches ont été sélectionnées pour leur pouvoir antimicrobien vis-à-vis des germes pathogènes dont *Listeria monocytogenes* utilisée comme souche indicatrice dans notre étude.

Nous avons fait appel à une étude microbiologique et biochimique afin de détecter l'activité antibactérienne par les différentes techniques : technique de spot, antagonisme direct sur milieu solide et test de diffusion.

1. Détection de l'activité

1.1. Technique de spots

Dans des boîtes de Pétri stériles, on fait couler 20 ml du milieu MRS Agar inoculé avec 0.1 ml d'une culture jeune de *Listeria monocytogenes* (12 à 16 heures). Les boîtes sont laissées séchées pendant 30 min. Ensuite, on dépose des volumes de 0.5 µl d'une culture de la souche à tester. Les boîtes sont incubées pendant 18 h à 30°C, puis examinées pour la production de bactériocines révélée par la présence d'une zone claire entourant le spot de la souche productrice après l'incubation.

1.2. Antagonisme direct sur milieu solide

Les souches à tester sont repiquées sur boîtes MRS Agar, puis incubées pendant 8 h à 30 °C. Ensuite, une surcouche de gélose molle (TSB - 0.7 % agar) contenant la souche indicatrice *Listeria monocytogenes* (107 cellules) est coulée. Après 18 h d'incubation à 30 °C, on examine la boîte pour l'apparition des halos d'inhibition (zones claires dans une nappe trouble formée par la croissance de la bactérie indicatrice).

1.3. Test de diffusion

Dans cette technique, le surnageant de la culture à tester est obtenu après centrifugation à 10000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Après avoir ajusté le pH du surnageant à pH 6.8 en utilisant une solution de NaOH 5M, le surnageant est ensuite stérilisé par filtration (filtre Millipores, 0.20 µm).

Nous avons également testé l'activité antibactérienne présentée dans le culôt bactérien. Le culot est repris dans un petit volume de tampon de lyse ou de tampon de sonication (Tris-HCl 50mM pH 7, EDTA 1mM), il est alors soniqué, puis le produit de sonication est enfin centrifugé à 13000 rpm pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant est récupéré pour être testé.

Une surcouche de gélose molle contenant la souche indicatrice *Listeria monocytogenes* (107 cellules) est coulée sur un milieu MRS. Ensuite, les puits sont creusés et remplis par les surnageants préparés (50 µl). Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 18 h, les zones d'inhibition étant alors examinées.

2. Etude physico-chimique de la bactériocine

Une étude physico-chimique a été effectuée pour savoir la stabilité de la bactériocine aux différents pH combiné au traitement thermique. A cet effet, une purification partielle par précipitation au sulfate d'ammonium à différentes concentrations et une migration sur gel d'électrophorèse Tricine SDS-PAGE a été réalisée.

2.1. Effet du pH et du traitement thermique sur l'activité de la bactériocine

Ce test permet de connaître la gamme de pH dans laquelle la bactériocine manifeste son acti-

tivité inhibitrice, ainsi que sa résistance à un traitement thermique.

Le surnageant de culture à tester est mis dans des aliquotes qui sont ajustés aux pH 2, 3, 4, 6, 8, 10 et 11 à l'aide de NaOH 5M et d'HCl concentré. D'autres aliquotes sont incubés à des températures : 60 °C pendant 60 min, 100 °C pendant 30 min et 121 °C pendant 20 min. Les échantillons sont ensuite examinés pour leur activité inhibitrice par la méthode de diffusion.

2.2. L'effet du pH combiné au traitement thermique

Ce test permet de déterminer la thermorésistance de la bactériocine à différents pH.

Les aliquotes de surnageant sont ajustés aux pH 2, 3, 4, 6, 8, 10 et 11 puis ils sont soumis à une stérilisation en autoclave (121 °C pendant 20 min). L'activité inhibitrice de ces échantillons a été examinée par la méthode de diffusion.

2.3. L'action du pH sur la stabilité de la bactériocine

C'est un test qui montre l'action du pH sur la stabilité structurale de la bactériocine.

Les aliquots de surnageant récupéré par la centrifugation de la culture à tester sont ajustés aux différents pH 2-11, puis ils sont incubés à 30 °C pendant 8 heures. Après l'incubation, les échantillons sont neutralisés par ajustement du pH à 6,8, ensuite ils sont examinés pour la pérennité de l'activité de la bactériocine par la méthode de diffusion.

3. Purification partielle de la bactériocine par précipitation au sulfate d'ammonium

300 ml de culture bactérienne sont centrifugés à 10000 rpm pendant 15 min à 4 °C. Le surna-

geant récupéré est précipité au sulfate d'ammonium 80 %, qui s'ajoute progressivement à froid sous agitation douce. Après la précipitation, le surnageant est laissé sous agitation très douce 30 min (ou bien toute la nuit à 4 °C).

La fraction protéique précipitée est récupérée par centrifugation à 9000 rpm pendant 20 min à 4 °C. Le culot obtenu est resuspendu dans un minimum de tampon phosphate 10 mM pH 7. La solution est ensuite dialysée, pendant toute la nuit, dans un sac à dialyse, dont la coupure de la masse moléculaire est de 1000 Da, contre 5 litres de tampon phosphate 10 mM pH 7. Ensuite le sac à dialyse est trempé dans la poudre de Polyéthylène glycol PEG 4000 pour concentrer l'échantillon éventuellement dilué par le phénomène de dialyse. La fraction dialysée concentrée est testée pour son activité antibactérienne.

4. Détermination de poids moléculaire par Tricine SDS-PAGE

Cette méthode est établie par SCHAGGER et VON JAGOW (1987) et modifiée par LESSE *et al.* (1990) ; elle permet la séparation des protéines de 1-100 kDa.

Après avoir déposé les échantillons (surnageant de la culture, surnageant du culot soniqué, la fraction précipitée et dialysée) dans les puits, en double exemplaires, la migration est assurée dans les deux tampons anode-cathode. La protéine standard utilisée comme marqueur de poids moléculaire est la nisine (Nisphalin, Merk), qui est une bactériocine connue et bien étudiée, dont le poids moléculaire est de 3,5 kDa. Après la migration, le gel est découpé en deux moitiés. Une moitié est soumise à une révélation des protéines par coloration/décoloration.

L'autre moitié du gel est utilisée pour révéler les bandes responsables de l'activité de bactériocine selon la méthode de BHUNIA *et al.* (1987). Cette partie du gel est lavée dans le tampon phosphate 10 mM pH7 sous agitation douce pendant 2 à 4 heures, puis elle est placée dans une boîte de Pétri contenant du MRS (2,5 % agar). Ensuite, 6 ml de gélose molle contenant 107 cellules de *Listeria monocytogenes* utilisée comme souche indicatrice, sont coulés dessus. Enfin, la boîte est incubée à 30 °C pendant 8 heures, pour être examinée à la recherche d'une éventuelle zone d'inhibition. Celle-ci est extrapolée à l'autre partie du gel coloré à la recherche d'une bande correspondante.

Dans une autre part, nous avons étudié l'effet antagoniste et synergique des souches algériennes identifiées isolées à partir des selles d'un nourrisson âgé de deux mois allaité exclusivement au sein de l'hôpital de Ben Boulaid de Blida. Ainsi une sensibilité de ces souches vis-à-vis des antibiotiques a été étudiée.

Les souches bactériocinogènes algériennes utilisées lors de cette étude sont :

- *Lactobacillus acidophilus* 11 ;
- *Lactobacillus bulgaricus* ;
- *Streptococcus thermophilus* ;
- *Bifidobacterium breve* ;
- *Bifidobacterium infantis*.

Les souches bactériocinogènes marocaines utilisées lors de cette étude sont :

- *Enterococcus faecium* ;
- *Leuconostoc* spp.

Deux espèces cibles ont été utilisés soit :

- *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 ;
- *Lactobacillus bulgaricus* 340 Rhondia Food-France (Danisco, Dangé-Saint-Romain, France).

5. Etude de la sensibilité des souches algériennes et marocaines vis-à-vis des antibiotiques

Cette méthode a pour but de déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis de divers antibiotiques (Oxoid, England). Huit antibiotiques ont fait l'objet de cette présente étude : Vanomycine (VA30), nalidixic acid (NA30), penicilline G (P10), novobiocin (NV5), tetracycline (TE30), amoxicilline (AMX25), céphalaxine (CN30), penicilline P (P6).

La méthode de diffusion des disques ou antibiotogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic.

Des disques d'antibiotique sont déposés sur gélose MRS préalablement ensemencée avec une préculture de bactéries lactique. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance de disque. Une fois que la diffusion de l'antibiotique est achevée, ces boîtes sont mises à l'étuve à 37 °C./ 24 h ou à 30 °C./ 24 h. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe.

6. Etude des effets de synergie entre les différentes souches envers *Lb. bulgaricus* 340

Les surnagants bruts actifs de chaque souche bactériocinogène sont mélangés à raison de 50 % comme suit :

Au niveau du 1^{er} essai :

Chaque puits est rempli avec 50 µL des surnagants des cultures suivantes :

- 1- *Lb. acidophilus* ;
- 2- *Lb. acidophilus* + *Enterococcus faecium* ;
- 3- *Lb. acidophilus* + *Leuconostoc* spp ;
- 4- *Lb. acidophilus* + *Enterococcus faecium* (S3) ;
+ *Leuconostoc* spp ;
- 5- *Enterococcus faecium* ;
- 6- *Leuconostoc* spp.

Au niveau du 2^{ème} essai :

Chaque puits est rempli avec 50 μ L des surnatants des cultures suivantes :

- 1- *Bf. infantis* ;
- 2- *Enterococcus faecium* + *Leuconostoc* spp + *Lb. acidophilus* + *Bf. infantis* ;
- 3- *Bf. infantis* + *Enterococcus faecium* ;
- 4- *Bf. infantis* + *Leuconostoc* spp ;
- 5- *Bf. infantis* + *Leuconostoc* spp + *Enterococcus faecium*.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les souches marocaines sont identifiées comme étant des cocci, Gram-positives, catalase négatives, oxydase négatives.

1. Caractérisation physico-chimique de la bactériocine

1.1. Effet du pH et de la température sur l'activité de la bactériocine

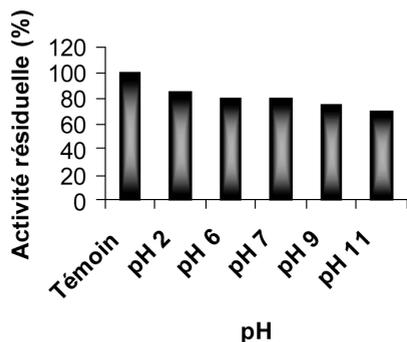


Figure 1 : L'effet du pH sur l'activité bactériocinogène (S1).

Les résultats indiquent la thermorésistance de la bactériocine produite par la souche S1, ainsi l'activité antibactérienne de cette bactériocine reste conservée à -20°C pendant plusieurs mois. Aussi la bactériocine reste active dans une gamme de pH comprise entre 2 et 11, avec une diminution d'activité d'environ 25 % à pH 11, ceci en comparaison avec le témoin dont le pH est de 4,8.

L'effet du pH peut s'expliquer par le fait que la fixation des bactériocines sur la membrane cytoplasmique des cellules cibles s'améliore en diminuant le pH (ENNAHAR *et al.*, 2000).

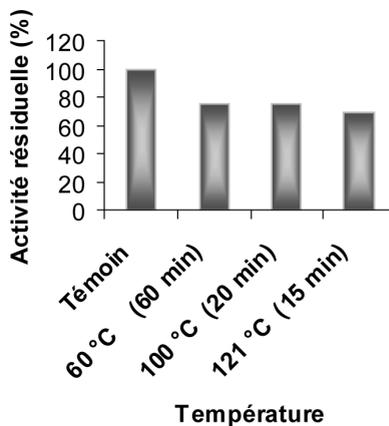


Figure 2 : L'effet de la température sur l'activité bactériocinogène (S1).

D'après LEROY et DE VUYST (1999), l'inactivation de Sakacin K qui est une bactériocine produite par *Lactobacillus sake* CTC 494 et qui a une activité maximale à pH 5, augmente avec le pH. Ceci probablement en raison du degré élevé d'adsorption de cette molécule à la cellule bactérienne.

La production de la bactériocine, selon CHOI *et al.*, (2000), est influencée par le pH du milieu de culture, le maximum de la production de la

bactériocine nisin-like produite par *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* A 164 est observé à pH 6.

LYON *et al.* (1995) ont noté que l'activité d'Entérocoque EL1 n'est pas touchée par un chauffage à 100 °C et qu'elle garde une partie de son activité à 121 °C pendant 30 min. Aussi cette activité est détectée dans toute la gamme de pH 2 à pH 11, avec une plus grande activité de pH 2 à pH 7 (pH acide et neutre).

1.2. L'effet du pH combiné au traitement thermique

La température et le pH sont deux paramètres qui influencent la stabilité des bactériocines. Pour ce but, une expérience combinant les deux effets a été réalisée (figures 3 et 4).

Nous remarquons que les trois souches testées ont une activité dans une zone de pH large allant de 2 à 11. Concernant la stabilité des bactériocines à pH combiné au traitement thermique, les résultats montrent que les souches résistent à l'autoclavage à des pH acides, en effet, l'activité de la souche S1 est maintenue à pH: 2, 3, 4 et 6 alors qu'elle se perd à pH basique suite au traitement à l'autoclave ; ceci est valable aussi bien pour le surnageant que pour la fraction dialysée. Pour la souche S2 l'activité disparaît à partir du pH 5 dans le cas de traitement thermique, alors que la souche S3 maintient son activité jusqu'à pH 9, ce qui pourrait être intéressant pour les aliments ayant un pH basique et qui subissent un traitement thermique durant le processus de fabrication. Cependant, la température de l'autoclave semble inactiver une partie des bactériocines si nous comparons le diamètre des zones d'inhibition enregistré dans le cas de pH sans traitement thermique. Ce n'est pas le cas pour la souche S1 qui montre une suractivité à des pH acides suite

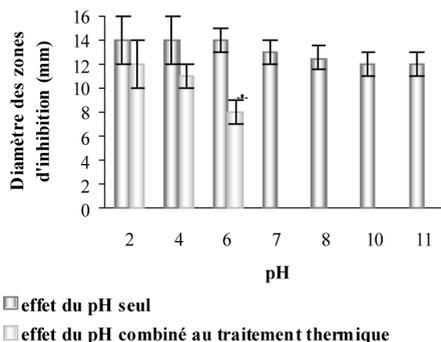


Figure 3 : Effet du pH combiné au traitement thermique (121 °C-20 min-) sur la stabilité de bactériocine (la souche S1).

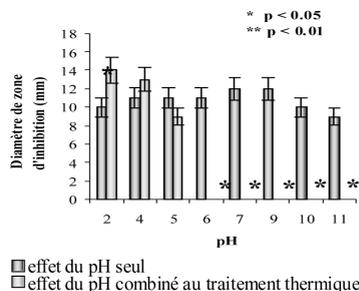


Figure 4 : Effet du pH combiné au traitement thermique (121 °C-20 min-) sur la stabilité de bactériocine (la souche S2).

à ce traitement. Ce qui pourrait rendre cette souche intéressante en matière de fabrication et stérilisation des aliments ayant un pH acide.

Nous pouvons déduire de ces résultats que la structure des bactériocines est résistante à l'autoclavage, et que surtout elle est stable à pH acide combiné au traitement thermique, ce qui veut dire qu'elle pourrait être utilisée dans le cas de préparation d'aliments subissant un traitement thermique pour le stockage et la conservation.

Nos résultats correspondent à ceux trouvés par RYAN *et al.*, 1996, Lacticin 3147 une bactériocine

produite par *Lactococcus lactis* DPC3147 est thermostable en particulier à pH acide. De même pour CHOI *et al.*, (2000) la bactériocine nisin-like produite par *Lactococcus lactis subsp. Lactis* A164 est thermostable particulièrement à bas pH.

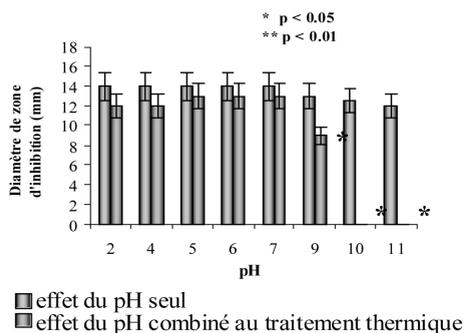


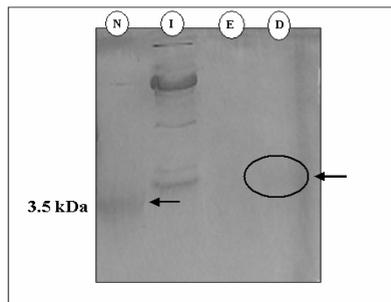
Figure 5 : Effet du pH combiné au traitement thermique (121°C–20 min-) sur la stabilité de bactériocine (la souche S3).

2. Purification partielle par précipitation au sulfate d'ammonium

Sur le gel Tricine SDS-PAGE 16.5 % coloré, nous observons la bande de la nisine (N) dont la taille de 3,5 kDa est utilisée comme marqueur de taille. La fraction intracellulaire (I) (surnageant des cellules soniquées) présente plusieurs bandes, et la fraction (E) (surnageant de la culture) ne présente aucune bande vu qu'elle est très diluée, alors que la fraction dialysée (D) présente une bande à peine visible qui est responsable de l'activité antibactérienne sur le gel d'activité.

Ce résultat suggère que la bande responsable de l'activité est différente de celle de la nisine de point de vue « poids moléculaire » (supérieur à 3,5 kDa), ce qui est confirmé par le résultat de western blot où l'anticorps de la nisine ne

reconnaît que la bande de la nisine et non pas notre bande. De plus, la différence de la structure est démontrée par le test de β -mércaptoéthanol qui inhibe l'activité de la nisine à la concentration 45 mM, alors que notre bactériocine est inactivée à partir de 30 mM.



N : Nisine bactériocine commercialisée, I : Intracellulaire : cellules soniquées, E : Surnageant de la culture, D : Dialysat.

Figure 6 : Gel Tricine SDS-PAGE 16.5 %).



I : Intracellulaire, N : Nisine bactériocine commercialisée, D : Dialysat, S : Surnageant de la culture.

Figure 7 : Détection de l'activité de la bactériocine après Tricin SDS-PAGE.

3. Etude de la sensibilité des souches algériennes et marocaines vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 et envers *Lactobacillus bulgaricus* 340 Rhondia Food-France (Danisco, Dangé-Saint-Romain, France)

D'après nos résultats les bactériocines issues des souches marocaines ont présenté une activité antimicrobienne vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* ATCC 19117. Ces zones d'inhibitions obtenues sont de 14 et 15 mm respectivement avec *Enterococcus faecium* et *Leuconostoc* spp. Par contre les bactériocines issues de souches algériennes n'ont présenté aucune activité antimicrobienne envers *Listeria monocytogenes* ATCC 19117.

4. Etude de la sensibilité des souches algériennes et marocaines vis-à-vis des antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme sont présentés au niveau du tableau suivant :

Tableau I : Résultats de la sensibilité des souches à l'égard des 8 antibiotiques.

Antibiotique	P10	TE30	VA30	NV5	NA30	AMX25	P6	CN30
Souche								
<i>Bf. breve</i>	15	17	21	18	0	24	12	14
<i>Bf. infantis</i>	22	14	17	12	0	34	16	12
<i>Sc. thermophilus</i>	20	14	17	14	0	30	15	12
<i>Lb. acidophilus</i> 11	20	30	20	19	0	28	16	13
<i>Lb. bulgaricus</i>	20	14 (bactéricide) 30 (bactériostatique)	17	22	0	33	20	23
<i>Lb. bulgaricus</i> 340	20	10	15	14	0	30	19	22
<i>Leuconostoc</i> spp	14	27	18	14	0	24	9	9
<i>Enterococcus faecium</i>	13	30	18	18	0	25	9	8

(Diamètre du disque 6 mm)

Toutes les souches représentent une sensibilité envers divers antibiotiques, plus particulièrement envers l'Amoxicilline (AMX25) et la Tétracycline (TE30). Par contre toutes les souches lactiques ne présentent aucune sensibilité l'acide nalidixique, ce dernier est un antibiotique très utilisé comme additif dans les milieux sélectif pour l'isolement des bactéries lactiques. La Tétracycline (TE30) présente deux effets antimicrobiens (effet bactériostatique et effet

bactéricide) envers l'espèce *Lb. bulgaricus* 340. L'Amoxicilline qui est un antibiotique très fréquemment prescrit chez l'enfant, est active *in vitro* sur la plupart des souches de bifidobactéries (MOUBARECK *et al.*, 2005). Cependant, peu d'études décrivent les effets de l'amoxicilline sur la flore totale de l'enfant (WALIGORA-DUPRIET *et al.*, 2007).

5. Etude des effets antagonistes entre les différentes souches

Les nombreuses méthodes décrites pour le criblage des bactéries lactiques envers d'autres souches lactiques avec la méthode de diffusion des puits, afin de détecter la production de la substance inhibitrice. Le principe de cette méthode est basé sur la diffusion de l'agent antibactérien dans un milieu gélosé ensemencé au préalable avec un germe cible.

Pour étudier l'effet antagoniste sous l'effet de la bactériocine, il est nécessaire d'éliminer l'influence des acides organiques (acide lactique), Le pH du milieu est ajusté à une valeur de 6,8 en ajoutant quelques gouttes de NaOH 1N stérile.

D'après les résultats de cette présente étude toutes les souches lactiques présentent un effet antagoniste envers les espèces taxonomiquement proches (tableau II).

6. Etude des effets de synergie entre les différentes souches envers *Lb. bulgaricus* 340

Les résultats de l'activité antimicrobienne obtenue sous l'effet de la synergie (1^{er} essai) sont représentés ci-après (tableau III).

Tableau II : Résultat du criblage des souches lactiques .

Souche cible	1	2	3	4	5	6	7
Souche productrice							
<i>Bf. breve</i>	++>30	++>30	0	33	25.5	16	15
<i>Bf. infantis</i>	++>30	++>30	++>30	0	31	10	11
<i>Lb. acidophilus</i> 11	0	26	26	28	25	13	12
<i>Lb. bulgaricus</i>	XX	0	XX	XX	XX	12	11
<i>Sc. thermophilus</i>	XX	28	29	XX	0	13	12
<i>Leuconostoc</i> spp	25	22	20	25	20	0	0
<i>Enterococcus faecium</i>	26	24	24	25	23	0	10
<i>Lb. bulgaricus</i> 340	35	30	25	30	30	12	11

XX : Limite non claire

1: *Lb. acidophilus* 11, 2: *Lb. bulgaricus*, 3: *Bf. breve*, 4: *Bf. infantis*, 5: *Sc. thermophilus*, 6: *Enterococcus faecium*, 7: *Leuconostoc* spp**Tableau III** : Résultat de l'activité antimicrobienne sous l'effet de la synergie.

Surnagent brut actif	Diamètre de la zone d'inhibition (Zi, mm)
1- <i>Lb. acidophilus</i>	<u>40</u>
2- <i>Lb. acidophilus</i> + <i>Enterococcus faecium</i>	<u>40</u>
3- <i>Lb. acidophilus</i> + <i>Leuconostoc</i> spp	<u>40</u>
4- <i>Lb. acidophilus</i> + <i>Enterococcus faecium</i> + <i>Leuconostoc</i> spp	35
5- <i>Enterococcus faecium</i>	13
6- <i>Leuconostoc</i> spp	11

Une activité inhibitrice à l'égard de la souche cible *Lb. bulgaricus* 340 est optimale lorsque le surnagent brut actif est issu d'une culture de *Lb. acidophilus* ou lorsqu'il y a un mélange de surnagent brut issue de *Lb. acidophilus* + *Enterococcus faecium* ou bien *Lb. acidophilus* + *Leuconostoc* spp (soit respectivement Zi= 40 mm).

Les résultats de l'activité antimicrobienne obtenue sous l'effet de la synergie (2^{ème} essai) sont les suivants (tableau IV).

Tableau IV : Résultat de l'activité antimicrobienne sous l'effet de la synergie .

Surnagent brut actif	Diamètre de la zone d'inhibition (Zi, mm)
1- <i>Bf. infantis</i>	35
2- <i>Enterococcus faecium</i> + <i>Leuconostoc</i> spp + <i>Lb. acidophilus</i> + <i>Bf. infantis</i>	36
3- <i>Bf. infantis</i> + <i>Enterococcus faecium</i>	<u>40</u>
4- <i>Bf. infantis</i> + <i>Leuconostoc</i> spp	32
5- <i>Bf. infantis</i> + <i>Leuconostoc</i> spp.+ <i>Enterococcus faecium</i>	30

Une activité inhibitrice vis-à-vis de la souche cible *Lb. bulgaricus* 340 est optimale (soit Zi= 40 mm) lorsqu'il y a un mélange de surnagent brut issu de *Bf. infantis* + *Enterococcus faecium*.

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous nous sommes concentrés sur l'étude de l'activité antibactérienne de bactériocines produites par quelques souches lactique isolées du lait fermenté traditionnel. Nous concluons que notre bactériocine peut être classée comme un peptide thermostable actif contre la *Listeria*, et nous présumons qu'elle appartient à la classe IIa. De plus, la stabilité à différentes valeurs de pH et la thermostabilité sont des propriétés qui rendent la bactériocine intéressante du point de vue «biopréservation» ; en effet, elle peut être utilisée dans des aliments acides comme non-acides, et aussi être employée dans des aliments réfrigérés, ainsi elle empêcherait le développement d'une majorité de microorganismes tels *Listeria monocytogenes* et qui touchent à la sécurité alimentaire. Toutes les souches lactiques utilisées lors de cette étude représentent une sensibilité envers divers antibiotiques, plus particulièrement envers l'Amoxicilline (AMX25) et la Tétracycline (TE30). Toutes les souches

lactiques présentent un effet antagoniste envers les espèces taxonomiquement proches. L'activité inhibitrice vis-à-vis de la souche *Lb. bulgaricus* 340 est optimale lorsque le surnagent brut actif est issu d'une culture de *Lb. acidophilus* ou lorsqu'il y a un mélange de surnagent brut issue de *Lb. acidophilus* et *Enterococcus faecium* ou bien un autre mélange de surnagent brut issu de *Lb. acidophilus* et *Leuconostoc* spp. L'effet de synergie vis-à-vis de la même souche cible est observé également lorsqu'il y a un mélange de surnagent brut issu de *Bf. infantis* et d'*Enterococcus faecium*.

Références bibliographiques

- MEAD PAUL S., SLUTSKER L., DIETZ VANCE, MCCAIG L.F., BRESEE JOSEPH S., SHAPIRO CRAIG, GRIFFIN PATRICIA M. and TAUXE ROBERT V. (1999). Food Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607 - 625.
- ENNAHAR S., SASHIHARA T., SONOMOTO K. and ISHIZAKI A. (2000). Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 85 - 106.
- LEROY F. and DE VUYST L. (1999). Temperature and pH Conditions That Prevail during Fermentation of Sausages Are Optimal for Production of the Antilisterial Bacteriocin Sakacin K. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 974 - 981.
- CHOI H. J., CHEIGH C.I., KIM S.B. and PYUN Y. R. (2000). Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* A164 isolated from Kimchi. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 563 - 571.
- LYON WANDA J., OLSON DENNIS G. and MURANO ELSA A. (1995). Isolation and Purification of Enterocin EL1, a Bacteriocin Produced by a Strain of *Enterococcus faecium*. *Journal of Food Protection*, 58, 890 - 898.
- KLAENHAMMER T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological Reviews*, 12, 39 - 86.
- BHUNIA A.K., JOHNSON M.C., and RAY B. (1987). Direct detection of antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Industrial Microbiology*, 2, 319 - 322.
- MOUBARECK C., GAVINI F., VAUGIEN L., BUTEL M.J. and DOUCET-POPULAIRE F. (2005). Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria., *J. Antimicrob. Chemother.*, 55, 38 - 44.
- SCHÄGGER, H., and G. VON JAGOW. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368 - 379.
- WALIGORA-DUPRIET A. J., CAMPEOTTO F., NICOLIS I., BONET A., SOULAINES P., DUPONT C. and BUTEL M. J. (2007). Effect of oligofructose supplementation on gut microflora and well-being in young children attending a day care centre. *Int. J. Food Microbiol.*, 113, 108 - 113.