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

S. Metlef, A. Dilmi-Bouras

Laboratoire de bioressources naturelles locales. Faculté des Sciences Agronomiques et des Sciences Biologiques
Université H.B.Chlef, Bp 151 Chlef 02000, Algérie.
e.mail : saranaimamgs@yahoo.fr

RÉSUMÉ. L'étude de la survie de vingt souches de *Lactococcus lactis* pure et de dix de leurs associations nous a permis de sélectionner treize souches pures et sept associations résistantes aux conditions extrêmes du tube digestif et qu'on a qualifiées d'extrêmophiles. Les espèces représentatives de la flore intestinale humaine, isolées à partir de selles d'un enfant âgé de huit ans sont : *E. coli*, *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Clostridium* sp. et *Bacteroides* sp. Les espèces de *Lactococcus lactis* généralement et de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* spécialement ont révélé une activité inhibitrice très importante à l'égard des bactéries Gram positif (*Clostridium* sp et *Enterococcus* sp), importante vis-à-vis des espèces Gram négatif (*E. coli* et *Bacteroides* ssp) et négligeable vis-à-vis de *Bifidobacterium* sp et *Lactobacillus* sp. L'acide lactique produit par les souches ne joue aucun effet antagoniste alors que des substances de nature protéique (bactériocines) ont provoqué des zones d'inhibition importantes. Ces substances existent dans les surnageants bactériens et sont fortement sensibles aux variations du pH (un pH compris entre 5 et 7 semble optimum pour leur activité) et aux enzymes protéolytiques. L'inhibition semble plus importante vis-à-vis de bactéries gram positif, la souche Lc.19 a donné le meilleur pourcentage d'inhibition. Les bactériocines produites par Lc.19 ont exercé un effet transitoire sur les espèces intestinales. Le nombre de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* augmente avec le temps d'incubation même après la disparition de l'espèce lactique. Alors qu'il diminue pour *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp., *E. coli* et *Bacteroides* sp. au bout de 6 jours de contact avec les lactocoques. Ces valeurs reviennent aux taux normaux après 7 jours. A travers ces résultats, nous pouvons conclure que les espèces de *Lactococcus lactis* survivent en harmonie avec les espèces banales de la flore intestinale (*Lactobacillus* sp. et *Bifidobacterium* sp.) et limitent, de façon transitoire, la prolifération des souches nuisibles (spécialement *Clostridium* sp. et *Bacteroides* sp.)

MOTS-CLÉS : Bactéries lactiques extrêmophiles, flore intestinale résidente, activité antagoniste, bactériocines.

1. Introduction

L'homme à l'instar des animaux vit continuellement en association avec la population de microorganisme complexe habitant son tractus intestinal. Les investigations récentes ont mis en évidence le rôle crucial que joue la microflore intestinale dans le maintien et l'amélioration de la santé. Cette microflore est fortement influencée par l'alimentation. Parmi les bactéries lactiques probiotiques, le groupe de levains lactiques mésophiles, auxquels les lactocoques appartiennent a pris une place dans un grand nombre d'études, car cette souche présente une innocuité et une capacité à produire des substances qui s'avèrent avoir une activité antagoniste impressionnante vis-à-vis d'autres espèces bactériennes. De nombreuses études ont été réalisées sur les bactéries utilisées comme probiotiques dans le but de mieux maîtriser leur effets bénéfiques, mais on ne sait pratiquement que peu de leur devenir après ingestion et de leur mécanisme d'action (Lin et al., 2005) et la question qui se pose, est ce que les lactocoques qui traversent les barrières physiologiques et atteignent le colon sont métaboliquement active ? Dans ce contexte, s'inscrit notre étude dont les objectifs visés sont les suivants :

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

2. Matériel et méthodes

L'ensemble de ce travail a été réalisé au laboratoire de bioressources naturelles locales (F.S.A.S.B. UHB Chlef.) ; Laboratoire d'hygiène de la wilaya de Chlef et le laboratoire d'analyse biologique, El - chifaâ, Chlef.

2.1 Matériel

2.1.1. Matériel biologique

- 20 Souches de *Lactococcus lactis* isolées et identifiées par Nehal, (2006) au laboratoire de bioressources naturelles locales (U.H.B.Chlef) à partir de plusieurs régions de périmètre de moyen Cheliff .
- Espèces de la flore intestinale isolées et identifiées à partir de selles d'un enfant âgé de huit ans.

2.1.2. Milieux de culture

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

2.2. Méthodes

2.2.1. Etude de la survie des souches lactiques dans les conditions extrêmes du tube digestif

Le but de cette étude est de sélectionner des souches lactiques extrêmophiles qui peuvent résister aux barrières physiologiques du tube digestif (pH stomacal bas, péristaltisme intestinale et concurrence bactérienne au niveau du gros intestin). La méthode utilisée est celle de Dilmi Bouras et al.,(2002) qui consiste à préparer deux fractions de bouillon M17 dont la première est dépourvue de sels biliaires alors que la deuxième est additionnée de 0,3%. Chaque fraction va subir après division en trois parties un ajustement du pH (par addition du HCl) à 2,5-4,3 et 6,5. A ces différentes fractions sont additionnées : 3 % d'inoculum d'une souche lactique

pure ou d'une association bactérienne. Ces fractions sont ensuite incubées à 37°C où la croissance des ferments est contrôlée par dénombrements sur boîtes de Pétri pendant les intervalles de temps suivant : 0 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h et 72 h.

Pour estimer le nombre des bactéries qui atteignent l'intestin après leur passage à travers l'estomac, il faut préparer un bouillon M17 à pH 6,5 additionné de 3 % d'inoculum d'une flore intestinale standard obtenu à partir des selles d'un enfant âgé de huit ans. Ce milieu est inoculé par 3 % d'une souche lactique pure qui a été préalablement cultivée dans un milieu M17 à pH 4,3 pendant 3 h. Le suivi de la survie des lactocoques en présence des espèces de la flore intestinale est réalisé par des dénombrements successifs à différents intervalles de temps : 0, 3, 6, 24, 48 et 72 h.

2.2.2. Étude de l'interaction de *Lactococcus lactis* ssp et des espèces isolées de la flore intestinale résidente

2.2.2.1. Préparation des pré-cultures bactériennes

Les bactéries lactiques sontensemencées dans des tubes qui contiennent 9 ml de milieu M17, les tubes sont incubés pendant 18 h à 30°C, des dénombrements successifs ont été réalisés dans les intervalles de temps croissant (0 h, 2 h, 6 h et 18 h). Les espèces bactériennes représentatives de la flore intestinale résidente sont repiquées dans leurs milieux de croissance sélectifs et incubées à 37°C pendant 18 h. Après incubation, quelques colonies sont reprises à partir de chaque espèce dans des bouillons de croissance sélectifs et incubées à 37°C pendant le temps nécessaire pour que la charge bactérienne de chaque espèce atteint les valeurs trouvées dans les selles.

2.2.2.2. Méthode de disque ou porte germe

Elle consiste selon Tadesse et al. (2004) à :

- inonder en surface les boîtes de Pétri contenant le milieu MHA par quelques millilitres des pré cultures de la souche intestinale (souche indicatrice),
- laisser sécher les boîtes pendant 30 min à 37°C, après séchage, déposer à la surface de la gélose des disques en papier buvard stérile préalablement imprégnés par la pré culture des bactéries lactiques, ensuite sécher encore une fois les boîtes pendant 30 min,
- mettre les boîtes à 4°C pendant 4h pour assurer la diffusion des substances responsables de l'interaction, enfin incuber les boîtes à 37°C pendant 24h.
- L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques dont le diamètre est mesuré à partir du centre du disque en mm.

2.2.3. Localisation des substances responsables de l'interaction

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

2.2.4. Identification des substances responsables de l'interaction

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

2.2.4.1. Préparation de la culture bactérienne

Dans un erlenmeyer stérile, ensemencer 20 ml de M17 par les souches lactiques qui ont donné les meilleures inhibitions, ensuite agiter cette préculture à une vitesse de 100 tours /min et incubé à 30°C pendant 18 h. La préculture déjà préparée est utilisée comme un inoculum à raison de 10% pour ensemencer 100 ml de M17 contenu dans un erlenmeyer de 500 ml, cette préparation est incubée à 37°C pendant 24 h.

2.2.4.2. Elimination de l'effet de l'acide lactique

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

2.2.4.3. Élimination de l'effet des bactériocines

Le surnageant obtenu après la centrifugation d'une culture bactérienne, préparé comme précédemment, est chauffé à 121°C pendant 30 min. Ce surnageant est utilisé pour étudier son effet sur les espèces de la flore intestinale par la méthode des disques.

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

2.2.5.1. Effet du pH

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

2.2.5.2. Effet des enzymes digestives

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

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

Cette méthode est utilisée pour calculer le nombre des espèces intestinales (indicatrices) après l'interaction. Elle est réalisée selon Haines et Harmon, (1973) par l'inoculation d'un bouillon de croissance (TSB) avec une souche intestinale dont le nombre des colonies est celui trouvé dans les selles et de la bactérie lactique dont la charge initiale est celle qui résulte de l'étude de la survie des lactocoques à pH 6,5 en présence de la flore intestinale. Après incubation à 37°C, on procède à un dénombrement des bactéries lactiques et de la souche intestinale respectivement sur les milieux appropriés pendant les intervalles de temps : 0 h, 16 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 144 h, 168 h et 198 h.

3. Résultats et discussions

3.1 *Etude de la survie des souches lactiques dans les conditions extrêmes du tube digestif*

D'après les résultats de la survie, nous pouvons conclure qu'à pH 2,5 en absence ou en présence de sels biliaires, les souches lactiques pures ou en association présentent une sensibilité variable. Alors que le pH 4,3 est idéal pour la croissance bactérienne surtout en absence de sels biliaires (figure 1).

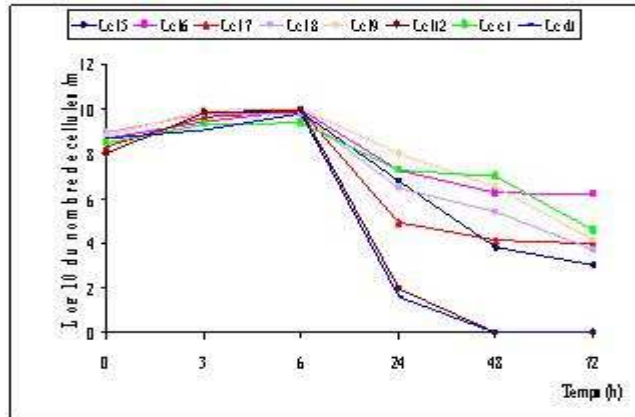


Figure 1 : Evolution de quelques souches de *Lactococcus lactis* à pH 4,3 en absence de 0,3 % de sels biliaries.

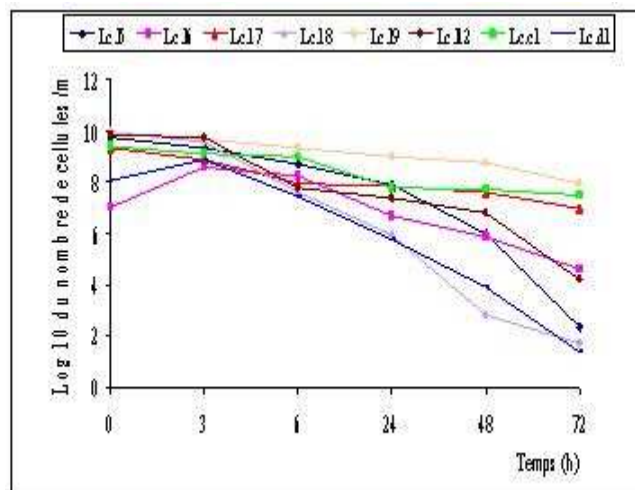


Figure 2 : Evolution de quelques souches de *Lactococcus lactis* à pH 6,5 en présence de 3 % de sels biliaries.

Lorsque 3% de la flore intestinale est additionnée au bouillon de croissance à pH 6,5, le nombre de cellules bactériennes diminue d'une manière non significative (figure 2).

La résistance des lactocoques aux variations du pH est due à leur matériel génétique et à leur capacité à produire une réponse adaptative au stress acide comme le montre Kim et Dunn, (1999) ; Even et al.,(2002). Malgré que les lactocoques aient la capacité de produire des substances antagonistes (acides lactiques et bactériocines) vis-à-vis des espèces de la flore intestinale (Vinod Kumar et al., 2006), ils sont incapables de s'implanter durablement dans le colon parce que les bactéries de la flore autochtone limitent l'adhésion, la persistance et le développement des souches lactiques au niveau intestinal.

L'étude statistique des résultats qui repose sur l'analyse de la variance paramétrique (ANOVA paramétrique) à l'aide de logiciel XLStat (version 5.7). 2007 avec un seuil de signification $\alpha = 0,05\%$ et une moyenne critique de 7 nous a permis de classer les souches testées en deux groupes : Le premier groupe est celui des sous espèces non extrémophiles Tandis que le deuxième est celui des extrémophiles et il est représenté par les souches pures : Lc.13, Lc.15, Lc.17, Lc.19, Lc.111, Lc.112, Lc.113, Lc.d1, Lc.d3, Lc.d4, Lc.c1, Lc.c2, Lc.c3 et les associations

lc.13 lc.c1 lc.d1 (A1) - lc.15 lc.c1 lc.d4 (A2) - lc.19 lc.c2 lc.d2 (A3) - lc.19 lc.c3 lc.d1 (A4) - lc.111 lc.c3 lc.d3 (A5) - lc.113 lc.c1 lc.d2 (A6) et lc.113 lc.c2 lc.d1 (A7).

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

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

3.2.1. *Vis-à-vis des espèces Gram négatif (E. coli et Bacteroides ssp.)*

D'après les résultats obtenus, il en ressort que la plupart des souches pures de Lactococcus lactis ssp. lactis sont à l'origine de zones d'inhibitions importantes contre E. coli (figure 3) et Bacteroides ssp. (figure 4) où les diamètres varient entre 10 et 30 mm. Par contre, la sous espèce cremoris et le biovar diacetylactis n'ont pas d'effet inhibiteur important et les diamètres d'inhibition n'ont pas dépassé 7 mm.

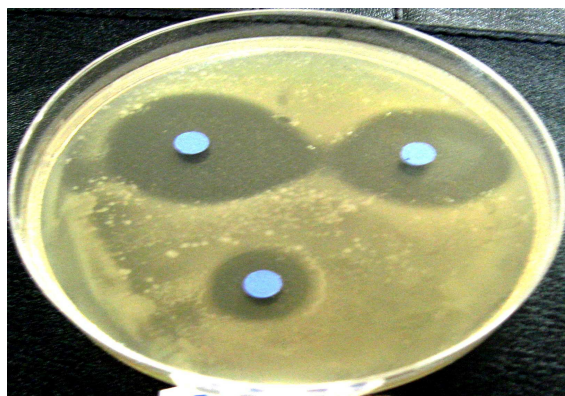


Figure 3: *Activité inhibitrice de Lc .l3, Lc .l9 et Lc .l13 sur E. coli.*



Figure 4 : *Activité inhibitrice de Lc .l9, Lc .d1 et Lc .c3 sur Bacteroides sp.*

Alors que parmi sept associations testées, trois uniquement ont révélé une activité antagoniste remarquable et sont représentées par A1, A3 et A4.

3.2.2. Vis-à-vis des espèces Gram positif (*Enterococcus sp.* et *Clostridium sp.*)

Le diamètre des zones d'inhibition vis-à-vis d' *Enterococcus sp.* est plus important que celui trouvé envers *E. coli*. A titre d'exemples les souches *Lc.l₃*, *Lc.l₇*, *Lc.l₉*, *Lc.l₁₁*, *Lc.l₁₂* et *Lc.l₁₃* ont donné des diamètres d'inhibition qui varient entre 25 et 37 mm (figure 5). De même certaines sous espèces de *cremoris* et *diacetylactis* ont montré une inhibition importante. Les associations A3 et A4 ont provoqué une très bonne inhibition de l'espèce *Enterococcus sp.* avec des diamètres de 20,2 et 30 mm respectivement alors que les autres n'ont révélé qu'une faible inhibition ($Z_i < 6$ mm) comme l'association A1.

Les espèces lactiques pures ont provoqué une inhibition importante de *Clostridium sp.* où les diamètres des zones oscille entre 29 et 32 mm pour les sous espèces *lactis*, 15 et 0 pour les sous espèces de *cremoris* et *diacetylactis* (figures 6) mais nous avons détecté que les associations testées ont donné des diamètres qui varient de 25 mm à 0,00 mm.



Figure 5 : Activité inhibitrice de *Lc.l₉*, *Lc.l₁₂* et *Lc.l₁₃* sur *Enterococcus sp.*

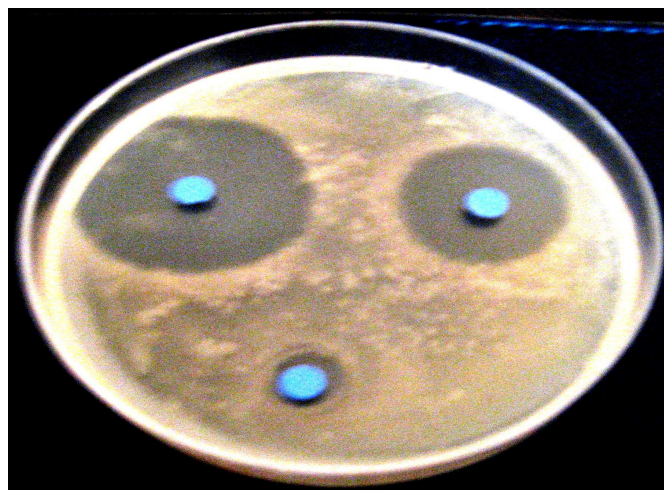


Figure 6 : Activité inhibitrice de *Lc.l₉*, *Lc.d₁* et *Lc.c₃* sur *Clostridium sp.*

3.2.3. Vis-à-vis de *Bifidobacteries* et *Lactobacillus*

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

Les treize souches lactiques pures testées présentent une activité antagoniste très importante vis-à-vis des espèces Gram positif, importante vis-à-vis des espèces Gram négatif de la flore intestinale humaine tandis qu'aucun effet n'a été observé sur *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus*, à cause de la capacité de ces deux dernières espèces à produire des substances antagonistes vis-à-vis de *Lactococcus lactis*. Ces substances sont des bactériocines dont le spectre d'action touche des espèces taxinomiquement proches d'eux (Garnaux et al., 2002). Nous avons remarqué aussi que la sous espèce *lactis* est plus active que *cremoris* et *diacetylactis*, et que les associations bactériennes n'ont pas montré une action importante vis-à-vis des espèces intestinales à l'exception de A4, ceci est dû à l'effet antagoniste entre les souches de la même combinaison. Van Belkum et al. (1992) assurent que les souches de *Lactococcus lactis ssp. cremoris* ont la capacité de synthétiser des substances actives contre *Lactococcus lactis ssp. cremoris* et *diacetylactis* et même contre d'autres bactéries lactiques. La différence dans l'activité inhibitrice entre les souches d'une même espèce est due à une faible homologie de leurs acides nucléiques responsables des caractères héréditaires (Sutra et al., 1998).

3.3. Localisation des substances inhibitrices

A partir des meilleures zones d'inhibition, nous avons sélectionné sept souches pures de *Lactococcus lactis ssp. lactis* (*Lc .l₃*, *Lc .l₅*, *Lc .l₇*, *Lc .l₉*, *Lc .l₁₁*, *Lc .l₁₂* et *Lc .l₁₃*), une de biovar *diacetylactis* (*Lc .d₁*) et l'association A4 pour localiser la ou les substance (s) responsable (s) de l'interaction.

Les diamètres des zones d'inhibition trouvées lors de l'interaction des souches cibles avec les culots bactériens sont pratiquement nuls, ce qui confirme que les fractions cellulaires ne présentent aucun effet sur la croissance des souches cibles, par contre, les fractions extracellulaires (surnageants) présentent un fort pouvoir antibactériens contre *Enterococcus sp.*, *Clostridium sp.*, *Bacteroides sp.* et *E. coli*. Plusieurs études actuelles montrent que les fractions bactériennes cellulaires n'ont aucun effet sur la croissance des souches cibles, par contre la fraction extracellulaire contient des substances responsables de cette interaction (Achemchem et Abrini, 1997 ; Labioui et al. 2005). Les lactocoques sont capables de produire deux substances majeures (acide lactique et bactériocines) responsables de l'effet antagoniste vis-à-vis des espèces intestinales.

3. 4. Effet de l'acide lactique

Après élimination de l'effet des substances protéiques (bactériocines et autres) ; l'activité de l'acide lactique sur les espèces intestinales, étudiée par la méthode de diffusion sur gel, se traduit par l'apparition de zones d'inhibitions dont les diamètres sont négligeables voire nuls dans la plupart des cas. Les lactocoques produisent majoritairement de l'acide lactique L (+) (Duwat et al., 2001), alors que plusieurs études ont montré que l'effet antagoniste de l'acide lactique est provoqué par l'acide L (-) ou D (+). Dans ce cadre, les travaux de Sutra et al. (1998) confirment que l'inhibition des bactéries pathogènes ne dépend pas de la quantité d'acide lactique produite par les bactéries lactiques, mais elle est liée au type (L (-), D (+) ou les deux) et à la forme dissociée ou non de l'acide lactique.

3.5. Effet des bactériocines

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

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

Effectivement, Thauhaul et al. (1991) ; Jack (1995) ; Onda et al. (2003) confirment que les bactéries gram positif sont plus sensibles à l'effet bactéricide ou bactériostatique des bactéries lactiques où les bactériocines produites par ces dernières agissent sur les bactéries gram positif en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires. Les résultats auxquels nous sommes parvenus vont dans le même sens que ceux trouvés par Vinod Kumar et al. (2006) qui ont isolé du radis, une souche de *Lactococcus lactis* qui possède une activité antimicrobienne contre plusieurs espèces Gram négatif.

3.6. Etude de l'influence des barrières physiologiques du tube digestif sur l'action des substances inhibitrices

Les barrières physiologiques qui peuvent influencer l'action des bactériocines sont représentées principalement par le pH et les enzymes digestives protéolytiques. Afin d'étudier l'action de ces dernières sur l'activité des bactériocines dans le tube digestif, nous avons sélectionné la souche Lc.19 qui a donné des zones d'inhibitions maximales dans tous les cas.

3.6.1. Action du pH

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

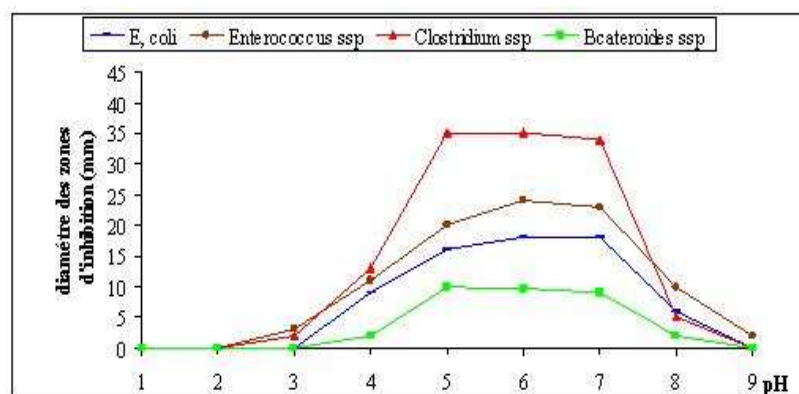


Figure 7: Effet du pH sur l'activité inhibitrice des bactériocines produites par la souche Lc.19 vis-à-vis des espèces intestinales sensibles.

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

3.6.2. Action des enzymes digestives

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

Ce résultat confirme celui de Achemchem et Abrini, (1997) qui ont trouvé, sur 100 isolats de bactéries lactiques 31 ont une activité inhibitrice sensible au moins à l'une des trois enzymes digestives (trypsine, chymotrypsine et pepsine A). A partir de cette étude, nous pouvons conclure que les substances responsables de l'intériorisation sont des bactériocines et l'intestin est un milieu favorable pour leur production et leur fonctionnement, mais cette production est en stricte relation avec la présence des souches lactiques au niveau colique, ce qui renforce l'obligation de sélectionner des souches extrêmophiles qui peuvent survivre dans le tube digestif et exprimer leur activités.

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

Le nombre de Lactobacillus et Bifidobacterium a connu une augmentation de deux unités logarithmiques soit 102 cellules/ml après 144 h d'incubation, le nombre de bactéries reste important même après la disparition de l'espèce lactique. Au contraire, une diminution remarquable de la charge bactérienne de Clostridium sp., Enterococcus sp., E. coli et Bacteroides sp. a été observée après 6 jours de contact avec les lactocoques. Les charges des espèces intestinales reviennent aux valeurs initiales après 7 jours d'incubation, ce qui confirme que la substance produite par Lc.19 a exercé un effet transitoire sur les espèces intestinales (figure 8).

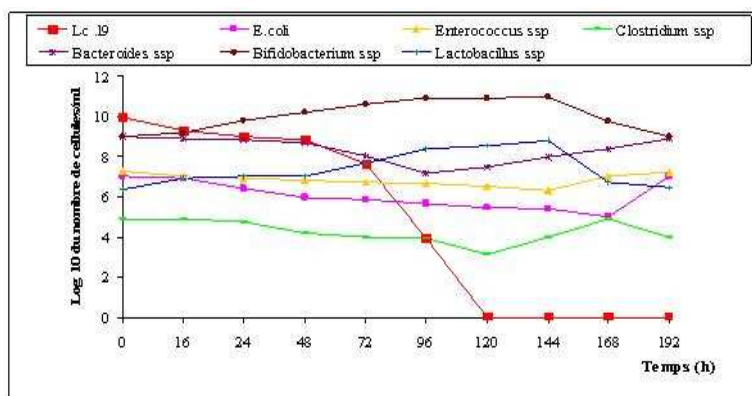


Figure 8: Evaluation du nombre des espèces intestinales et de la souche Lc.19 après 192 h d'incubation

Par ailleurs, Bernbom et al. (2005) ont étudié l'influence de Lactococcus lactis sur les espèces de la flore intestinale chez des rats xénobiotiques (colonisés par des espèces intestinales d'origine humaine). Les résultats trouvés montrent une augmentation significative du nombre de Bifidobacterium et Lactobacillus dans les selles des rats et une diminution du nombre d'Enterocoques dans l'iléon, le caecum et le colon dans une période de 8 jours a été observée. A partir de cette étude, il ressort que les bactériocines produites par les lactocoques sont capables de modifier la répartition des espèces intestinales dans le colon même en absence de la souche productrice. Donc l'adhésion et la persistance de cette dernière pendant une lente durée dans le colon n'est pas obligatoire pour que les bactériocines exercent leurs effets.

4. Conclusion :

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

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

- Les espèces de *Lactococcus lactis* en général et de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* spécialement ont révélé une activité inhibitrice très importante à l'égard des espèces intestinales Gram positif (*Clostridium* sp et *Enterococcus* sp), importante vis-à-vis des Gram négatif (*E. coli* et *Bacteroides* sp.), alors que cette activité est négligeable vis-à-vis de *Bifidobacterium* sp. et *Lactobacillus* sp. les substances responsables de l'activité inhibitrice se localisent dans les fractions extracellulaires ;
- Un pH compris entre 5 et 7 semblerait optimum pour le fonctionnement des bactériocines (le pH intestinale = 6,5). Les enzymes protéolytiques (pepsine A, trypsine et chymotrypsine) ont altéré complètement l'activité antagoniste des bactériocines;
- la substance produite par *Lc.l9* a exercé un effet transitoire sur les espèces intestinales. Les résultats obtenus montrent que les espèces de *Lactococcus lactis* survivent en harmonie avec les espèces banales de la flore intestinale tandis qu'elles limitent, de façon transitoire, la propagation des souches qui peuvent toucher la santé de l'homme (spécialement : *Clostridium* sp. et *Bacteroides* sp.). Cette présence transitoire a deux corollaires : d'une part, les effets ne sont durables et observables que lors de consommation prolongées de bactéries lactiques. D'autre part, le consommateur reste libre d'avoir ou non des lactocoques dans son tube digestif et cela pour le laps de temps qu'il désire.

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

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

Références bibliographiques

Achemchem F. et Abrini J., (1997). Production de bactériocines par des bactéries lactiques à partir du jben de chèvre du Nord du Maroc. *Journal of Applied Microbiology*, 70: 660-669.

Amrouche L., (2003). Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par des Streptocoques lactiques mésophiles (Lactocoques) isolés localement. *Mémoire de magister*, Université INA, Elherrache, Alger. PP : 1-59.

Bernbom N., Rask Licht T., Brogren C. H., Birthe J., Johansen Anette., badiola I., Vogensen K. et Norrung B., (2005). Effects of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota : Role of Nisin. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (1) : 239-244.

Dilmi Bouras A., (2002) .Survie de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* et leur action sur la métabolisme du cholestérol. *Thèse de doctorat d'état*, INA, El Harrach, Alger.

Collins Y. F., MC Sweeney P. L. H. et Wilkinson M. G., (2003). Evidence of a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 70: 105-113.

Duwat P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet G., Vido K., Gaudu P., LE Loir Y., Violet F., Loubiere P. et Gruss A., (2001). Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *Journal of Bacteriology*, 183(15): 4509-4516.

Even S., Lindley U. D., Loubiere P., cocaign-bousquet., (2002). Dynamic reponse of catabolic pathway of autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation of metabolic and energetic constraints. *Mol. Microbiol.* 45: 1143-1152.

Garnau S., Martis N. et Vederas J. C., (2002). Two peptides bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84: 577-592.

Gomes A. M., Malcata Y. F. et Claver F. A. (1998). Growth enhancement of bifidobacterium . *Journal of Dairy Science*. 81:1817-2825.

Haines W. C. et Harmon L. G., (1973). Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Journal of Applied Microbiology*, 25: 436-441.

Kim W. S. et Dunn N. W., (1999). Differentiation of *Lactococcus lactis subsp lactis* and *subsp cremoris* strains by their adaptative reponse to stress. *FEMS Microbiology Letter*, 171: 57-65.

Labioui H., Laroussi E., EL Yachioui M. et Ouhssine M., (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin Soc Pharm. Bourdeaux*, 144 : 237-250.

Lin H. C., SU B. H., Chen A. C., Lin T. W., Tsai C. H., Yeh T. F. et Oh W., (2005). Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birthweight infants. *Pediatrics*, 115: 1-4.

Nehal F., (2006). Isolement et caractérisation de souches de *Lactococcus lactis* à partir de différents laits dans le périmètre du moyen Cheliff. *Mémoire de magister*. Université de Chlef : 99p.

Onda T., Yanagida F., Tsuji M., Shinohara T. et Yokotsuka K. (2003). Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. *International Journal of Food and Microbiology*.87(1-2): 153-159.

Song H. J. et Richard J. (1997). Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *International Journal of Food Microbiology*, 36(2), 155-161.

Sutra L., Federighi M. et Jouve J. L., (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Ed : *POLYTECHNICA*, Paris, 308(6) : 31-249.

Tadesse G., Ephraim E. et Ashenafi M., (2004). Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from borde of Shamita, traditional Ethiopian fermented beverage, on some food borne pathogens and effect of growth medium in the inhibitory activity. *Food Safety*, 5: 13-20.

Van Belkum M. J., Kok J. et Venema G., (1992). The bacteriocin lactococcin A specifically increases the permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *Journal of bacteriology*, 173: 7934-7941.

Vinod Kumar J., Somesh S. et Neerja S., (2006). Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables. *Food technology and Biotechnology*, 44 (3): 435- 439.