

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

Ag: Antigène

Al(OH)₃: Hydroxyde d'aluminium

α -Lac: Alpha-lactalbumine

APLV: Allergie aux protéines du lait de vache

ARN: Acide ribonucléique

ATCC: American Type Culture Collection

BET: bromure d'éthidium

β -Lg: Beta-lactoglobuline

BHI: Brain Heart Infusion (Infusion de coeur et de cervelle)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

dNTP: désoxyribonucléoside 5'-triphosphate

DO: densité optique

°C: degré Celsius

°D: degré Dornic

EDTA: éthylène diamine tétra acétique

EFSA: European Food Safety Authority

ELISA: Enzyme linked Immuno Sorbent Assay

FAO: Food and Agriculture Organization

G: Conductance

G+C: Guanine + Cytosine

H: heure

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

Isc: Intensity of short circuit (Courant de court circuit)

KDa: Kilo Dalton

M: mole par litre

MCA: Milk Citrate Agar

μ g: microgramme

μ l: microlitre

mg: milligramme

ml: millilitre

mM: millimole par litre

MI7: Milieu complexe à base d'extrait de viande, de peptone et d'extrait de levure.

MRS: Man Rogosa and Sharpe
MyD88: Myeloid Differentiation Protein 88
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NH2: extrémité amino-terminale
OPD: OrthoPhénylène Diamine
PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis
pb: paire de bases
PCR: Polymerase Chain Reaction
pH: potentiel d'hydrogène
PMSF: Phenylmethanesulphonylfluoride
RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA
SDS: Sodium Dodecyl Sulphate
ssp.: sous-espèce
Taq: de *Thermus aquaticus*
TEMED: N, N, N', N'-tétraméthyl éthylène diamine
Th: Helper T cells
TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha
Tris: Tris-hydroxyméthylaminométhane
UFC: Unité formant colonie
UHT: Ultra Haute Température
UV: Ultra Violet
v / v: rapport volume à volume
WAO: World Allergy Organisation
WHO: World Health Organisation

Sommaire

Introduction.....	01
Rappel bibliographique	
1. Allergie alimentaire.....	03
1.1 Allergie aux protéines du lait de vache	03
1.2 Les allergènes du lait de vache.....	04
1.1.1 La β-lactoglobuline.....	04
1.2 L'α-lactalbumine.....	06
1.3 Mécanismes des allergies alimentaires.....	06
2. Lait de chèvre.....	09
3. Les probiotiques.....	10
3.1 Critères de sélection des souches probiotiques.....	12
3.2 Bactéries lactiques.....	14
3.2.1 Lactobacilles.....	15
3.2.2 Entérocoques.....	15
4. Critères de sélection des ferments lactiques.....	16
4.1 Critères de sécurité.....	16
4.2 Aptitudes technologiques.....	16
4.2.1 Aptitude acidifiante.....	16
4.2.2 Aptitude protéolytique.....	17
4.2.3 Activité antimicrobienne.....	18
5. Les bactériocines.....	18
5.1 Classification des bactériocines	18
5.1.1 Bactériocine classe I.....	20
5.1.2 Bactériocine de classe II.....	20
5.1.3 Bactériocine de classe III.....	22

5.1.4 Bactériocine de classe IV.....	22
6. Probiotiques et mécanisme de l'immunité.....	22
6.1 Le rôle de la microflore intestinale.....	24
7. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé.....	25
8. Prévention.....	26
8.1 Eviction de l'allergène.....	26
8.2 La prévention des maladies atopiques et allergiques.....	26
Matériels et Méthodes	
1. Echantillons.....	28
2. Isolement et purification des souches de bactéries lactiques.....	28
3. Identification phénotypique des souches.....	28
3.1 Tests Biochimiques.....	28
4. Identification moléculaire (identification phénotypique).....	30
4.1 PCR spécifique du genre <i>Enterococcus</i>	30
4.2 Amplification et séquençage de l'ADNr 16S.....	30
4.3 RAPD: <i>RandomAmplifiedPolymorphic ADN</i>	31
5. Profil fermentaire des bactéries.....	31
5.1 Mesure de la production d'acide lactique.....	31
5.2 Mesure de la cinétique de variation du pH.....	32
5.3 Cinétique de croissance des bactéries.....	32
6. Caractérisation biochimique des laits fermentés.....	32
6.1 Mise en évidence de l'activité protéolytique des bactéries lactiques.....	32
6.1.1 Dosage des fonctions α -NH ₂ libérées.....	32
6.1.2 Test sur milieu MRS lait.....	33
6.1.3 Test sur milieu lait écrémé UHT.....	33
6.1.4 Activité protéolytique sur le caséinate de sodium et le lactosérum dénaturé.....	34

6.2	Facteurs influençant l'activité protéolytique.....	34
6.2.1	Effet du pH.....	34
6.2.2	Effet de la température.....	34
6.2.3	Effet des inhibiteurs.....	36
7.	Etude de l'activité antibactérienne.....	36
7.1	Les souches utilisées.....	36
7.2	Méthode de diffusion en puits pour la détection de l'activité antibactérienne.....	36
7.3	Facteurs influant l'activité antimicrobienne.....	36
7.3.1	Effet des enzymes.....	36
7.3.2	Effet du pH.....	37
7.3.3	Effet de la température.....	37
8.	Spectre d'activité antibactérienne vis-à-vis deux souches indicatrices.....	37
9.	Caractérisation des entérocinés par PCR.....	37
10.	Test d'activité contre les bactéries pathogènes.....	38
11.	Mise en évidence <i>in vitro</i> de quelques propriétés probiotiques.....	40
11.1	Résistance aux conditions gastro-intestinales simulées.....	40
11.2	Test d'hémolyse.....	40
11.3	Tests de sensibilité aux antibiotiques.....	40
11.4	Détection des facteurs de virulence.....	41
12.	Etude de la modulation de la réponse allergénique chez les souris Balb/c.....	42
12.1	Echantillons.....	42
12.2	Animaux.....	42
12.3	Immunsation des souris.....	44
12.3.1	Répartition des animaux.....	44
12.4	Adjuvant.....	45
12.4.1	Hydroxyde d'aluminium.....	45

12.5	Protocole d'immunisation.....	45
12.6	Prélèvement sanguin.....	45
12.7	Dénombrement des bactéries lactiques au niveau de l'intestin et des selles des souris.....	45
12.8	Dosage des immunoglobulines sériques.....	45
12.8.1	Evaluation du degré de sensibilisation des animaux.....	45
12.8.1.1	Principe général de la méthode ELISA.....	45
12.8.1.2	Mode opératoire.....	46
12.9	Test de provocation ex vivo (intestin isolé) en Chambre de Ussing.....	47
12.9.1	Principe de la technique.....	47
12.9.2	Montage de l'intestin de souris en chambre de Ussing.....	49
12.10	Etude histologique.....	51
12.10.1	La fixation.....	51
12.10.2	Inclusion à la paraffine.....	51
12.10.3	La déshydratation.....	51
12.10.4	Imprégnation par la paraffine.....	51
12.10.5	Microtomisation et étalement des coupes.....	53
12.10.6	Coloration.....	53
12.10.6.1	Déparaffinage.....	53
12.10.6.2	Réhydratation.....	53
12.10.6.3	Coloration à l'hémalun-éosine.....	53
12.10.7	Mesure de la hauteur villositaire.....	54
14.	Méthodes statistiques.....	54
Résultats		
1.	Souche bactériennes.....	55
1.1	Isolement et purification des souches de bactéries lactiques.....	55
1.1.1	Identification phénotypique des souches.....	55

1.1.1.1 Tests Biochimiques.....	55
1.1.1.2 Profil fermentaire.....	55
1.1.2 Identification moléculaire (identification phénotypique).....	57
1.1.2.1 PCR du gène spécifique codant pour le genre <i>Enterococcus</i>	57
1.1.2.2 Identification par PCR 16S.....	57
1.1.2.3 Random Amplified Polymorphic ADN (RAPD).....	57
1.2 Profil fermentaire des bactéries.....	60
1.2.1 Mesure de la production d'acide lactique.....	60
1.2.2 Mesure de la cinétique de variation du pH.....	60
1.2.3 Cinétique de croissance des bactéries.....	60
2.1 Caractérisation biochimique des laits fermentés.....	63
2.1.1 Mise en évidence de l'activité protéolytique des bactéries lactiques.....	63
2.1.1.1 Dosage des fonctions α -NH ₂ libérées (DOI et <i>al.</i> , 1981).....	63
2.1.1.2 Etude de l'activité protéolytique.....	66
2.1.1.2.1 Test sur milieu lait écrémé UHT.....	66
2.1.1.2.2 Activité protéolytique sur le caséinate de sodium et le lactosérum dénaturé....	66
2.1.1.2.3 Facteurs influençant l'activité protéolytique.....	66
2.2. Etude de l'activité antibactérienne.....	73
2.2.1. Méthode de diffusion en puits pour la détection de l'activité antibactérienne.....	73
2.2.1.1. Action des enzymes digestives.....	73
2.2.1.2. Effet de la température	73
2.2.1.3. Effet du pH.....	76
2.2.2. Spectre d'activité antibactérienne vis-à-vis deux souches indicatrices.....	76
2.2.3. Le spectre d'activité antimicrobienne de différentes souches testées vis-à-vis des bactéries pathogènes.....	76
2.2.4. Caractérisation des entérocinés par PCR.....	76
2.3. Mise en évidence <i>in vitro</i> de quelques propriétés probiotiques.....	82

2.3.1. Résistance aux conditions gastro-intestinales simulées.....	82
2.3.1.1. Test de résistance des bactéries lactiques à pH acide.....	82
2.3.1.2. Résistance aux sels biliaires.....	82
2.3.2. Test d'hémolyse.....	85
2.3.3. Résistance aux antibiotiques.....	85
2.3.4. Gène de virulence.....	85
3. Etude de la modulation de la réponse allergénique chez les souris Balb/c.....	88
3.1. Titres sériques en anticorps anti β -Lg et anti α -Lac.....	88
3.1.1. Titre des anticorps IgG sériques anti β -Lg et anti α -Lac.....	88
3.1.2. Titre des anticorps IgE sériques anti β -Lg.....	88
3.1.3. Titre des anticorps IgG1 sériques anti β -Lg.....	93
3.1.4. Titre des anticorps IgG2a sériques anti β -Lg.....	93
3.1.5. Analyse de la réponse immune des souris à partir du rapport IgG1/IgG2a.....	93
3.2. Dénombrement des bactéries lactiques au niveau du chyme intestinal et des selles souris.....	93
3.3. Test de provocation <i>ex vivo</i> en Chambre de Ussing.....	100
3.3.1. Effets de β -Lg sur l'Isc.....	103
3.3.2. Effet de l'ovalbumine sur l'Isc.....	103
3.3.3. Effets de la β -Lg sur la conductance.....	103
3.3.4. Effet du furosémide.....	107
3.4. Histologie de la muqueuse intestinale des souris expérimentales.....	107
3.4.1. Aspect des muqueuses intestinales des souris	107
3.4.2. Effet des bactéries lactiques sur la hauteur des villosités intestinales.....	109
Discussion.....	116
Conclusion.....	130
Références bibliographiques.....	132

Introduction

L'homéostasie intestinale repose sur l'équilibre et la communication entre le microbiote et le système immunitaire associé à la muqueuse. Lorsque cet équilibre est perturbé, la dérégulation du système immunitaire entraîne un certain nombre de troubles, notamment l'apparition d'allergie et de maladies inflammatoires chroniques intestinales (Grangette, 2011; West et *al.*, 2015).

A l'heure actuelle, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) classe les maladies allergiques au quatrième rang des maladies chroniques mondiales (International classification of disease (ICD)). En Algérie, une étude menée sur 995 nourrissons a montré que l'incidence de l'allergie aux protéines du lait de vache (APLV) IgE-médiée est de 1,1%. Elle est 4-fois plus élevée chez les enfants atopiques par rapport aux non atopiques. (Ibsaine et *al.*, 2013).

L'APLV correspond à un dysfonctionnement du processus physiologique de la tolérance orale digestive aux protéines du lait de vache. Elle est caractérisée par une augmentation de la perméabilité intestinale (Troncone et *al.*, 1994).

La recherche de nouvelles pistes de prévention ou de thérapie a mis en évidence un intérêt potentiel de souches probiotiques vis-à-vis des pathologies digestives (Moayyedi et *al.*, 2010; Zatorski et Fichna, 2014). Parmi les microorganismes utilisés en tant que probiotique, les bactéries lactiques et notamment ceux qui appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* (Holzapfel, 2001). Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie laitière pour leur pouvoir acidifiant, leurs activités protéolytiques, antimicrobiennes (Chekroun et *al.*, 2011; Biscola et *al.*, 2013, Hwanhlem et *al.*, 2015), ainsi que pour leurs propriétés de développement du goût, d'arômes et de texture (Chen et *al.*, 2013; Sawa et *al.*, 2013).

Certains essais visant l'étude de l'impact des probiotiques dans le traitement des allergies alimentaires ont suggéré que les mécanismes d'action conduisent à une amélioration de l'intégrité de la barrière intestinale (Grangette, 2011). De plus, ils peuvent moduler les réponses immunitaires aux antigènes alimentaires au cours des processus de l'inflammation allergique à plusieurs niveaux (Plé et *al.*, 2015).

Dans ce travail nous nous sommes intéressés dans un premier temps par l'évaluation des propriétés technologiques des bactéries lactiques autochtones isolées à partir du lait de chèvre, en étudiant leur activité protéolytique et antimicrobienne. Dans un second temps, nous

avons étudié l'effet préventif de ces bactéries sur la réponse allergénique induite par les principales protéines du lactosérum bovin chez la souris Balb/c.

Rappel bibliographique

1. Allergie alimentaire

L'allergie alimentaire qui apparait le plus précocement est l'allergie aux protéines de lait de vache (APLV), puisque l'alimentation initiale est essentiellement lactée. Le lait de vache est responsable de 16% des allergies alimentaires de l'enfant, ce qui le place parmi les allergènes les plus fréquents avec l'œuf et l'arachide (Lemerdy *et al.*, 2003).

Les allergies alimentaires représentent un problème de santé publique. En Algérie, une étude menée sur 995 nourrissons a montré que l'incidence de l'allergie aux protéines du lait de vache IgE-médiée est de 1,1%. Elle est 4-fois plus élevée chez les enfants atopiques par rapport aux non atopiques (Ibsaine *et al.*, 2013).

1.1. Allergie aux protéines du lait de vache

L'allergie aux protéines du lait de vache est fréquente et touche 2 à 3 % des nourrissons (De Boissieu, 2013). Elle résulte d'une réaction immunologique à une ou plusieurs protéines du lait de vache. Cette réaction immunitaire distingue l'APLV à d'autres réactions d'intolérance telle que l'intolérance au lactose. L'APLV peut-être associé à l'immunoglobuline E (IgE) ou non.

Bahna (2002), explique la différence entre APLV et l'intolérance au lait de vache. L'APLV est une réaction immunologique aux protéines de lait de vache (PLV) qui peut impliquer le tube digestif, la peau, l'appareil respiratoire ou plusieurs systèmes. Elle peut entraîner une morbidité sévère et parfois un décès. L'éviction alimentaire de l'antigène est associée à un bon pronostic.

Les symptômes apparaissent souvent durant les premiers mois de vie, dans les premiers jours ou semaines suivant la prise de lait artificiel et même lors de l'allaitement.

Malheureusement, il n'y a pas de symptômes spécifiques à l'APLV, ce qui rend le diagnostic difficile. De nombreux enfants présentent des symptômes dans différents organes: l'appareil digestif (50-60%), la peau (50-60%) et l'appareil respiratoire (20-30%) (Høst, 2002; Vandenplas *et al.*, 2007).

Il faut noter également que suivant les pays, et donc les habitudes alimentaires, la fréquence relative d'incrimination des aliments dans l'allergie varie (Rancé et Bidat, 2000).

Il est connu que toutes les protéines de lait sont allergéniques : β -lactoglobuline (18,3 kDa), caséines (de 19 à 23,6 kDa), α -lactalbumine (14,2 kDa) sont des allergènes plus fréquents que la sérumalbumine bovine (68 kDa), la lactoferrine, les gammaglobulines. (Wal, 2011). Chaque protéine allergisante comporte de multiples épitopes séquentiels et conformationnels. Des peptides de 12 à 14 acides aminés rendent compte d'une part importante de l'allergénicité (Heinzmann et *al.*, 1999; Wal, 2001).

1.2 Les allergène du lait de vache

1.1.1. La β -lactoglobuline

La β -lactoglobuline (β -Lg) est la plus abondante des protéines du lactosérum. Elle représente environ 50% de la masse totale des protéines sériques. La séquence primaire de cette protéine comporte 162 acides aminés pour une masse moléculaire de 18400 Da (Verheul et *al.*, 1999).

La structure secondaire de la β -Lg a été étudiée par différentes techniques.

Les données de dispersion optique rotatoire et de dichroïsme circulaire suggèrent que la β -Lg contient 10-15% d'hélice β , 43% de feuillet β 47% de régions désordonnées (Edwards et *al.*, 2002).

Les structures tertiaires des variants génétiques A et B de la β -Lg sont semblables (Fig. 1). En fait, les substitutions des résidus Gly64 et Ala118 dans le variant B par Asp64 et Val118 dans le variant A se trouvent respectivement sur une boucle extérieure mobile et dans la cavité hydrophobe de la molécule (Qin et *al.*, 1999; Sawyer & Kontopidis, 2000). Cette structure tertiaire lui confère une bonne résistance à l'hydrolyse acide et à la pepsine gastrique (Reddy et *al.*, 1988 ; Asselin et *al.*, 1989). La β -Lg est alors adsorbée au niveau de l'intestin à l'état natif ou légèrement hydrolysée, ce qui explique, en partie, sa forte allergénicité (Schmidt et *al.*, 1995).

Malgré l'abondance des travaux réalisés pour comprendre le rôle de la β -Lg, sa fonction physiologique n'est pas complètement élucidée. Toutefois, sa structure similaire à celle des lipocalines, pourrait lui conférer un rôle de transport. Il est connu que la β -Lg peut lier une variété de ligands hydrophobes, mais aussi des composés légèrement polaires et des cations (Zsila et *al.*, 2002; Zsila, 2003; Dufour, 2004).

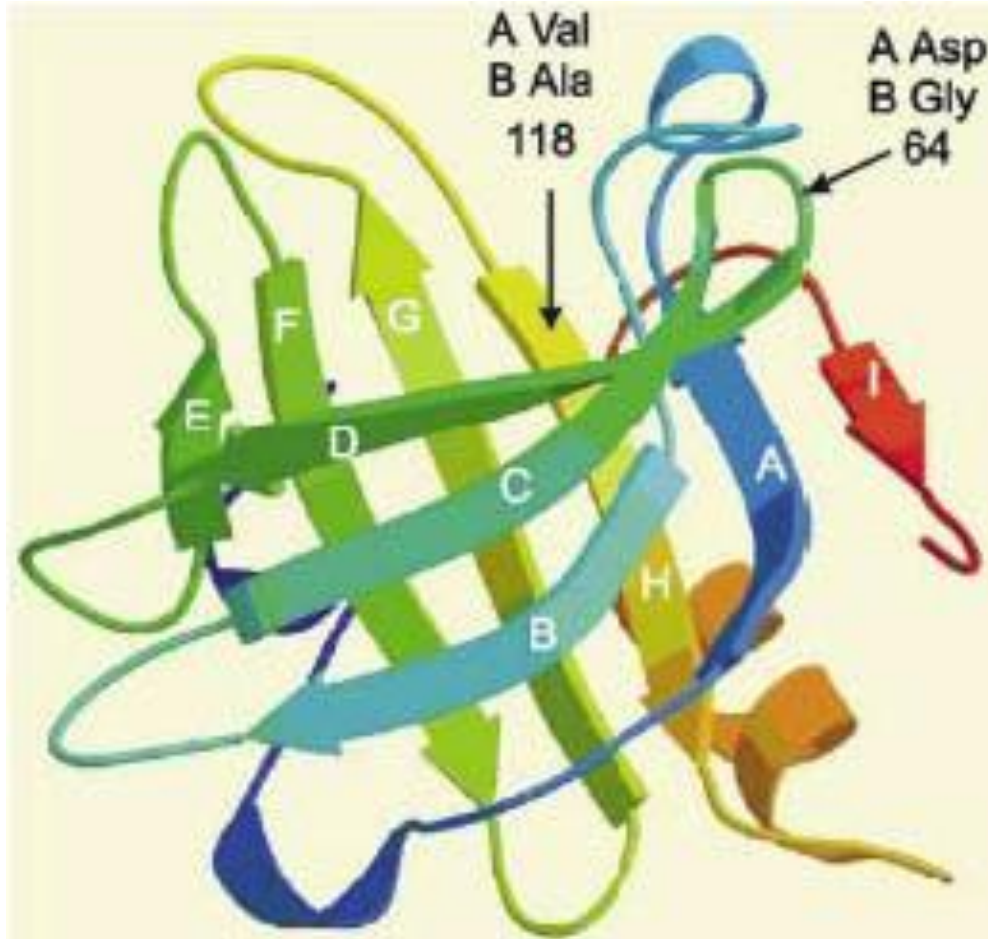


Figure 1 : Position des acides aminés substitués dans les variants A et B de la β -Lg (Botelho et *al.*, 2000).

1.2 L' α -lactalbumine

L' α -lactalbumine (α -Lac) (Fig. 2) ; petite molécule de 14200 Da est une métalloprotéine constituée de 123 acides aminés et 4 ponts disulfures intra moléculaires possédant un atome de calcium par mole (Alais et *al.*, 2003).

Elle possède un site de liaison spécifique de haute affinité au Ca²⁺, permettant d'assurer la stabilité de la structure native de la protéine. L' α -lactalbumine est hydrolysée par des enzymes digestives. Les peptides libérés sont de petite taille et peuvent être absorbés par la muqueuse intestinale (Jouan, 2002).

1.3 Mécanismes des allergies alimentaires

Comme dans toutes les réponses d'hypersensibilité, il existe deux phases immunologiques dans l'hypersensibilité immédiate. Une première phase de sensibilisation conduit à la synthèse des IgE spécifiques. Elle est cliniquement sans symptôme. La deuxième phase, dite « de révélation » (déclenchement), est cliniquement symptomatique, liée à l'activation immédiate par l'allergène des cellules (principalement mastocytes et basophiles) porteuses des IgE à leur surface (Fig. 3).

Les allergies alimentaires du jeune enfant pourraient résulter d'une double anomalie : d'une part suite à l'activation de la réponse immune de type Th2 qui est liée non seulement au terrain atopique, mais aussi à des facteurs environnementaux, comme une diversification alimentaire trop précoce (Lehmann et *al.*, 2001 ; Lehman et *al.*, 2002), ou à l'exposition aux allergènes alimentaires par contact cutané ou par inhalation (Calder et *al.*, 2006; Strid et *al.*, 2005). D'autre part, chez les enfant nés par césarienne des mères atopiques, l'absence d'installation de la tolérance primaire est liée à un écosystème bactérien intestinal modifié par l'absence de stimulations bactériennes ou par le déficit en flore lactique (Calder et *al.*, 2006 ; Eggesbo et *al.*, 2003 ; Laubereau et *al.*, 2004).

Si la réponse de type Th2 est bien documentée dans les allergies alimentaires au lait ou à l'arachide (Laan et *al.*, 1998 ; Schade 2000), on admet actuellement que l'anomalie primaire est un défaut de régulation des populations lymphocytaires effectrices, plutôt qu'un déséquilibre de balance Th1/Th2. Ce défaut de régulation est dû à une déficience des T régulateurs. En effet, on constate bien un déficit en TGF- β , tant au niveau du RNAm que de l'expression de la protéine, dans l'épithélium comme

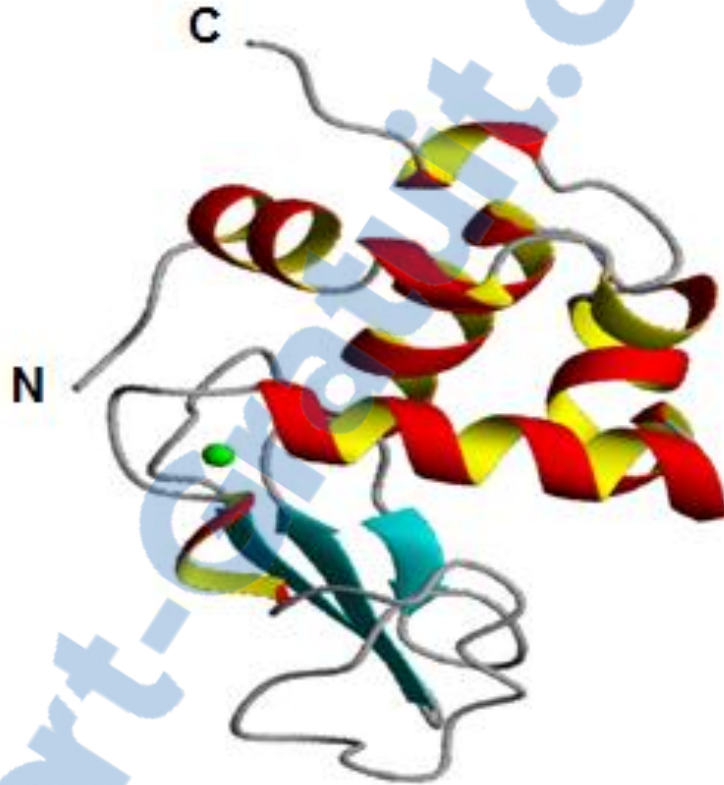


Figure 2 : Structure 3-D de l' α -lactalbumine (D'après Wal, 2011)

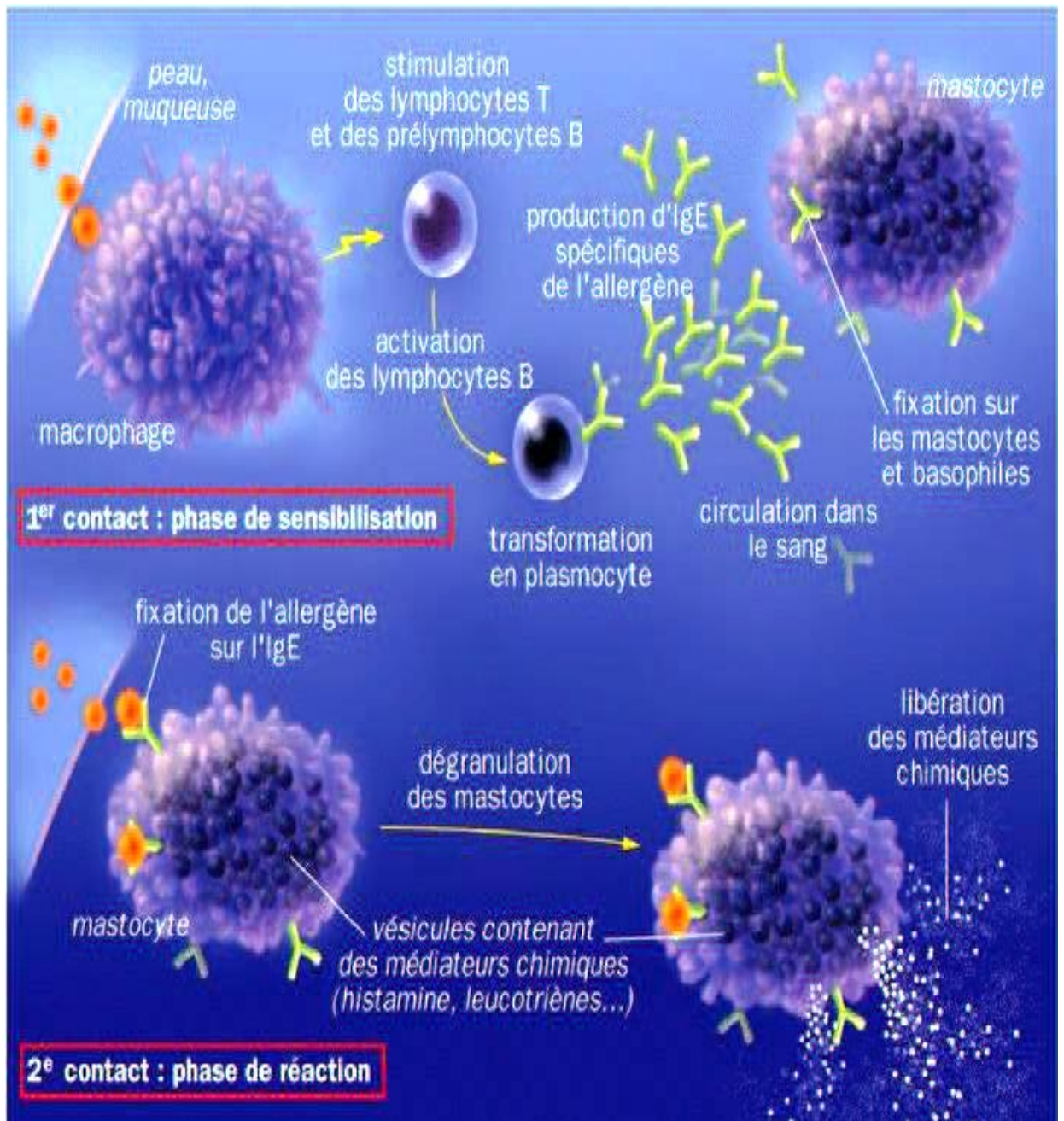


Figure 3: Représentation schématique du mécanisme de l'allergie, l'hypersensibilité de type I (Witt-Deguillaume, 2008).

dans la lamina propria d'enfants souffrant d'allergies alimentaires multiples (IgE-dépendantes et non IgE-dépendantes), et se caractérisant par la fréquence d'une œsophagite et/ou d'une entéropathie (Perez-Machado et *al.*, 2003). Ces phénomènes sont également observés chez des enfants présentant une entérocolite d'hypersensibilité aux protéines alimentaires (Chung et *al.*, 2002).

De même, dans l'APLV à forme digestive (gastroentérites à éosinophiles et entéropathies d'hypersensibilité), on met en évidence dans la muqueuse duodénale, un profil cytokinique Th2 et une déficience de sécrétion de TGF- β . L'importance du rôle des T régulateurs est attestée par le syndrome de déficience immunitaire. Ce syndrome est lié à un déficit génétique en facteur de transcription des T régulateurs, Fox p3. Il s'accompagne d'un syndrome sévère des allergies alimentaires multiples (Torgerson et *al.*, 2007).

Au niveau de la muqueuse intestinale, un type particulier de cellules dendritiques, métabolisant la vitamine A, synthétise de l'acide rétinoïque qui oriente les T CD4⁺ vers une synthèse de Fox p3⁺, les transformant ainsi en T régulateurs synthétisant TGF- β . Ces T régulateurs sont porteurs de récepteurs de homing intestinal (Mucida et *al.*, 2007 ; Sun et *al.*, 2007).

2 Lait de chèvre

En Algérie, il existe quatre races de population caprine : la race Arabia, la race Makatia, la naine de Kabylie et la chèvre de M'Zab, auxquelles s'ajoute les races Alpine et Saanen (Feliachi, 2003). Ces caprins se trouvent plus dans les zones montagneuses, steppiques et le sud saharien que dans les zones littorales où l'espèce est faiblement présente (Badis et *al.*, 2005)

L'usage du lait de chèvre est répandu dans le monde entier et les zones de production y sont largement dispersées. Selon la FAO (2006) l'Algérie est classée en 15^{ème} place dans la production mondiale de lait de chèvre. Aujourd'hui, le lait de chèvre est d'un intérêt particulier en raison de sa composition spécifique, ce qui a conduit à le considérer comme une matière première de haute qualité pour la fabrication d'aliments pour les nourrissons et les personnes âgées. Il est souvent recommandé aux nourrissons et aux adultes souffrant d'allergie et d'ulcère (Mereado, 1982, Haenlein, 2004, Kumar et *al.*, 2012, Abbas et *al.*, 2014)

Le stade de lactation, souvent indissociable de la saison, voire du mode d'alimentation, influe sur la composition minérale du lait. Cela a été démontré pour le lait de chèvre (Dias et *al.*, 1994, Amroun-Laga & Zerrouki, 2011).

Le lait de chèvre est une source importante d'énergie, apportant de l'ordre de 700 kcal/L. Les protéines du lait de chèvre sont proches à celles du lait de vache. Le lait de chèvre contient de nombreux minéraux et vitamines à des concentrations satisfaisantes pour couvrir certains besoins journaliers (Desjeux, 1993).

Comme le lait de vache les protéines du lait de chèvre sont représentées majoritairement par les caséines (80%) (Mahe et *al.*, 1993) et le reste est représenté par les protéines du lactosérum. En moyenne, le lait de chèvre renferme 26 g/l de caséines, 4,4 g/l de β -lactoglobuline et 2 g/l de α -lactalbumine (FAO, 2006). En Algérie, comparativement au lait de vache, le lait de chèvre est moins riche en lactose, en matières grasses et en protéines (Tab.1) (Roudj et *al.*, 2005).

Les genres *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus* sont les plus fréquemment rencontrés dans les laits crus et les levains mésophiles indigènes obtenus après fermentation des laits crus de chèvre (Dalmasso, 2008). (Tab.2)

3 Les probiotiques

Les principaux effets prouvés des probiotiques sont la stimulation du système immunitaire, la prévention et la réduction des intensités des épisodes diarrhéiques, ainsi que la réduction de l'intolérance au lactose. Les lactobacilles ont également d'autres effets bénéfiques moins bien étudiés comme la synthèse de vitamines B, l'amélioration de l'absorption de nutriments, la dégradation de facteurs antinutritionnels, la modulation de la physiologie du système digestif, et récemment la diminution de la perception de la douleur (Turpin et *al.*, 2010).

Ces capacités peuvent donc être bénéfiques pour la santé et peuvent participer à la protection contre de nombreuses pathologies. Les probiotiques sont définis comme " tout micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est administré en quantité adéquate, exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte" (Roberfroid, 1998; Verdú et *al.*, 2006).

Tableau 1 : Paramètres physico-chimiques du lait de vache et de chèvre (Roudj et *al.*, 2005)

Paramètres	Lait de vache	Lait de chèvre
Densité	1,036	1,022
Acidité (°Dornic)	13,5	8,5
Matière grasse (g/l)	16	10
Protéines (g/l)	34,05	20,85
Lactose (g/l)	52,5	31,5

Tableau 2: Biodiversité spécifique des bactéries lactiques dans du lait de chèvre d'après : Badis et *al.*, 2004 ; Callon et *al.*, 2007.

Lait de chèvre	Espèces
	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> , <i>Lactococcus garviae</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus durans</i> <i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus Paraplantarum</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

D'après Ouwehand et *al.*, (2001), il existe certaines conditions pour la sélection de nouvelles souches probiotiques : (i) ces bactéries doivent être sans danger pour l'hôte, c.-à-d. qu'ils ne sont ni pathogènes, ni toxiques, (ii) être résistantes au passage des voies gastriques, à l'acidité, aux enzymes pancréatiques et aux sels biliaires (iii) avoir de bonnes propriétés technologiques, de sorte qu'elles puissent être cultivées à grande échelle, avoir une durée de conservation prolongée et en cas d'utilisation dans les produits fermentés, contribuer à l'amélioration du goût. (iv) être capables d'adhérer aux muqueuses intestinales afin d'exercer leurs effets immunomodulateur, participer à l'exclusion de pathogènes ou encore, améliorer la guérison de la muqueuse.

Toutefois, d'autres propriétés sont prises en considération pour la sélection des meilleurs candidats au rôle de probiotique. Récemment, il a été montré que les probiotiques ont des effets bénéfiques dans des modèles d'inflammation neuronale et douleur (Verdú et *al.*, 2004; Kamiya et *al.*, 2006).

Des études récentes montrent que la supplémentation des probiotiques dans l'alimentation pourrait exercer un large éventail d'effet bénéfique sur l'homme par rapport aux symptômes et la durée des infections (Rao et *al.*, 2009 ; Oelschlaeger, 2010). Les probiotiques ont un rôle protecteur dans le tractus intestinal où ils exercent des effets directs antimicrobiens qui vont favoriser l'antagonisme vis-à-vis des pathogènes et indirectement par l'amélioration des fonctions de la barrière intestinale (Ng et *al.*, 2009).

En outre, les probiotiques ont la capacité de moduler le système immunitaire muqueux local et systémiques de l'hôte (Hörmannsperger et Haller, 2010), mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore bien connus (Quigley, 2008).

Parmi les microorganismes utilisés en tant que probiotique, les plus communément mis en œuvre appartiennent au groupe hétérogène des bactéries lactiques et notamment aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* (Holzapfel, 2001).

3.1 Critères de sélection des souches probiotiques

De part sa définition, pour qu'un microorganisme soit reconnu comme probiotique, il faut que son effet bénéfique chez l'Homme, et sa capacité à survivre au transit intestinal soient démontrés (FAO/WHO, 2002; EFSA, 2010) (Fig. 4).

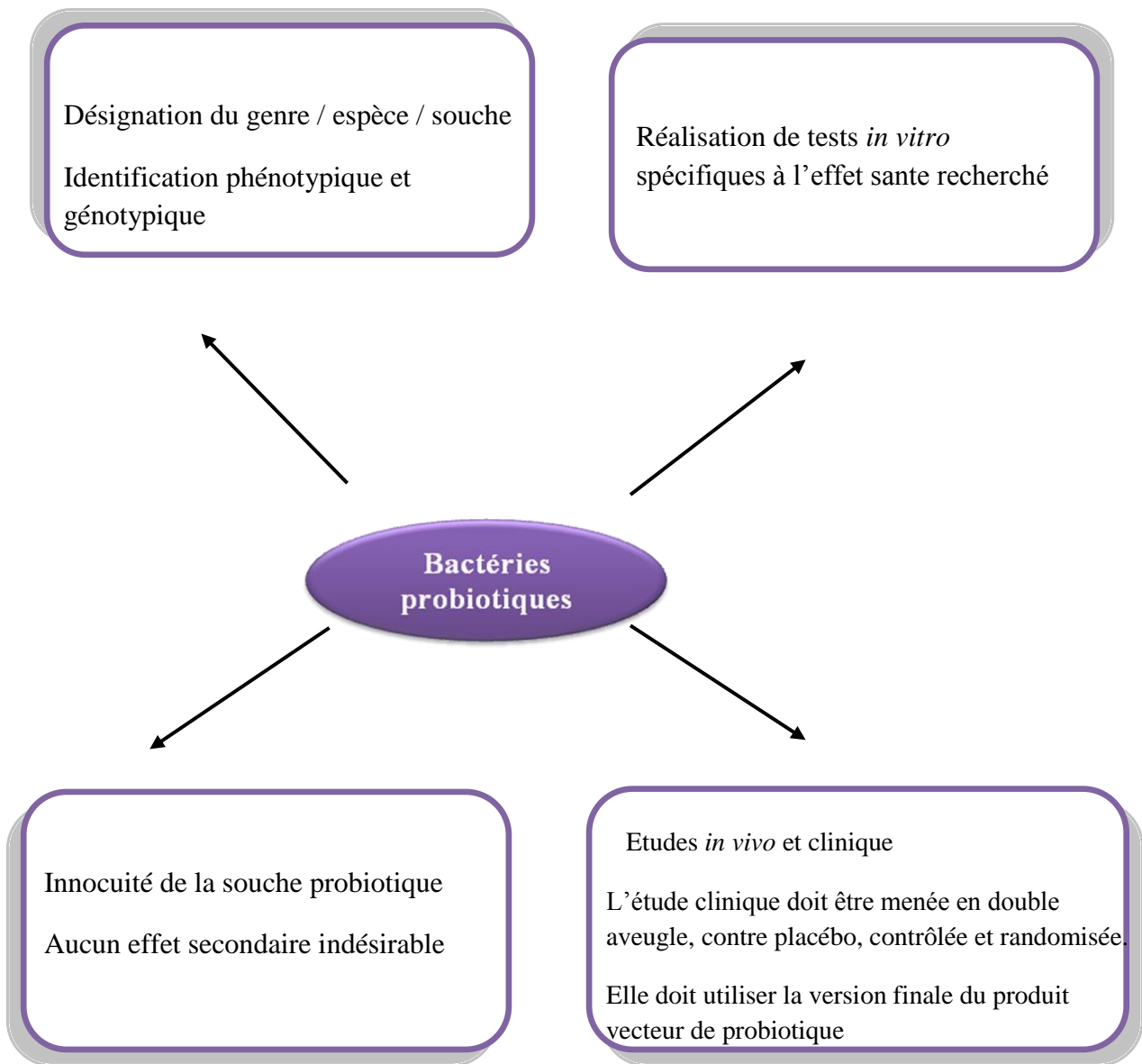


Figure 4 : Recommandation pour l'évaluation d'un probiotique dans le cadre d'une utilisation alimentaire. D'après (FAO/WHO, 2002).

Ainsi, pour garantir leur survie pendant le passage du tractus digestif, les probiotiques sont premièrement criblés pour leur tolérance au pH acide et à la bile. L'adhésion des bactéries probiotiques aux tractus digestif leur permet de produire durablement des molécules bénéfiques pour l'hôte, mais permet également l'exclusion des pathogènes et une immunostimulation (Servin, 2004). C'est pourquoi cette capacité est très recherchée chez les probiotiques (Kravtsov et *al.*, 2008).

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Le choix des probiotiques dépend de ces propriétés et du type d'utilisation.

3.2. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont des micro-organismes non sporulés à Gram positif, sous forme de Cocci, bacille ou coccobacilles et qui fermentent les glucides en produisant de l'énergie et de l'acide lactique (Jay, 2000). Elles se développent généralement dans des conditions anaérobies, voire anaérobies facultatives, et jouent un rôle majeur dans l'acidification du lait et du caillé.

Les bactéries lactiques les plus fréquemment utilisées sont les suivantes: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Melissococcus*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium* et *Tetragenococcus*. Les genres *Aerococcus*, *Propionibacterium*, *Microbacterium* et *Bifidobacterium* sont généralement moins utilisés (Carr et *al.*, 2002). Les bactéries lactiques représentent le pourcentage le plus élevé de bactéries qui ont des propriétés des probiotiques (Metchnikoff, 1908 ; Collins et *al.*, 1998 ; Schrezenmeir et de Vrese, 2001). Parmi les composés produits par des bactéries lactiques au cours de la fermentation lactique on trouve les acides organiques, le diacétyl, le peroxyde d'hydrogène et des bactériocines ou des protéines bactéricides (Dortu et Thonart, 2009).

Elles sont utilisées pour la conservation de nombreux aliments, et sont présentes naturellement dans le tube digestif de l'homme et des animaux (Tredez, 2008). De même, elles sont utilisées dans la fermentation des aliments pour leurs propriétés de développement du goût, d'arômes et de texture (Chen et *al.*, 2013, Sawa et *al.*, 2013).

3.2.1. Lactobacille

Le genre *Lactobacillus* est très hétérogène (le G+C varie de 33 % à 55%). Il contient 140 espèces et 27 sous-espèces, mais sa classification évolue régulièrement. Les lactobacilles se présentent sous forme de bacilles Gram positif, isolés ou en chaînettes, non sporulés et immobiles. Ces bactéries peuvent se développer à des températures basses ou extrêmes comprises entre 2 et 50°C, avec un optimum compris entre 30 et 40°C. Ils ont un métabolisme strictement fermentaire (homo ou hétérofermentaire), aérotolérant ou anaérobies et acidophiles, avec un optimum de pH entre 5,5 et 6,2 (Kandler et Weiss, 1986). De plus ces microorganismes sont auxotrophes avec de fortes exigences en facteurs de croissance tels que des glucides, des acides aminés, des dérivés d'acides nucléiques, des sels et des vitamines (Morishita *et al.*, 1981).

Les lactobacilles ont également d'autres effets bénéfiques moins bien étudiés comme la synthèse de vitamines B, l'amélioration de l'absorption de nutriments, la dégradation de facteurs antinutritionnels, la modulation de la physiologie du système digestif, et récemment la diminution de la perception de la douleur (Turpin *et al.*, 2010). Ces capacités peuvent donc être bénéfiques pour la santé et peuvent participer à la protection contre de nombreuses pathologies.

3.2.2 Entérocoques

Le genre *Enterococcus* est formé d'espèces dont les contenus en G+C sont voisins (37,5 à 44%). Par contre, si l'on se réfère aux taux d'hybridation ADN-ADN, elles apparaissent génétiquement différentes les unes des autres. Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif qui se présentent sous forme de coques en courtes chaînes. Ils ont la capacité de croître à une température entre 10 et 45° C, à un pH alcalin de 9,6, dans une solution contenant 6,5 % de NaCl (CEAEQ, 2000; Facklam *et al.*, 1999; Hancock et Gilmore, 2000); ces caractéristiques sont utilisées pour leur identification. (Clausen *et al.*, 1977; APHA-AWWA-WEF, 2012).

Les entérocoques sont des bactéries lactiques utilisées depuis des siècles dans la transformation des aliments. Ces micro-organismes jouent un rôle essentiel dans la conservation (prolongation du temps de stockage) et dans la qualité bactériologique des aliments, tout en respectant leurs propriétés nutritionnelles et organoleptiques. (Ana Aguilar-Galvez *et al.*, 2012)

Les entérocoques sont présents dans les laits et dans de nombreux fromages traditionnels du bassin méditerranéen (Cogan et *al.*, 1997). Ce sont des hôtes normaux des intestins des animaux à sang chaud, mais également des plantes et des insectes (Deibel, 1964 ; Dellaglio et *al.*, 1994). Dans les systèmes digestifs de l'homme et d'autres monogastriques, ils exercent une activité probiotique. Certaines souches peuvent cependant présenter des facteurs de virulence leur conférant un pouvoir pathogène (Dellaglio et *al.*, 1994). *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* et dans une moindre mesure *Enterococcus durans* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées dans les laits et les fromages (Gelsomino et *al.*, 2001 ; Jurkovic et *al.*, 2006; Ogier et Serror, 2008).

4 Critères de sélection des ferments lactiques

La sélection des ferments lactiques s'appuie sur de nombreux critères afin de répondre à la fois aux spécificités demandées par l'utilisateur et aux contraintes imposées par le producteur. Ces critères relèvent éventuellement des fonctionnalités technologiques des souches, de leur performance et de leur sécurité. Ils diffèrent selon le type de produit désiré, les caractéristiques des matières premières à transformer et la technologie appliquée (Béal et *al.*, 2008) .

4.1. Critères de sécurité

Les bactéries susceptibles d'être produites et utilisées comme ferments lactiques ne doivent évidemment pas présenter de caractère pathogène et ne pas générer de substances toxiques. C'est le cas de la plupart des espèces de bactéries lactiques, qui possèdent le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) à l'exception de certains entérocoques (Ammor et *al.*, 2006 ; Monnet et *al.*, 2008).

4.2 Aptitudes technologiques

4.2.1 Aptitude acidifiante

Dans l'industrie, les principales voies permettant d'agir sur les profils d'acidification sont le choix des ferments, les doses d'ensemencement et les profils de température (Dacosta, 2000).

Les bactéries lactiques, lors de leur croissance, hydrolysent le lactose du lait grâce à la bêta-galactosidase pour produire le glucose et le galactose. Généralement,

le glucose provenant de cette hydrolyse sera fermenté pour produire des composés acides, du gaz carbonique ou de l'alcool (Monnet et *al.*, 2008). Cette production de composés acides va entraîner une baisse de pH. Cette dernière peut induire des odeurs et des goûts particuliers, mais aussi une coagulation du lait (Béal et *al.*, 2008). L'acidification est un bon indice pour évaluer la qualité microbiologique et le respect de la chaîne de froid du lait cru. En outre, l'acidification limite les risques de développement de flores pathogène (Payne et *al.*, 1999 ; Rouissat et Bensoltane, 2006).

4.2.2. Aptitude protéolytique

La protéolyse joue un rôle clé dans plusieurs processus biologiques chez les bactéries lactiques. Ces bactéries possèdent des protéases et peptidases qui interviennent dans la dégradation des protéines du lait en peptides et acides aminés. Cette protéolyse engendre la production des substances responsables de la saveurs et de la texture des produits fermentés (Hughes et *al.*, 2002 ; Papamanoli et *al.*, 2003).

Les bactéries lactiques possèdent un système protéolytique composé i) de protéases extracellulaires capables de dégrader les caséines, ii) d'un ensemble de systèmes de transport pour des acides aminés et des peptides, iii) d'une série de peptidases intracellulaires nécessaires à la dégradation de peptides et de ceux dérivés des caséines (Hols et *al.*, 2005, van de Guchte et *al.*, 2006).

Gilbert et *al.*, 1996 et Fernandez-Espla et *al.*, 2000, ont montré que les protéases de la paroi de *S. thermophilus*, PrtS, *L. bulgaricus*, PrtB sont des protéines appartenant à la sous-famille de protéases à serine de la famille des subtilisines. Cinq types différents de protéase de bactéries lactiques sont caractérisées : prtP de *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus paracasei*, prtH de *Lactobacillus helveticus*, prtR de *Lactobacillus rhamnosus*, prtS de *Streptococcus thermophilus*, et prtB de *Lactobacillus bulgaricus* (Savijoki et *al.*, 2006).

Chez les bactéries lactiques, trois modes de transport différents sont impliqués dans la translocation des acides aminés (Konings et al, 1994): Le transport dépendant des liaisons phosphates énergétiques qui permet le transport unidirectionnel et l'accumulation intracellulaire des acides aminés, le transport mû par la force proton-motrice qui permet le transport simultané des acides aminés et de H⁺, l'antiport

assurant l'entrée d'un acide aminé précurseur, couplée à la sortie d'un produit de ce précurseur.

Les peptidases chez les bactéries lactiques peuvent être classées en exopeptidases ou endopeptidases. Il existe un nombre limité d'endo- et aminopeptidases qui ont été caractérisées chez *Streptococcus thermophilus* (PepA, PepC, PepN, PepO, PepS et PepX) (Chapot-Chartier et al., 1994, Rul et al., 1994, Rul et al., 1997, Tsakalidou et al., 1997, Chavagnat et al., 2000). Chez *L. bulgaricus*, PepC, PepN, PepX, PepIP, PepQ et PepV (Atlan et al., 1989, Atlan et al., 1990, Atlan et al., 1994, Gilbert et al., 1994, Morel et al., 1999, Rantanen et al., 1997, Wohlrab et al., 1992, Wohlrab et al., 1994) ont été caractérisées.

4.2.3 Activité antimicrobienne

Les bactéries lactiques possèdent des atouts technologiques remarquables pour la bioconservation des aliments, grâce à la production d'une grande variété de substances antimicrobiennes qui inhibent la croissance des microorganismes pathogènes. Parmi les facteurs responsables de cette inhibition, la production des acides organiques, la diminution du pH et la production des bactériocines. De nombreuses souches bactériennes productrices de bactériocines sont actuellement utilisées dans les produits alimentaires fermentés (O'Sullivan et al., 2006 ; Gálvez et al., 2008).

5 Les bactériocines

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988).

5.1. Classification des bactériocines

Le genre *Enterococcus* produit une grande variété de bactériocines, dénommées entérocinés (Tab. 3) incluant les entérocinés A, B et P, les quelles

Tableau 3: Bactériocines produites par *Enterococcus* spp. (adapté de Tomita et al., 1997 ; De Kwaadsteniet et al., 2005 ; Yamashita et al., 2011).

Bactériocine	Souche productrice	Origine	Taille (Da)
Entérocinés A et B	<i>E. faecium</i> P21	Chorizo	-----
Entérociné AJ97	<i>E. faecalis</i> S-47	-----	-----
Sans nom	<i>E. faecium</i> A2000	Fromage	-----
Entérociné CRL35	<i>E. faecium</i> CRL35	Fromage	3500
Bactériocine N15	<i>E. faecium</i> N15	Riz de son Nuka	3000-5000
Entérocinés A et B	<i>E. faecium</i> WHE81	Fromage	4833 et 5462
Sans nom	<i>E. faecium</i> RZS C5; <i>E. faecium</i> DPC 1146	-----	-----
AS-48	<i>E. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> S-48	Tractus intestinal porcin	-----
Entérociné 012	<i>E. gallinarum</i>	Duodénum d'autruche	3400
Sans nom	<i>E. faecium</i> CRL1385	Poulet libre de ferme	-----
Entérociné P	<i>E. faecium</i> P13	Saucisson sec fermenté	-----
Entérocinés 1071A et 1071B	<i>E. faecalis</i> BFE 1071	Fèces de porcs miniatures	4285 et 3899
Mundticine ATO6	<i>E. mundtii</i> ATO6	Légumes	4287
Mundticine KS	<i>E. mundtii</i> NFRI 7393	Ensilage de graminées	4290
Bactériocine 51	<i>E. faecium</i> VRE38	Humain (clinique)	-----
Cytolysine	<i>E. faecalis</i> DS16; <i>E.</i> <i>faecium</i> 228	Humain (clinique)	-----
Bactériocine 21	<i>E. faecalis</i> 39-5	Humain (clinique)	-----
Bactériocine 31	<i>E. faecalis</i> Y1717	Humain (clinique)	4730
Bactériocine 32	<i>E. faecium</i> VRE200	Humain (clinique)	5940
Bactériocine 43	<i>E. faecium</i> VRE82	Humain (clinique)	4840

sont actives contre les espèces *Listeria*, *Clostridium* et *Staphylococcus aureus* (Campos et al., 2006)

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993). Cette classification divise les bactériocines en quatre grandes classes : les lantibiotiques, les peptides non modifiés, les protéines de haut poids moléculaire et les peptides cycliques. (Figure5)

5.1.1 Bactériocine classe I

Les lantibiotiques sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, comme la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types : la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (McAuliffe et al., 2001; Twomey et al., 2002). Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticin 3147.

5.1.2. Bactériocine de classe II

Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10. Les séquences de quelques bactériocines appartenant à cette classe se trouvent au tableau 1. Cette classe est divisée en trois sous-classes.

Les bactériocines de la sous-classe IIa contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Fimland et al., 2000 ; Richard et al., 2006). Elles ont toutes une activité contre la *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminal qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (Eijsink et al., 1998 ; Fimland et al., 2000 ; Drider et al., 2006 ; Richard et al., 2006).

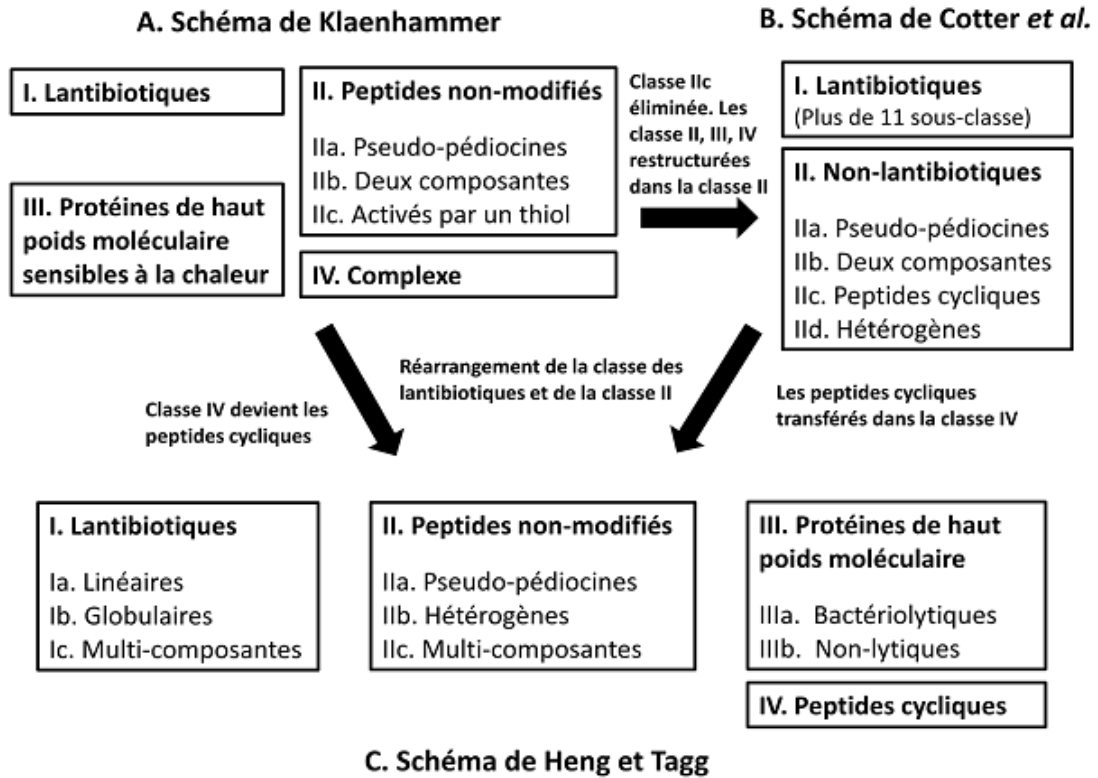


Figure 5: Classification universelle des bactériocines proposée par Heng et Tagg (C) basée sur la classification des LAB par Klaenhammer (A) et la classification de Cotter *et al.* (B). Figure traduite à partir du schéma de classification de Heng et Tagg (2006).

La sous-classe IIb comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués: le type E (Enhancing) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (Synergy) où les deux peptides sont complémentaires.

La sous-classe IIc contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes.

5.1.3. Bactériocine de classe III

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

5.1.4. Bactériocine de classe IV

Les bactériocines de cette classe sont des peptides cycliques synthétisés par voie ribosomale. Cette appellation est liée au fait que ces peptides sont modifiés post-traductionnellement, ce qui entraîne la formation d'un lien covalent entre les extrémités N et C-terminales (Heng et al., 2007). Présentement, peu de bactériocines ont été identifiées dans cette classe. L'une des plus étudiées est l'entérocin AS-48 produite par *Enterococcus faecalis*. Cette dernière est une bactériocine qui a une stabilité plutôt élevée due à sa forme cyclique. C'est également ce qui lui permettrait de conserver sa forme active (Maqueda et al., 2004).

6. Probiotiques et mécanisme de l'immunité

La muqueuse intestinale est la première ligne de défense contre les invasions pathogènes et toxiques provenant des aliments. Après ingestion, les antigènes sont en contact avec le GALT (tissu lymphoïde associé à la muqueuse). C'est une organisation extrêmement contrôlée pour protéger l'hôte des pathogènes par stimulation du système immunitaire, ou bien moduler la réponse immune en vue de tolérer les bactéries commensales (Fig.6). Le transport d'antigènes vers les GALT est effectué par des cellules spécialisées, appelées cellule M (Kim et al., 2012).

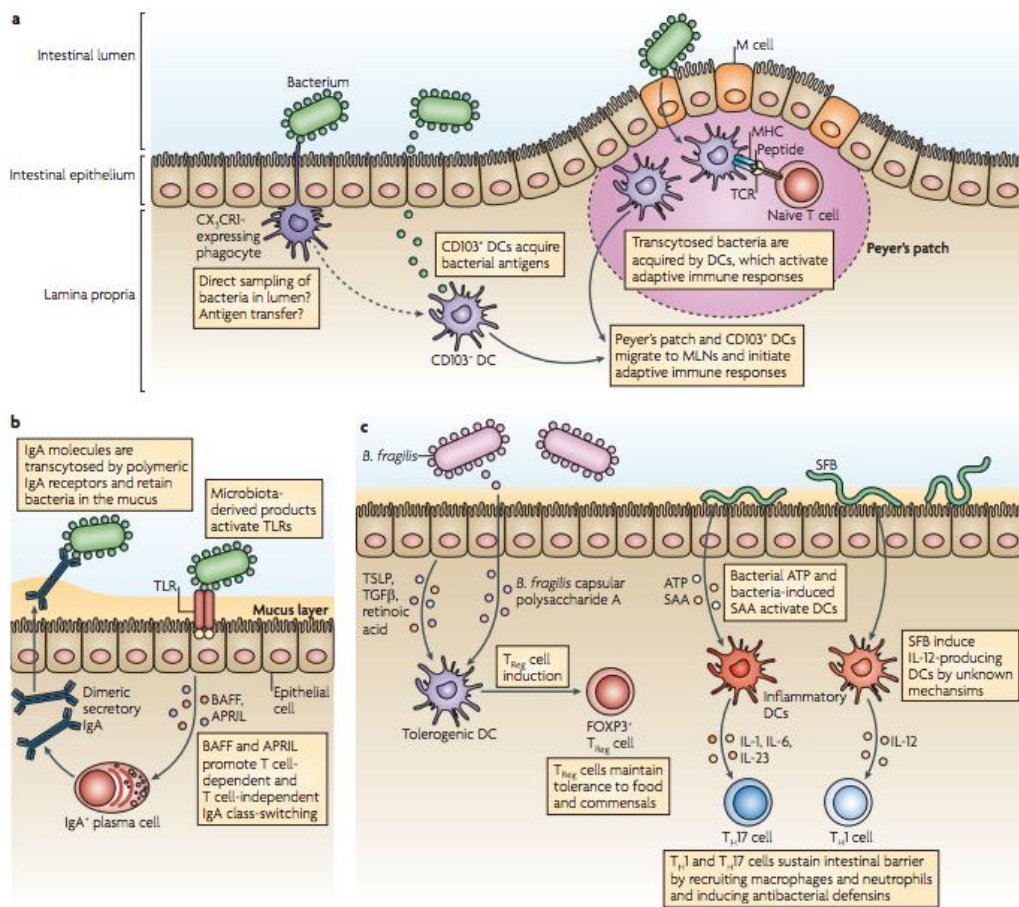


Figure 6: Modulation de la réponse adaptative dans l'intestin par le microbiote

a. La réponse immunitaire adaptative est initiée dans les plaques de Peyer. Les cellules B et T quittent le tissu lymphoïde pour la lamina propria de l'intestin par la voie systémique. Les bactéries peuvent être en contact directement avec les cellules dendritiques qui traversent la paroi épithéliale.

b. Les produits dérivant du microbiote activent les Toll-like receptors (TLR) qui sont exprimés par les cellules épithéliales. La liaison d'un Antigène au TLR va induire une activation des cellules B et T dépendantes et indépendantes de la sécrétion d'IgA. Les cellules plasmatisques vont sécréter des IgA dans la lumière intestinale.

c. Les Cellules Dendritiques (DC) induisent, au contact avec un antigène, FOXP3 et les cellules T régulateurs qui vont réguler la balance Th1/Th2/Th17.

Les cellules M sont des cellules épithéliales dépourvues de microvillosité qui présentent une invagination en poche. Des cellules B, cellules T et macrophages sont localisés dans les plaques de Peyer formant un follicule sous les cellules M. Les Ag transitant à la surface peuvent être transportés au sein des follicules lymphoïdes, induisant la différenciation des bactéries lactiques en plasmocytes. Ces derniers migrent le long de la sous-muqueuse produisant des IgA dans la lumière et induisent une réponse immunitaire de type Th1, Th2, ou Th17 (Medzhitov, 2007). Les Ag peuvent être également endocytés par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dans le but d'induire la réponse immunitaire adaptative.

Les cellules de l'immunité innée, telles que les phagocytes, reconnaissent les bactéries grâce aux « Patterns Recognition Receptor » (PRR). Les PRR regroupent l'ensemble des récepteurs de surface Toll Like Receptor (TLR) et les récepteurs intracellulaires Nod Like Receptor (NOD). L'association d'un PRR à un ligand bactérien va induire l'activation de MyD88, qui activera à son tour la cascade de transduction pour produire des cytokines pro-inflammatoires du type IL-1, IL-6, IL-8 ou encore TNF- α conduisant la réponse immune innée et/ou adaptative (Lee et *al.*, 2007).

Le dialogue entre hôte et microbiote intestinal est régi par un équilibre essentiel. Les médiateurs de cette homéostasie sont les cellules T régulateurs (Treg) qui régissent l'équilibre Th1/Th2/Th17 induisant une tolérance entre microbiote et le système immunitaire (De Moreno de Leblanc et *al.*, 2011). La rupture de cet équilibre par la modification de l'écosystème, par exemple une dysbiose, engendrera des conséquences pour l'hôte telle que l'induction inflammatoire anormale caractéristique des MICI (Kaur et *al.*, 2011).

6.1 Le rôle de la microflore intestinale

L'intestin est un écosystème complexe et dynamique composé de plusieurs espèces bactériennes, incluant des pathogènes potentiels, des bactéries commensales et des bactéries bénéfiques pour la santé de l'hôte. Aujourd'hui, le rôle prépondérant de l'écophysiologie du tube digestif sur la santé humaine est tout à fait reconnu. La microflore s'établissant très vite après la naissance est essentielle pour initier le système immunitaire et contribuer à l'homéostasie et aux fonctions de l'intestin.

L'augmentation récente des pathologies telles que l'allergie et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (observées principalement dans les pays industrialisés) a été attribuée au style de vie moderne, résultant de certaines habitudes alimentaires, médicale ou d'hygiène. Ces habitudes semblent en effet influencer le développement normal et, de ce fait, l'homéostasie du microbiote intestinal, résultant potentiellement de dysfonction des réponses immunitaires (Grangette, 2007).

La microflore intestinale est un écosystème complexe qui soutient la structure et la fonction de la muqueuse intestinale. Les bactéries intestinales contribuent à la fonction de la barrière intestinale en luttant contre les bactéries pathogènes, en accroissant la sécrétion de mucine, en réduisant la perméabilité intestinale et en modulant la fonction immunitaire de l'intestin (Mack *et al.*, 1999; Cebra *et al.*, 1998). Les bactéries du côlon métabolisent les glucides mal absorbés en acides gras à chaîne courte (AGCC). Ils représentent le carburant préféré de l'entérocyte, sans compter qu'ils acidifient le contenu du côlon et accroissent l'absorption de l'eau.

7. Effets bénéfique des probiotiques sur la santé

Il est à noter que la l'explication scientifique de ces effets bénéfiques est très variable. Pour certains effets, des preuves scientifiques irréfutables appuyées par des études cliniques existent et permettent d'attribuer certaines allégations-santé aux produits probiotiques. Pour d'autres, les allégations demeurent encore à un stade hypothétique et des études plus approfondies demeurent nécessaires pour apporter des preuves scientifiques convaincantes à ces allégations.

Cette situation est particulièrement vraie pour les effets des probiotiques sur le système immunitaire et pour lesquels peu de preuves scientifiques et d'études cliniques ont été apportées pour valider ces allégations. Néanmoins, la stimulation du système immunitaire de l'hôte demeure un aspect très important dans le développement du concept probiotique, d'autant plus que certains travaux rapportés dans la littérature suggèrent que certaines souches à fort potentiel probiotique sont capables de stimuler certaines fonctions immunitaires notamment lors d'infections bactériennes ou virales (Shu *et al.* (2000); de Waard *et al.* (2003) ; Lee *et al.* (2004)).

8. Prévention

8.1. Eviction de l'allergène

Kramer & Kakuma, (2006), ont évalué l'effet d'un régime d'éviction de l'antigène (PLV, œuf ou autre) durant la grossesse et l'allaitement sur la prévention ou le traitement des maladies atopiques chez l'enfant. Ils n'ont pas trouvé d'effet protecteur sur l'incidence de l'eczéma durant les 18 premiers mois de vie de l'enfant. Ils concluent qu'une éviction de l'antigène de l'alimentation de la mère durant la grossesse à titre préventif ne réduit probablement pas l'incidence d'une maladie atopique chez l'enfant. Durant la lactation, chez les femmes à haut risque, un régime d'éviction peut réduire le risque de développer une maladie atopique chez l'enfant mais d'autres études sont nécessaires (Kramer & Kakuma, 2006).

L'allaitement maternel représente l'alimentation idéale d'un point de vue immunologique, physiologique et psychologique pour le nouveau-né. D'ailleurs, tous les experts s'accordent sur l'importance de l'allaitement exclusif, c'est-à-dire sans diversification alimentaire concomitante pendant cette période (Turck, 2005). En cas d'allaitement mixte, il est recommandé de privilégier des laits à protéines partiellement hydrolysées dits « HA » pour les enfants à risque (Chandra (1997); Baumgartner *et al.* (1998) ; Von Berg *et al.* (2003)).

8.2 La prévention des maladies atopiques et allergiques

Les maladies atopiques sont souvent liées à des allergies alimentaires, qui sont plus susceptibles de se déclarer en présence d'une altération de la perméabilité intestinale. Les probiotiques réduisent la perméabilité intestinale et l'absorption de grosses molécules. Cet effet préviendrait peut-être l'expression d'une constitution atopique en diminuant l'absorption d'allergènes. On observe une numération des lactobacilles et des bifidobactéries plus faible chez les enfants ayant une dermatite atopique que chez les sujets témoins (Björkstén *et al.*, 2001).

Dans des études sur des enfants atteints d'une dermatite atopique traités à l'aide de lactobacilles, on observait une diminution significative des mesures de perméabilité intestinale, ce qui laisse supposer la possibilité d'atténuer l'atteinte de la fonction de la barrière intestinale chez ces patients, grâce aux probiotiques (Rosenfeldt *et al.*, 2004). De plus, la microflore intestinale interagit avec les tissus

lymphoïdes associés à l'intestin. Les probiotiques pourraient influencer sur l'équilibre entre les réponses Th1 et Th2 et prévenir l'apparition de maladies allergiques.

Les activités immunostimulantes ou immunomodulantes sont très recherchées chez les probiotiques. Celles-ci peuvent être étudiées par l'analyse de paramètres très variés liés à la réponse immunitaire innée ou adaptative de l'hôte. D'une façon générale, les probiotiques améliorent la réponse immunitaire innée mais leurs effets sur la réponse adaptative est souche dépendante (Gourbeyre et *al.*, 2011).

Rapport-Gratuit.com

Matériel et méthodes

1. Echantillons

Dans cette étude, les échantillons du lait de 35 chèvres étaient collectés auprès des différentes fermes de l'ouest algérien : Oran, Mascara, M'sirda, Mostaganem et Sidi Bel Abbas.

La collecte du lait de chèvre a été réalisée selon les règles d'hygiène et d'asepsie recommandées en microbiologie, c'est-à-dire après lavage et rinçage des pis des chèvres à l'eau javellisée suivi d'une élimination des premiers jets de laits. Chaque échantillon est récupéré dans un flacon stérile et transporté au laboratoire dans des sacs isothermes.

2. Isolement et purification des souches de bactéries lactiques

Chaque échantillon a été réparti dans deux flacons qui étaient incubés, l'un à 30°C et l'autre à 45 °C, jusqu'à obtention d'un coagulum.

Une série de dilution décimale dans de l'eau physiologique stérile jusqu'à 10^{-5} est réalisée à partir des échantillons homogénéisés par agitation. Les trois dernières dilutions ont étéensemencées par étalement sur gélose MRS et M17 puis incubées pendant 24 à 48h.

La purification consiste à effectuer des repiquages successifs sur le milieu approprié jusqu'à l'obtention de colonies pures bien distinctes et homogènes.

Dans une première étape, nous avons évalué l'activité catalase ainsi observé au microscope la forme et le Gram de toutes les souches isolées.

3. Identification phénotypique des souches

Soixante et un isolats isolées du lait de chèvre à Gram positif catalase négatif, ont été caractérisées par des tests microbiologiques classiques.

3.1 Tests Biochimiques

-Type fermentaire

Ce test permet de classer les bactéries en homo ou hétéro-fermentaires. Les souches sontensemencées dans des tubes contenant le milieu de culture avec une cloche du Durham pour apprécier la production de CO₂. Après incubation à 37°C pendant 48 heures, la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (Al-Otaibi, 2012).

- **Test de croissance à différentes températures**

Ce test permet de différencier les souches thermophiles des mésophiles. Les souches sont ensemencées dans un milieu liquide puis incubées à 15, 37 et 45 °C entre 24 et 72h (Carr et *al.*, 2002).

- **Test de croissance à pH 9,6 en présence de NaCl à 2, 4, 6.5%**

Ce test permet de distinguer les entérocoques. Les souches ensemencées dans des tubes contenant le M17 à pH 9,6 et dans d'autres tubes contenant le M17 à 2, 4 et 6,5% de NaCl (Zarour et *al.*, 2012 ; Al-Otaibi, 2012). Après incubation, la croissance bactérienne se manifeste par l'apparition d'un trouble dans le milieu.

- **Test de la thermorésistance**

Ce test est spécifique aux coques, il permet de sélectionner les espèces thermorésistantes. Les souches sont ensemencées dans un milieu de culture puis chauffées à 63°C pendant 30 min. Ces souches sont incubées pendant 24h à 48h (Badis et *al.*, 2004).

- **Hydrolyse de l'arginine**

La recherche de l'arginine déshydrogénase (ADH) est étudiée sur milieu M16-BCP (Thomas, 1973). Après 24 à 48 heures d'incubation, les bactéries utilisant le lactose acidifient le milieu qui prend une coloration jaunâtre tandis que celles utilisant l'arginine ré-alkalinisent le milieu en libérant de l'ammoniaque et de ce fait le milieu garde sa coloration initiale violette.

- **Profil fermentaire**

Les coques isolées sont identifiées à l'aide d'un automate « VITEK 2 Compact » qui fait une lecture grâce à une base de données optimisée et à des cartes d'identification colorimétrique. Cette base de données couvre plus de 95 % des tests de routine en microbiologie.

Les bacilles isolés sont identifiés à l'aide des galeries API 50 CH (Biomerieux). Ces galeries sont constituées de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés. La fermentation des sucres se traduit par le virage de couleur violette au jaune (Al-Otaibi, 2012).

4. Identification moléculaire (identification phénotypique)

4.1 PCR spécifique du genre *Enterococcus*

Les réactions PCR ont été réalisées à l'aide des amorces spécifiques des gènes d'*Enterococcus* Ent 1 (5'-TACTGACAAACCATTCATGAT-3') et Ent 2 (5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC-3') Ke et al. (1999). La réaction a été réalisée dans un volume de 50µl contenant du tampon PCR, MgCl₂ 3µl, dNTPs 1µl, Taq ADN polymérase 0.25µl, 1µl d'amorce et 40ng d'ADN. La réaction PCR a été réalisée dans un thermocycleur avec un programme de 35 cycles composés de 3 étapes qui sont comme suit : a) dénaturation à 94°C pendant 15sec b) hybridation à 55°C pendant 15sec, c) élongation à 72°C pendant 45sec. Après ces 35 cycles, une étape finale à 72°C pendant 5min était réalisée. 10µl de produit PCR étaient analysés sur gel d'agarose à 1% avec du bromure d'éthidium dans du tampon Tris acétate-EDTA 0.5X (TAE) pendant 30 min à 100V et la lecture a été réalisée par Trans UV-éclairage.

4.2 Amplification et séquençage de l'ADNr 16S

L'ADN génomique des bactéries a été extrait par le Kit Dneasy Blood & Tissue (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) et utilisé comme matrice pour l'amplification du gène ARNr 16S. La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction; Réaction de Polymérisation en Chaîne) était réalisée dans un volume total de 50µl contenant du tampon PCR (Tris-HCl 20 mM, KCl 50mM, pH 8,4), MgCl₂ 3µl, dNTPs 1µl, Taq ADN polymérase 0.25µl, 1µl d'amorce et 40ng d'ADN dans un volume final de 50µl. Les réactions PCR ont été réalisées à l'aide des amorces fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et rd1 (5'-TAAGGAGGTGATCCAGGC-3') préparées selon la méthode de Weisburg et al. (1991). La réaction PCR a été réalisée dans un thermocycleur avec un programme de 35cycles composés de 3 étapes qui sont comme suit : a) dénaturation à 94°C pendant 1min, b) hybridation à 56°C pendant 1,15min, c) élongation à 72°C pendant 1,15min. Après ces 35 cycles, une étape finale à 72°C pendant 5min était réalisée. 10µl de produit PCR étaient analysés sur gel d'agarose à 1% avec du bromure d'éthidium dans du tampon Tris acétate-EDTA 0.5X (TAE) pendant 30 min à 100V et la lecture a été réalisée par Trans UV-éclairage.

Les souches présentant les meilleurs résultats ont été caractérisées pour leurs propriétés technologiques. Le séquençage de l'ADN a été effectué par le service de séquençage de MilleGen (Labège, France), puis comparaison de leur séquence avec la base de donnée NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

3.3 RAPD: *RandomAmplifiedPolymorphic ADN*

Le polymorphisme d'AND amplifié au hasard ou RAPD est produit par la technique PCR, utilisant d'ADN génomique, d'une amorce aléatoire courte d'environ 10 nucléotides et d'enzyme *Taq* polymérase (Welsh et McClelland, 1990; Williams et *al.*, 1990). Les fragments générés en nombre quasiment illimité, sont répartis dans tout le génome. Le polymorphisme observé se traduit par la présence ou l'absence de bande chez les différents génotypes. On a utilisé l'amorce E1 (5'-TCACGCTGCA-3'), amorce E2 (5'AGCCGCCCT3') et amorce M13 primer (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'). Nous avons utilisé le programme suivant : dénaturation à 95°C pendant 5min, 4 cycles de 45sec à 94°C, 2min à 30°C, et 30 sec à 72°C ; 10 cycles de 5 sec à 94°C, 30 sec à 36°C, et 30 sec à 72°C ; 10 cycles de 5sec à 94°C, 30 sec à 36°C, et 40 sec à 72°C ; 10 cycles de 5 sec à 94°C, 30 sec à 36°C, et 50 sec à 72°C ; et 10 cycles de 5 sec à 94°C, 30 sec à 36°C, et une étape finale à 72°C pendant 10 min était réalisée. 10µl de produit PCR étaient analysés sur gel d'agarose à 1% avec du bromure d'éthidium (0.5 mg/mL) dans du tampon Tris acétate-EDTA 0.5X (TAE) (40 mM Tris- acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) pendant 30 min à 100V et la lecture a été réalisée par Trans UV-éclairage.

5. Profil fermentaire des bactéries

5.1 Mesure de la production d'acide lactique

Le taux de production d'acide est considéré comme le reflet de l'activité du ferment (Stadhouders, 1986).

Principe de mesure

L'expression "acidité titrable" désigne l'acidité mesurée par la méthode classique de la réaction acide-base selon la méthode décrite par Accolas et *al.*, (1977). Cette méthode permet de neutraliser l'acide produit par la fermentation par une solution de NaOH (N/9) en présence de phénolphtaléine (à 1% dans de l'alcool). La solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) utilisée est dite soude dornic.

La mesure de l'acidité titrable est faite au début de la fermentation du lait (T=0) puis toutes les heures jusqu'à coagulation du lait. Les mesures sont effectuées

dans le lait fermenté, par les cultures pures prises individuellement ou en association. Nous pouvons ainsi estimer la vitesse d'acidification du lait (mM/h).

Procédure

A 10 ml de lait, contenant la culture pure ou mixte sont ajoutées 5 gouttes de phénophtaléine. Puis, à l'aide d'une burette graduée et sous agitation, on ajoute de la soude dornic jusqu'à ce que la couleur blanche vire au rose. Le volume (V) de la soude utilisé est noté.

Les résultats sont exprimés en degré dornic (°D) en utilisant la relation :

$$\text{Acidité} = V \times 10.$$

1 °D correspond à 0,1g d'acide lactique produit dans un litre de lait.

5.2 Mesure de la cinétique de variation du pH

Le pH, indice de l'acidité développée dans le lait au cours du processus de fermentation, est mesuré en fonction du temps à l'aide d'un pH-mètre digital (Knik).

5.3 Cinétique de croissance des bactéries

La cinétique de croissance (Ufc/mL) est réalisée sur des laits fermentés par les souches pures. Une série de dilution décimale dans de l'eau physiologique stérile est réalisée, ensuite les trois dernière dilutions ont étéensemencées en profondeur sur gélose MRS et M17 puis incubé pendant 48h.

Le dénombrement est effectué dans des boîtes de pétri contenant un nombre de colonies compris entre 30 et 300 (Ghoddusi & Robinson, 1996).

6. Caractérisation biochimique des laits fermentés

6.1 Mise en évidence de l'activité protéolytique des bactéries lactiques

6.1.1 Dosage des fonctions α -NH₂ libérées

La protéolyse bactérienne, dans les laits fermentés, est évaluée par le dosage des fonctions α -NH₂ libérées selon la méthode de DOI et *al.* (1981). Les enzymes protéolytiques des bactéries dégradent les protéines en peptides et libèrent des fonctions α -NH₂ dont le taux est déterminé par mesure colorimétrique, après réaction

avec la ninhydrine. Les concentrations des peptides sont exprimées par rapport à une courbe étalon d'un mélange équimolaire de leucine exprimée en (mM/mg).

Principe

Le dosage de ces fonctions α -NH₂ nécessite une solution où sont dissous 0,8 g de ninhydrine dans un mélange de 80 ml d'éthanol à 99,5%, 10 ml d'acide acétique glacial suivi par l'addition de 1g de chlorure de cadmium. Cette solution peut être conservée, dans un flacon coloré recouvert de papier aluminium pour éviter l'action de la lumière, 1 mois à l'obscurité et à la température de 4°C.

La procédure consiste à mettre dans des tubes Sovirel, successivement, 500 μ l de l'échantillon à doser et 1 ml de la solution de ninhydrine; l'ensemble est bien mélangé et le tube est chauffé pendant 5 min à 84°C dans un bain marie pour révéler la couleur pourpre. Les tubes sont ensuite refroidis dans de la glace.

La lecture se fait au spectrophotomètre à l'aide d'une micro cuve en quartz, à 570 nm. La concentration des fonctions α -NH₂ libérées des échantillons est calculée à l'aide d'une courbe étalon de leucine établie à l'aide de standards traités dans les mêmes conditions.

6.1.2 Test sur milieu MRS lait

10 ml de chaque échantillon étaient homogénéisés avec 90 ml de solution saline par agitation. Des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à 10⁻⁸. Un millilitre des trois dernières dilutions était ensemencé en masse sur gélose MRS (bacilles) et M17 (coques) avec 1,4 % de lait. Les boîtes étaient incubées à 37°C pendant 48h. L'apparition d'une zone transparente autour de la colonie est considéré comme un indicateur de la protéolyse (Pailin et *al.*, 2001)

6.1.3 Test sur milieu lait écrémé UHT

Les différents isolats ont été réactivés deux fois par mélange de 5% de préculture dans du lait UHT écrémé puis incubés à 37°C pendant 24, 48 et 72h ((El-Ghaish et *al.*, 2010a). Le mélange a été dilué au 1/10 (V/V) dans du tampon d'échantillon contenant 4% de dodécyl sulfate de sodium(SDS), 3% de 2-mercaptoéthanol, 20% de glycérol, 50 mM Tris-HCl pH 6.8 puis chauffé à 100°C pendant 3min, analysé par

électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS- PAGE) (Laemmli, 1970).

6.1.4 Activité protéolytique sur le caséinate de sodium et le lactosérum dénaturé

Les souches ont été repiquées à raison de 5% d'inoculum dans les milieux MRS et M17. Les souches qui ont donné des résultats positifs avec les tests précédents, ont été testées sur le Milk Citrate Agar (MCA) contenant 4.4% de poudre de lait écrémé, 0.8% de Na-citrate, 0.1% d'extrait de levure, 0.5% de glucose et 1.5% d'agar (Fira et *al.*, 2001). Les cellules ont été cultivées sur milieu MCA à 37°C pendant 48h. Les cellules ont été collectées et resuspendues à $DO_{600}=10$ dans un tampon phosphate de sodium 100mM de pH 6.8. Les cellules ont été homogénéisées avec les différents substrats : caséinate de sodium (12mg/ml) et le lactosérum (5mg/ml) (1 :1, V/V) la dénaturation des substrats est effectuée à 85°C/ 20min. Les échantillons et le contrôle sont incubés à 37°C pendant 3 et 24h. A la fin de la période d'incubation, une centrifugation était réalisée (10min à 8000g) et le surnageant clair est prélevé puis analysé par électrophorèse SDS –PAGE (12% polyacrylamide) (Tab. 4).

6.2 Facteurs influençant l'activité protéolytique

6.2.1 Effet du pH

Pour déterminer l'influence du pH sur l'activité protéolytique, les cellules ont été cultivées sur le milieu MCA après 48 h d'incubation. Les cellules collectées étaient resuspendues à $DO_{600}=10$ dans un tampon phosphate de différentes valeurs de pH (5,4 ; 5,7 ; 6,0 ; 6,5 et 7,2) puis sont mélangées avec le substrat: le caséinate de sodium (12 mg/ml) ou le lactosérum dénaturé (5mg/ml) (1:1, v/v).

Les mélanges et le contrôle ont été incubés pendant 24 h à 37°C. À la fin de la période d'incubation, les échantillons ont été centrifugés (10 min à 8000 g) et le surnageant clair a été prélevé pour analyse par électrophorèse.

6.2.2 Effet de la température

Pour déterminer l'influence de la température sur l'activité protéolytique, les cellules ont été cultivées sur le milieu MCA après 48 h d'incubation. Les cellules ont été collectées et resuspendues à $DO_{600}=10$ dans un tampon phosphate de pH 7,2. Les cellules ont été mélangées avec le substrat : caséinate de sodium (12 mg/ml) ou lactosérum dénaturé (5mg/ml) (1:1, v/v). Les mélanges et le contrôle ont été incubés

Tableau 4 : Composition des gels d'électrophorèse (SDS-PAGE 12%)

Solution	Gel de concentration	Gel de séparation
Acrylamide 40%	0,2 ml	1,8 ml
Tris 2M pH 8,8		1 ml
Tris 0,5M pH 6,8	0,3ml	
Eau	2 ml	3,2 ml
SDS 10%	25µl	60 µl
APS 10%	20µl	60 µl
Temed	4µl	12 µl

pendant 24 h à différentes températures 30, 37 et 42°C. À la fin de la période d'incubation, ont centrifugé (10 min à 8000 g). Le surnageant clair est récupéré puis analysé par électrophorèse.

6.2.3 Effet des inhibiteurs

Les cellules, cultivées sur le milieu MCA, sont collectées et resuspendues à $DO_{600} = 10$ dans un tampon phosphate de pH 7.2. Différents inhibiteurs sont ajoutés à la suspension cellulaire à une concentration finale de 10 mM et incubés à 37°C pendant 1 h avant l'ajout du substrat. Nous avons testé les inhibiteurs suivants l'EDTA, l'acide iodoacétique et le fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF). Le PMSF (50 mM dans l'isopropanol) a été dilué dans du tampon phosphate 10 mM (pH 7,2) à une concentration équivalente à celle des autres inhibiteurs. Les cellules ont été mélangées avec le substrat caséinate de sodium (12 mg/ml ; 1:1, v/v). Les mélanges et le contrôle sont incubés pendant 5 h à 37°C, ensuite centrifugés (10 min à 8000 g). Le surnageant est récupéré pour analyse par SDS-PAGE.

7. Etude de l'activité antibactérienne

7.1 Les souches utilisées

Nous avons utilisé trois souches de bactéries lactiques identifiées comme *Enterococcus faecium* et *Enterococcus durans*. L'activité antibactérienne a été évaluée sur deux souches indicatrices ; *Listeria ivanovii* et *Lactobacillus sakei*.

7.2 Méthode de diffusion en puits pour la détection de l'activité antibactérienne

Après centrifugation des cultures bactériennes à 8000 g pendant 10 min, le surnageant a été ajusté à pH 6,5 avec NaOH 1 N et l'activité antibactérienne du surnageant a été déterminée par la méthode de diffusion en puits (Schillinger et Lucke, 1989). 200 µl souches indicatrices (*Listeria ivanovii* ou *Lactobacillus sakei*) étaient inoculées dans 20 ml de milieu gélosé (1%, p/v). Après solidification de la gélose, on réalise des puits qui sont remplis par la suite par dans lesquels sont déposés 50 µl de surnageant à tester puis incubés à 37°C pendant 24 heures. La présence d'une zone claire d'inhibition de croissance des souches indicatrices autour du puits est considérée comme une réaction positive.

7.3 Facteurs influant l'activité antimicrobienne

7.3.1 Effet des enzymes

L'effet de certaines enzymes sur l'inhibition l'activité antibactérienne des *Enterococcus faecium* a été déterminé selon le protocole suivant. 200 µl de surnageant de *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* sont ajoutés à 20 µl d'une solution

contenant les enzymes suivantes: protéinase K, trypsine, α -chymotrypsine, pronase E, pepsine, catalase, α -amylase et lipase à une concentration finale de 0,1 mg/ml dans des tampons appropriés. Le mélange était incubé à 37°C pendant 2 h puis l'activité enzymatique est stoppée à 100°C pendant 5 minutes.

7.3.2 Effet du pH

La stabilité de l'activité antibactérienne aux pH acide et basique a été réalisée en ajustant le pH du surnageant aux valeurs désirées (2 à 10) par l'ajout de NaOH 5N ou d'HCl 5N. Après 2 h d'incubation à 37°C, le pH était ajusté à 6,5 et l'activité des bactériocines était déterminée contre les deux souches indicatrices.

7.3.3 Effet de la température

Pour évaluer la thermostabilité des bactériocines, 1 ml de surnageant de culture était neutralisé et incubé à 100°C pendant 10 et 30 min, et à 121°C dans un autoclave pendant 20 minutes.

8. Spectre d'activité antibactérienne vis-à-vis deux souches indicatrices

Pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des *Enterococcus faecium*, la méthode de dilution en série sur milieu gélosé a été utilisée (Yamamoto *et al.*, 2003). Cette méthode permet de déterminer l'activité en unités arbitraires (U.A.). Le surnageant de culture est dilué en série. Puis on dépose les différentes dilutions sur la gélose contenant la souche indicatrice (*Listeria ivanovii* ou *Lactobacillus sakei*). Le surnageant dilué (10 μ l) est déposé à la surface du milieu gélosé. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées pendant 18 h à 37°C. L'activité antibactérienne est déterminée en U.A. par millilitre de milieu de culture selon la formule suivante :

$$2^n \times 1000 \mu\text{l}/10 \mu\text{l} = \text{U.A./ml}$$

n représentant la réciproque de la dilution la plus élevée pour laquelle une inhibition de croissance de la souche sensible est observée.

9. Caractérisation des entérocoques par PCR

L'ADN génomique des bactéries (*Enterococcus faecium* 1 et *Enterococcus faecium* 2 et *Enterococcus durans*) a été utilisé comme matrice pour l'identification des gènes codant pour des entérocoques.

La réaction PCR a été réalisée dans un thermocycleur. Le mélange réactionnel est composé : 1 X tampon de réaction (Tris-HCl 10 mM, pH 9, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM et Triton X-100 0.1%), 200 μ M de dNTPs, 0,025 U/ μ l de Taq ADN

polymérase (Promega), 1 μ M de chaque amorce et 40 ng d'ADN dans un volume final de 50 μ l. Des amorces pour huit gènes d'entérocoques connus (A, B, P, 31, Q, AS48, L50A) ont été utilisées comme décrit dans le Tableau 5.

L'échantillon subit ensuite 30 cycles d'amplification (94°C/30s ; Tm/ 30s ; 72°C/30s) précédé d'une étape de dénaturation de l'ADN (95°C pendant 5 min) et une élongation finale de 5 min à 72°C permettant à la polymérase d'achever l'élongation des brins d'ADN. La température d'hybridation dépend de chaque couple d'amorces (Tab. 5). Trois microlitres de produit PCR étaient analysés après une électrophorèse de 30 min à 100 V sur un gel d'agarose à 1% avec du bromure d'éthidium (0,5 mg/ml) dans un tampon Tris acétate-EDTA 0.5X (TAE) et la lecture était réalisée sous UV.

10. Test d'activité contre les bactéries pathogènes

L'activité antimicrobienne des surnageant est évaluée. Les souches pathogènes d'origine alimentaire utilisées dans notre test sont : *Bacillus subtilis* (ONIRIS), *Brochothrix thermosphacta* (ONIRIS), *Carnobacterium maltaromaticum* (ONIRIS), *Carnobacterium piscicola* (ONIRIS), *Enterococcus faecalis* (ONIRIS), *Enterococcus faecium* (ONIRIS), *Escherichia coli* ATCC25922 (Hopital d'Oran), *Listeria grayi* (ONIRIS), *Listeria innocua* (ONIRIS), *Listeria ivanovii* (ONIRIS), *Listeria monocytogenes* (ONIRIS, IFREMER), *Moelleralla wisconsensis* (ONIRIS), *Morganella psychrotolerans* (ONIRIS), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Hopital d'Oran), *Pseudomonas fluorescens* (ONIRIS), *Salmonella enterica* (ONIRIS), *Salmonella montevideo* (ONIRIS), *Salmonella typhimurium* (ONIRIS), *Serratia liquefaciens*(ONIRIS) et *Vagococcus penaei* (ONIRIS).

Les souches indicatrices sont inoculées dans le BHI liquide (AES Chemunex, France) pendant 24 heures à une température optimale de chaque souche. Le milieu de culture BHI gélose (1% d'agar (w / v) estensemencé avec 10⁶ UFC / ml de souche indicatrice selon le protocole suivant: Après solidification de la gélose, des puits de 5 mm de diamètre ont été formés dans toutes les boîtes de Pétri contenant les souches indicatrices. 50 μ l de surnageant est déposé dans chaque puits, les plaques sont ensuite incubées pendant 24 heures à la température optimale de chaque souche.

Tableau 5 : Amorces de PCR utilisées pour la détection de gènes codant pour les enterocines connues

Gene	Amorce	Séquence 5' 3' →	Amplification taille (bp)	TM	Réf.
A	AF	GGTACCACTCATAGTGGAAA	130	58 °C	1
	AR	CCCTGGAATTGCTCCACCTAA			
B	BF	CAAAATGTAAAAGAATTAAGTACG	180	56 °C	1
	BR	AGAGTATACATTTGCTAACCC			
P	PF	GCTACGCGTTCATATGGTAATGGT	132	60 °C	1
	PR	ATGTCCCATACTGCCAAACCAGAAGC			
31	31F	CCTACGTATTACGGAAATGGT	130	58 °C	2
	31R	GCCATGTTGTACCCAACCATT			
Q	QF	GGAATAAGAGTAGTGAATACTGATAT GAGAC	653	60 °C	1
	QR	AAAGACTGCTCTTCCGAGCAGCC			
AS48	AS48F	GAGGAGTATCATGGTTAAAGA	253	56 °C	1
	AS48R	ATATTGTAAATTACCAA			
	Cyl R	CCTACTCCTAAGCCTATGGTA			

Référence:

1: de Vuyst *et al.* (2003) 2: Klibi *et al.* (2008)

La présence d'une zone d'inhibition autour des puits est considérée comme une réaction positive. (Schillinger & Lucke, 1989; Ogunbanwo, Sanni, & Onilude, 2003).

11. Mise en évidence *in vitro* de quelques propriétés probiotiques

11.1 Résistance aux conditions gastro-intestinales simulées

- Test de résistance des bactéries lactiques à pH acide

Ce test est basé sur la méthode décrite par Both et *al.*, 2010. Une préculture bactérienne est inoculée dans une solution ajustée préalablement à pH 2 et à pH 3 puis incubée à 37°C. Des dénombrements bactériens sur boîte de pétri sont effectués toutes les heures pendant 3 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de bactéries dénombrées après incubation par rapport à la concentration initiale.

- Résistance aux sels biliaries

Le test de résistance des bactéries aux sels biliaries est effectué selon la méthode décrite par Both et *al.*, 2010 avec quelques modifications. Une solution de sels biliaries à 0,3% est préparée dans l'eau physiologique. Une solution saline sans sels biliaries est utilisée comme témoin.

Le choix de la concentration de bile pour notre contrôle (0,3%) est basé sur sa concentration physiologique dans le duodénum. Une préculture bactérienne est transférée dans la solution de sels biliaries (0,3%). Un tube témoin est préparé sans sels biliaries. Les tubes sont incubés à 37°C pour 0 et 240 minutes avant la réalisation du dénombrement.

11.2 Test d'hémolyse

A partir de pré-culture bactérienne en milieu MRS, les souches sont ensemencées en touche sur milieu gélose au sang cuit. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48h. L'apparition d'une zone claire indique une bêta hémolyse, tandis que l'halo verdâtre indique un hémolyse alpha, et enfin l'absence d'halo indique une gamma hémolyse (Hosseini et *al.*, 2009)

11.3 Tests de sensibilité aux antibiotiques

Les résistances aux antibiotiques des cinq souches ont été évaluées par la méthode de diffusion en disque contre l'ampicilline, la pénicilline, le chloramphénicol, la gentamicine et la tétracycline. Les seuils de sensibilité ont été définies d'après la méthode éditée par le Comité National pour Standards de Laboratoire Clinique (CNSLC) (Karmarkar et *al.*, 2004). Une fraction aliquote

(100µl) d'une culture bactérienne est additionnée à 20ml de milieu approprié gélosé (0.8%, p/v). Après solidification de la gélose, des disques (Prat Dumas, France, 6mm) sont placés sur la surface du milieu de culture. Des concentrations croissantes d'antibiotiques déposées sur les disques. Les boîtes sont mises à température ambiante pendant 1h dans des conditions stériles puis incubées à 37°C pendant 24h (Andrews, 2001). La présence d'une zone claire d'inhibition de croissance de la souche indicatrice autour du disque est considérée comme une réaction positive. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'un antimicrobien pouvant inhiber la croissance de micro-organisme après une nuit d'incubation. Les valeurs de CMI sont utilisées pour déterminer la résistance des micro-organismes à un agent antimicrobien et pour estimer les concentrations critiques. Les valeurs de la CMI ont été comparées aux concentrations critiques décrites par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (2008).

11.4 Détection des facteurs de virulence

L'ADN génomique d'*Enterococcus faecium* a été utilisé comme matrice pour l'identification des gènes codant pour des facteurs de virulence connus : *asal* (substance d'agrégation), *cyl A* (cytolysine), *ace* (protéine de liaison du collagène), *efaAfs* (antigène de surface d'*Enterococcus*), et *espfm* (protéine de surface d'*Enterococcus*). Leur présence a été vérifiée par amplification spécifique des gènes concernés grâce à des amorces spécifiques, par PCR classique. *Enterococcus faecalis* MM4594 a été utilisé comme contrôle positif.

La réaction PCR est réalisée dans un volume total de 50 µl contenant du tampon PCR 1X (Tris-HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, et 0,1% de Triton X-100), 200 µM de chaque dNTPs, 0,025 U/µl de Taq ADN polymérase (Promega), 1 µM de chaque amorce et 40 ng d'ADN dans un volume final de 50 µl. Les séquences des amorces de cinq gènes de virulence connues, *asal* (substance d'agrégation), *cyl A* (cytolysine), *ace* (protéine de collagène de liaison), *efaAfs* (antigène *Enterococcusfaecalis* endocardite), et *espfm* (protéine de surface entérocoques) ont été utilisées (Tab. 6).

La réaction PCR (*asal*, *ace* et *espfm*) a été réalisée dans un thermocycleur (Techno Scientifiques) programmé pour les conditions suivantes : dénaturation à 95°C pendant 5 min, 35 cycles composés de 3 étapes: (1) étape de dénaturation à 94°C pendant 1 min, (2) étape d'hybridation à 56°C pendant 1 min, (3) étape d'élongation à 72°C pendant 1 min. La réaction PCR (*efaAfs*) a été réalisée dans le

thermocycleur programmé pour les conditions suivantes : dénaturation à 95°C pendant 5 min, 35 cycles composés de 3 étapes: (1) étape de dénaturation à 94°C pendant 1 min, (2) étape d'hybridation à 54°C pendant 1 min, (3) étape d'élongation à 72°C pendant 1 min. La réaction PCR (*Cyl A*) a été réalisée dans le thermocycleur programmé pour les conditions suivantes : dénaturation à 95°C pendant 5 min, 30 cycles composés de 3 étapes: (1) étape de dénaturation à 94°C pendant 45 s, (2) étape d'hybridation à 58°C pendant 45 s, (3) étape d'élongation à 72°C pendant 45 s. 3 µl de produit PCR étaient analysés sur un gel d'agarose à 1% avec du bromure d'éthidium (0,5 mg/ml) dans un tampon Tris acétate-EDTA 0.5X (TAE) pendant 30 min à 100 V et la lecture a été réalisée par éclairage UV.

12. Etude de la modulation de la réponse allergénique chez les souris Balb/c

12.1 Echantillons

Les bactéries suivantes ont été utilisées dans ce protocole : *Enterococcus faecium1*, *Enterococcus faecium2*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum*. Elles ont été isolées à partir du lait de chèvre et sélectionnées pour leurs propriétés technologiques intéressantes

12.2 Animaux

Les animaux utilisés sont des souris conventionnelles de souche Balb/c obtenues auprès de l'Institut Pasteur d'Alger. Ce sont des souris femelles, élevées et acclimatées avant toute manipulation dans l'animalerie du Laboratoire de Physiologie de la Nutrition et Sécurité Alimentaire dans des conditions d'hébergement conformes aux normes. Les expériences sont effectuées en respectant le bien-être de l'animal, évitant le stress et l'agitation susceptibles d'interférer avec les résultats. Ils sont maintenus dans des cages appropriées munies chacune d'un biberon et d'une mangeoire et sont nourris *ad libitum* avec un aliment pour rongeurs et de l'eau du robinet.

Tableau 6: Amorces de PCR utilisées pour la détection de gènes codant pour les facteurs de virulence connus

Gène	Amorce	Séquence	Amplification taille (bp)	TM	Ref.
		5' 3' →			
<i>asal</i>	ASA11	GCACGCTATTACGAACTATGA	375	56 °C	1
	ASA12	TAAGAAAGAACATCACCACGA			
<i>ace</i>	ACE-F	GAATTGAGCAAAAGTTCAATCG	1008	56 °C	3
	ACE-R	GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC			
<i>efaAfs</i>	TE5	GACAGACCCTCACGAATA	705	54 °C	2
	TE6	AGTTCATCATGCTGTAGTA			
<i>Esp</i>	ESP14F	AGATTCATCTTTGATTCTTGG	510	56 °C	1
	ESP12R	AATTGATTCTTTAGCATCTGG			
<i>Cyl A</i>	CYTI	ACTCGGGGATTGATAGGC	688	58 °C	1
	CYTIIb	GCTGCTAAAGCTGCGCTT			
	CYTB2	ACAGTGAACGATATAACTCGCTATT			
	CYTLL2	GCTTCACCTCACTAAGTTTTATAG			

Référence:

1: Vankerckhoven *et al.* (2004) 2: Eaton and Gasson (2001) 3: Ben Omar *et al.* (2004)

asal: substance d'agrégation, *ace*: protéine de liaison du collagène, *efaAfs*: antigène de surface d'*Enterococcus*, *esp*: protéine de surface d'*Enterococcus*, *cyl A*: cytolysine.

12.3 Immunisation des souris

12.3.1 Répartition des animaux

140 femelles Balb/c sont utilisées pour le protocole d'immunisation. Les souris sont âgées de 4 semaines.

Pour les besoins de chaque expérience, les animaux ont été répartis en 13 lots :

- **Lot 1:** 20 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'une solution saline pendant 18 jours. Ce lot constitue le groupe témoin négatif.
- **Lot 2:** 10 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'*Enterococcus faecium* (E14) pendant 18 jours puis immunisées à la β -Lg.
- **Lot 3:** 10 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'*Enterococcus faecium* (E106) 0,3 ml pendant 18 jours puis immunisées à la β -Lg.
- **Lot 4:** 10 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'*Enterococcus durans* (E140) 0,3 ml pendant 18 jours puis immunisées à la β -Lg.
- **Lot 5:** 10 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml de *Lactobacillus brevis* (Lb) 0,3 ml pendant 18 jours puis immunisées à la β -Lg.
- **Lot 6:** 10 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml de *Lactobacillus plantarum* (Lb) 0,3 ml pendant 18 jours puis immunisées à la β -Lg.
- **Lot 7:** 10 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'une solution saline pendant 18 jours puis immunisées à la β -Lg. Ce lot constitue le groupe témoin positif.
- **Lot 8:** 10 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'*Enterococcus faecium* (E15) 0,3 ml pendant 18 jours puis immunisées à la α -Lac.
- **Lot 9:** 10 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'*Enterococcus faecium* (E10) 0,3 ml pendant 18 jours puis immunisées à la α -Lac.
- **Lot 10:** 10 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'*Enterococcus durans* (E40) 0,3 ml pendant 18 jours puis immunisées à la α -Lac.
- **Lot 11:** 10 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml de *Lactobacillus brevis* (Lb) 0,3 ml pendant 18 jours puis immunisées à la α -Lac.
- **Lot 12:** 10 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml de *Lactobacillus plantarum* (Lb) 0,3 ml pendant 18 jours puis immunisées à la α -Lac.
- **Lot 13:** 10 souris intubées par voie intra-gastrique avec 0,3 ml d'une solution saline pendant 18 jours puis immunisées à la α -Lac. Ce lot constitue le groupe témoin positif.

12.4 Adjuvant

12.4.1 Hydroxyde d'aluminium

L'hydroxyde d'aluminium ou alum provient de chez PIERCE. C'est un adjuvant utilisé pour la vaccination chez l'homme et chez les animaux.

12.5 Protocole d'immunisation

Les souris des lots 2 jusqu'au 13 sont immunisées par voie intra-péritonéale. Chaque souris reçoit une dose de 100 µl d'une solution de PBS pH 7.4 contenant 10 µg de β-Ig ou d'α-Lac à 2 mg d'Al(OH)₃. Les injections intra-péritonéales ont lieu à J0 puis, forme de rappels et dans les mêmes conditions au 14ème, 21ème et 28ème jour du protocole.

12.6 Prélèvement sanguin

A J35, un prélèvement sanguin retro-orbitaire est effectué à l'aide d'une pipette Pasteur. Le sang récolté par souris est ensuite centrifugé à 3500 tr/min pendant 15 minutes à + 4°C afin de séparer le sérum qui est ensuite aliquoté dans des microtubes Eppendorf que l'on conserve congelés à - 20°C pour des dosages ultérieurs.

12.7 Dénombrement des bactéries lactiques au niveau de l'intestin et des selles des souris

Afin d'évaluer l'effet de l'intubation par voie intra gastrique sur la prolifération des bactéries lactiques au niveau du chyme intestinal et des fèces. Une série de dilution décimale a été effectuées, ensuite les trois dernières dilutions ont été utilisées pour effectuer le dénombrement en profondeur sur milieu MRS gélosé puis incubé pendant 48h.

12.8 Dosage des immunoglobulines sériques

12.8.1 Evaluation du degré de sensibilisation des animaux

Afin d'apprécier le degré de sensibilisation des animaux à la β-Lg ou d'α-Lac purifiée, la technique immunoenzymatique ELISA a été utilisée, selon un procédé non compétitif en mesurant les anticorps de type IgG, IgE, IgG1 et IgG2a dont le principe est décrit ci-dessous.

12.8.1.1 Principe général de la méthode ELISA

Le principe de cette technique est basé sur un procédé dans lequel les anticorps à doser réagissent dans un premier temps avec l'antigène immobilisé par adsorption

sur une phase solide. Dans un deuxième temps, la quantité d'anticorps fixée par l'antigène est mesurée à l'aide d'un deuxième anticorps (anti-immunoglobuline).

Dans le cadre de notre travail, nous utilisons des plaques de microtitration en polystyrène (NUNC Maxisorb, puits à fond plat), qui permettent d'adsorber la plupart des antigènes. Après dépôt de l'immun-sérum contenant les anticorps spécifiques, la phase solide est lavée et on révèle la présence de ces anticorps par l'addition d'un conjugué qui correspond à des anticorps couplés ou non à une enzyme (peroxydase).

La dernière étape correspond au dosage de l'enzyme marqueur. Cette phase est essentielle, car du plus petit nombre de molécules d'enzyme que l'on pourra détecter, dépendra le seuil de sensibilité.

Le substrat de la peroxydase que nous utilisons est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Au cours de la réaction enzymatique, un radical O se forme. Pour le détecter, on ajoute à la solution un chromogène, l'orthophénylène diamine (OPD).

12.8.1.2 Mode opératoire

Le dosage ELISA des IgG, IgE, IgG1 et IgG2a spécifiques anti β -Lg et anti α -Lac sont réalisés par la technique ELISA, selon les étapes suivantes :

- Tous les puits de la microplaque reçoivent 100 μ l d'antigène à la concentration de 10 μ l/ml de β -Lg, dilués dans du PBS pH 7,4. Les plaques sont alors incubées pendant au moins une nuit à + 4°C.
- L'excès d'antigène non fixé est éliminé par 3 lavages successifs de la plaque avec du PBS-Tween 20, 0,05 % à l'aide d'un laveur automatique (Elx50).
- Les sites non spécifiques sont saturés par le dépôt, dans tous les puits, de 200 μ l de SAB à 3 % dans du PBS pH 7,4 lorsque l'antigène sensibilisant est la β -Lg ou α -Lac.
- La plaque est ensuite incubée pendant 1 heure à 37°C puis rincée 3 fois de suite sous agitation par le tampon de lavage PBS/Tween 20, 0,05%.
- L'opération suivante consiste à diluer les échantillons de sérum à tester au 1/10^{ème} dans un tampon de dilution (PBS 0,01 M/SAB 1 % Tween 20 0,1 % pH 7,4).
- Pour cela, une série de dilution est effectuée allant de 10⁻¹ à 10⁻⁶ puis un volume de 100 μ l est déposé dans des puits appropriés.
- La plaque est alors incubée à 37°C pendant 2 heures, puis lavée 3 fois de suite sous agitation, au tampon de lavage PBS/Tween 20, 0,05 %.
- Ensuite, chaque puits de la plaque reçoit, selon les anticorps recherchés, 100 μ l d'anti anticorps de souris dilué au 1/20000ème dans du tampon de dilution. L'anti anticorps

déposé est soit un anti IgG, soit un anti IgE ou des anti-IgG1 ou anti IgG2a biotinylés (Pharmingen).

- La plaque est ensuite incubée pendant 1 heure à 37°C puis rincée 3 fois de suite sous agitation par le tampon de lavage PBS/Tween 20, 0,05%.
- Après lavage avec le PBS-Tween 20, la Streptavidine peroxydase E-2886 (Sigma) est diluée au 1/5000 et déposé à raison de 100µl par puits; la plaque est incubée à 37°C pendant 30min.
- Après lavage avec le PBS-Tween 20, l'eau oxygénée (H₂O₂) associé à un chromogène: l'orthophénylène diamine (OPD), dans du tampon citrate de sodium (0,05M à pH 5,1) est déposé à raison de 200µl/puits. La réaction colorée se développe en 30minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'ajout de H₂SO₄ 2N a permis de stopper la réaction (Tab. 7 et 8).
- L'intensité de la réaction colorimétrique est mesurée à 492 nm à l'aide d'un lecteur (ELx 800).
- Des témoins négatifs sont inclus dans chaque plaque afin de contrôler la spécificité et la sensibilité de chaque mesure.

12.9 Test de provocation *ex vivo* (intestin isolé) en Chambre de Ussing

12.9.1 Principe de la technique

La chambre de Ussing est une méthode fondamentale pour l'étude et la compréhension des mécanismes de transport intestinal. Ce dispositif expérimental a été conçu à l'origine par Ussing et Zerahn en 1951 pour la mesure des flux ioniques au travers d'un épithélium puis il a été adapté à l'intestin par Schultz et Zalusky (1964). Depuis, cette méthode a été appliquée à de nombreux modèles animaux de laboratoire et est utilisée pour des fragments d'intestin humain prélevés au cours d'interventions chirurgicales ou lors de biopsies intestinales (Heyman *et al.*, 1984; Saïdi *et al.*, 1995).

Un fragment de muqueuse intestinale est monté à plat entre deux demi-chambres de Lucite dont l'ouverture, déterminant la surface exposée, est adaptée à la taille du fragment à étudier (0,1 à 0,2 cm²). Les deux faces du tissu, déterminant un compartiment muqueux (représentant la lumière intestinale) et un compartiment séreux (représentant la circulation sanguine) sont baignées par des solutions identiques (pression, température, osmolarité) maintenues à 37 °C, brassées et oxygénées continuellement par un courant de carbogène (O₂: 95%, CO₂: 5%).

Tableau 7: Composition du tampon phosphate salin **PBS**, 1 M, x10 pH= 7.4

Solution	Quantités
Na₂HPO₄,12 H₂O	29 g
KH₂PO₄	2 g
NaCl	80 g
KCl	2 g
Thymérosal	1 g
Eau ultra pure	1000 ml

Tableau 8: Composition des solutions tampon d'ELISA.

Tampon à diluer 1/10
Tampon de capture NaHCO ₃ 0,1 M pH=9,6
Tampon de lavage : PBS 0,01M pH 7,0 Tween 20 0,05 %
Tampon de saturation : PBS 0,01M pH = 7,0 BSA 3 %
Tampon de dilution : PBS 0,01 M pH = 7,0, BSA 1% Tween 20 0,1 %
Solution de révélation : H ₂ O ₂ à 0,025% final, substrat de la peroxydase (sigma) et l'OPD (orthophénylène diamine, Sigma) à 0,5 mg/ml, révélateur de la réaction enzymatique, dilués dans un tampon citrate trisodique 0,05M, pH 5,1.

Le principe même de la chambre de Ussing est qu'il ne doit exister aucun gradient électrochimique permettant à une solution donnée de traverser le tissu. Cette condition est remplie lorsque les deux faces du tissu sont baignées par des solutions ayant la même composition chimique, la même température, le même pH et la même osmolarité.

Un couple d'électrodes au calomel, reliées par des ponts d'agar (4 g/100 ml de KCl 3M) aux deux faces du tissu permettant de mesurer la différence de potentiel (PD) spontanée du tissu (sérieuse positive). Il est possible de supprimer cette PD, de l'amener à 0 mV, grâce à un système d'électrode relié à un générateur permettant de passer un courant à travers le tissu. Ce courant est appelé courant de court circuit I_{sc} : il représente la somme des flux nets ioniques, principalement de Na^+ et de Cl^- et un flux résiduel d'ions HCO_3^- .

$$I_{sc} = J^{Na^+}_{net} + J^{Cl^-}_{net} + J_r$$

L'application de la loi d'Ohm ($U = RI$) permet de mesurer la résistance du fluide (RF) en absence du tissu et la résistance du tissu (RT) une fois celui-ci monté dans la chambre, ou son inverse: la conductance G ($G = 1/R = I/U$).

12.9.2 Montage de l'intestin de souris en chambre de Ussing

Les souris sont maintenues à jeun depuis la veille au soir. L'anesthésie est effectuée par mise au contact de l'animal avec un coton imbibé d'éther. Après laparatomie, le segment jéjunale est prélevé délicatement de la cavité abdominale, vidé de son contenu par deux ou trois rinçages au Ringer froid (Tab. 9).

Après l'avoir incisé le segment jéjunale selon le bord mésentérique puis découpé en fragments qui sont maintenus dans du Ringer froid et oxygéné par un courant de carbogène (CO₂ : 5%, O₂ : 95%). A chaque fois, un fragment est monté entre deux chambres de Lucite dont l'ouverture détermine la surface de la muqueuse intestinale exposée (0,10 cm²). Le volume de Ringer déposé dans chaque compartiment de la

Tableau 9: Composition de la solution de Ringer

Na⁺	140 mM	Cl⁻	120 mM
K⁺	5,2 mM	HCO₃⁻	25 mM
Ca⁺⁺	1,2 mM	HPO₄	2,4 mM
Mg⁺⁺	1,2 mM	H₂PO₄	0,4 mM

chambre est de 5 ml, le système est maintenu à 37° et oxygéné par un courant de carbogène (Fig. 7).

Après montage du tissu, environ 20 minutes sont nécessaires pour stabiliser les paramètres électrophysiologiques de base. Au terme de cette période, on dépose l'antigène que l'on veut tester (10 µg /ml de β-Lg), dans le compartiment séreux de la chambre. Les différents paramètres électrophysiologiques sont alors mesurés dans un premier temps, toutes les minutes durant les 5 premières minutes, puis une fois toutes les 5 minutes, durant 15 minutes d'expérience.

12.10 Etude histologique

Cette étude a pour but de vérifier l'existence d'une atrophie villositaire au niveau de la muqueuse intestinale ainsi que la présence d'une infiltration lymphocytaire en réponse à l'immunisation des différents lots de souris. Elle a été faite sur des fragments isolés d'intestin de souris sensibilisées et non sensibilisées (témoins).

12.10.1 La fixation

La fixation a pour but essentiel d'assurer une immobilisation des constituants cellulaires ou tissulaires dans un état aussi voisin que possible de l'état vivant (Nzelof, 1972).

Des fragments d'intestin des souris sont plongés dans une solution de formol à 10% pendant 24 heures.

12.10.2 Inclusion à la paraffine

La paraffine n'est pas miscible à l'eau, les fragments fixés doivent être déshydratés.

12.10.3 La déshydratation

Les fragments d'intestin ont été déshydratés dans de l'alcool choisi (alcool éthylique) pendant un temps suffisant à degré croissant : alcool à 70°, 90° et alcool absolu. Bain d'alcool à 70° pendant 25 minutes.

La déshydratation complète du fragment d'intestin a suivi les étapes suivantes: On met les fragments dans un bain d'alcool à 90° pendant 25 minutes. Puis bain d'alcool à 100° pendant 25 minutes. Et enfin, dans un bain de toluène pendant 10 minutes puis 15 minutes.

12.10.4 Imprégnation par la paraffine

Elle s'effectue dans un premier bain de paraffine à l'état liquide dans une étuve dont la température est réglée légèrement au-dessus de son point de fusion,

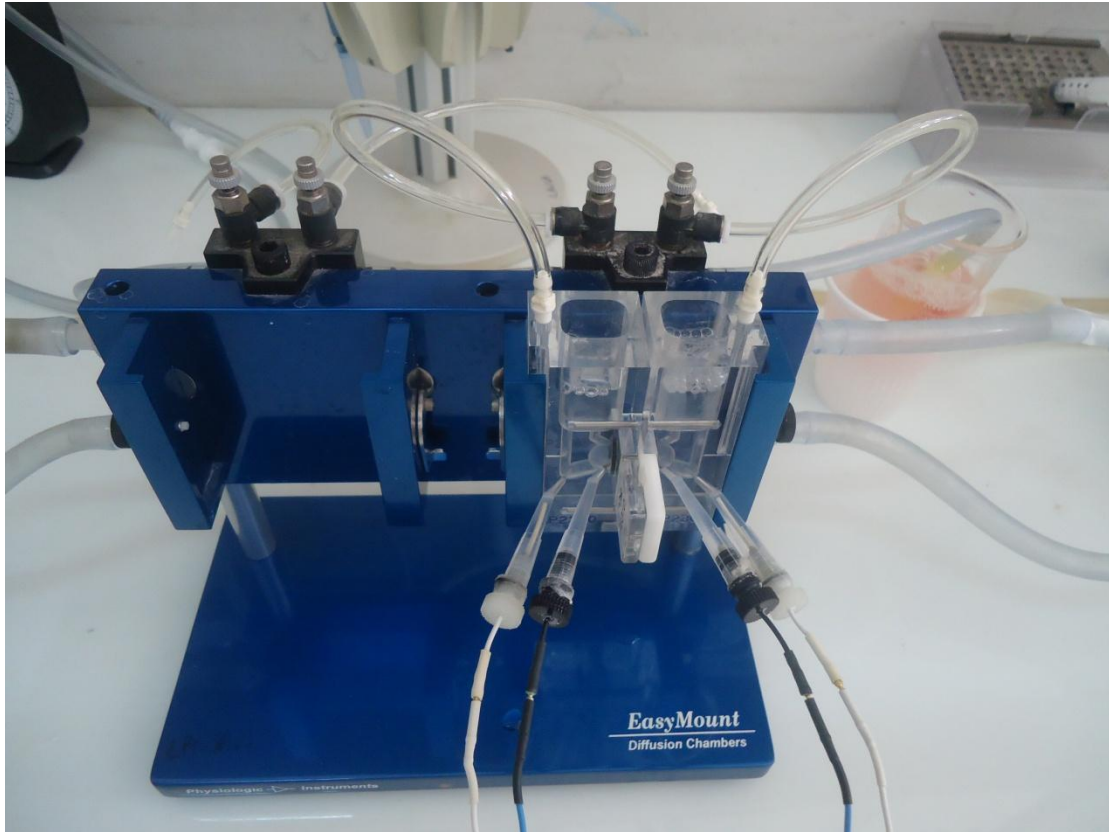


Figure 7: Le dispositif de la chambre d'Ussing

56°C durant une heure. Puis nous imprégnons les fragments d'intestins dans 2 bains successifs de paraffine ; le premier bain durant une heure et le deuxième bain durant 2 heures.

A la sortie du dernier bain de paraffine, l'échantillon est déposé dans la paraffine fondue vierge que nous coulons dans un moule (cassettes d'inclusion); puis on laisse refroidir la paraffine. Après refroidissement de cette paraffine amène sa solidification en un bloc prêt à être coupé.

12.10.5 Microtomisation et étalement des coupes

Les blocs ainsi obtenues sont coupées à l'aide d'un microtome. Elles ont une épaisseur de 4 µm. L'étalement des coupes se fait sur une lame de verre qui est recouverte d'une solution d'albumine (2g d'albumine+ 50 ml de glycérine dans 1000 ml d'eau distillée). Cette lame est placée sur une plaque chauffante réglée à une température convenable, inférieure à celle du point de fusion de la paraffine. L'ensemble coupe lame de verre est retiré de la platine et égoutté et mis à sécher pendant au moins une heure avant d'être coloré ou conservé à l'étuve à température ambiante jusqu'au moment de la coloration.

12.10.6 Coloration

Avant de procéder à la coloration des lames, il faut déparaffiner et réhydrater ces lames.

12.10.6.1 Déparaffinage

Pour déparaffiner les lames, il suffit de les placer sur une plaque chauffante à 56° et par la suite les mettre dans 2 bains successifs de toluène et ceci durant 2 minutes pour chaque bain.

12.10.6.2 Réhydratation

L'hydratation se fait dans 3 bains successifs d'alcool éthylique d'ordre décroissant (100°, 95°, 70°) durant 2minutes à chaque bain et enfin rinçage à l'eau courante.

12.10.6.3 Coloration à l'hémalum-éosine

Nos lames ont été colorées à l'hémalum-éosine (Hould, 1984): c'est la plus simple des colorations combinées. Nous avons fait agir successivement un colorant nucléaire « basique » l'hématéine et un colorant cytoplasmique « acide », l'éosine. La coloration du noyau est bleu-noir et le cytoplasme rose à rouge.

La coloration de nos lames se fait comme suit :

- Mettre les lames dans l'hématoxyline de Harris durant 2 à 3 minutes.

- Laver les lames à l'eau ordinaire.
- En cas de surcoloration, on peut différencier légèrement dans l'alcool chlorhydrique pendant quelques secondes (100 ml d'alcool à 95° + 5 gouttes d'HCl à 1%).
- Bleuir dans une solution aqueuse saturée de carbonate de lithium (rinçage).
- Laver les lames à l'eau ordinaire.
- Mettre les lames dans un bain d'alcool éthylique 1 à 2 minutes.
- Colorer les lames à l'éosine alcoolisée (2 g d'éosine dans 100 ml d'alcool éthylique) pendant 5 minutes.
- Rinçage des lames dans 2 bains successifs d'alcool éthylique à 70° puis à 95°.
- Mettre les lames dans du toluène pendant 1 minute.
- Mettre entre lame et lamelle une goutte de Baume de Canada ou d'Eukitt.
- Laisser sécher puis observer au microscope.

12.10.7 Mesure de la hauteur villositaire

La mesure de la hauteur des villosités intestinales a été effectuée pour vérifier l'existence d'une atrophie villositaire chez les souris sensibilisées par rapport aux témoins.

Le micromètre oculaire comporte 100 divisions. Pour l'objectif (x10) chaque division correspond à 12.8µm.

13. Méthodes statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne \pm erreur standard ($X \pm ES$). Les comparaisons de deux moyennes sont réalisées en moyen d'un test de *t de student*. Les comparaisons de plusieurs moyennes sont réalisées par l'analyse de variance (ANOVA). Le seuil de signification retenu est celui qui est habituellement considéré, soit 5%. Les différentes données sont analysées à l'aide d'un logiciel STATISTICA (5.1 .2006).

Résultats

1. Souche bactériennes

1.1 Isolement et purification des souches de bactéries lactiques

A partir de plusieurs échantillons de lait de chèvre et après un screening sur milieu MRS /M17 gélosé nous avons procédé à l'isolement des souches autochtones de bactéries lactiques. Nous avons en définitive pu sélectionner cinq souches bactériennes identifiées phénotypiquement et génotypiquement.

1.1.1 Identification phénotypique des souches

1.1.1.1 Tests Biochimiques

Les étapes d'identification consistent à réaliser les différents tests phénotypiques. Les isolats purifiés sont Gram positif, catalase négatif, immobiles et asporulés ce qui caractérise les bactéries lactiques (Tab.10). Les formes des cellules sont variables allant de cellules sphériques aux cellules bâtonnets.

Les trois coques isolés ont montré une bonne capacité de croissance aux températures comprises entre 15°C à 45°C, avec la présence d'un caractère homofermentaire. Ils peuvent également se développer à pH 9,6 et dans un bouillon hyersalé à 6,5%. Ces souches sont aussi capables de croître après exposition dans un milieu MRS à 60°C pendant 30min et produire du NH₃ à partir de l'arginine dans un milieu M16-BCP.

Les deux bacilles isolés sont des hétérofermentaires. *Lactobacillus*1 produit du NH₃ à partir de l'arginine en milieu M16-BCP et a la capacité de croître à 45°C dans le milieu MRS. Par contre, la souche *Lactobacillus* 2 ne produit pas le NH₃ et n'a pas la capacité de croître à 45°C.

1.1.1.2 Profil fermentaire

Pour les entérocoques, le résultat est obtenu par un automate d'identification des souches « VITEK compact2 ». Pour les lactobacilles, après 48h d'incubation, nous avons observé un virage de la couleur du milieu de culture de pourpre au jaune dans plusieurs puits de la galerie API 50CH (Biomérieux, France). Ce virage de l'indicateur coloré est attribué à la production d'une quantité plus ou moins importante de l'acide lactique en utilisant les sucres fermentescibles.

Tableau 10 : Résultats de l'identification phénotypique des souches lactiques

	E15	E10	E40	Lb	Lp
Gram	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-
Morphologie	Cocci	Cocci	Cocci	Bacille	Bacille
Production de CO2 du glucose	-	-	-	+	+
Croissance à					
15°C	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+	-
Croissance à pH 9,6	+	+	+		
Croissance à					
2% Nacl	+	+	+		
4%Nacl	+	+	+		
6,5%Nacl	+	+	+		
Hydrolyse de l'arginine (ADH)	+	+	+	+	-
Survie à 60°C pendant 30min	+	+	+		
Résultats de la fermentation des sucres	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.durans</i>	<i>L.plantarum</i>	<i>L.plantarum</i>

L'étude des caractères morphologiques, des caractères biochimiques et de la fermentation des hydrates de carbone a mis en évidence la similarité de quelques souches de bactéries lactiques au niveau phénotypique. Nous avons poursuivi par la suite leur identification avec l'étude moléculaire.

1.1.2 Identification moléculaire (identification phénotypique)

1.1. 2.1 PCR du gène spécifique codant pour le genre *Enterococcus*

Cette technique a pour but de confirmer le genre *Enterococcus*. Après migration de l'ADN, nous avons pu observer que les cinq souches possèdent le gène codant pour le genre *Enterococcus* avec l'apparition d'une bande amplifiée d'un poids moléculaire de 112Kpb (Fig. 8).

1.1.2.2 Identification par PCR 16S

Afin de vérifier la qualité de l'ADN amplifié, nous avons fait migrer les amplifiats sur gel d'agarose à 1,5%. Nos résultats montrent (Fig. 9) que dans les amplifiats des sept isolats, la migration permet de distinguer une seule bande avec un poids moléculaire de 1.5 Kpb, ce qui signifie que l'extraction et l'amplification est bien faite et qu'il s'agit bien des bactéries lactiques.

Les séquences obtenues sont analysées par le programme « BLAST » afin de rechercher les pourcentages d'identité avec différentes séquences présentes dans les banques de données, via le site NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/>). Le résultat est illustré dans le tableau 9, en comparaison avec ceux obtenus lors de l'identification phénotypique.

1.1.2.3 Random Amplified Polymorphic ADN (RAPD)

L'intérêt de la technique RAPD réside dans la diversité génétique qu'elle génère entre les espèces et les groupes d'individus étudiés. Au cours de notre travail des marqueurs RAPD polymorphes sont utilisés (amorce E1, amorce E2, amorce M13). Les résultats obtenus rendent plus robustes les subdivisions génétiques des différentes espèces (Fig. 10). Nous avons observé l'apparition des bandes différentes pour les 5 souches étudiées avec les trois amorces. Cette technique nous a permis d'identifier trois différentes souches d'*Enterococcus faecium*.

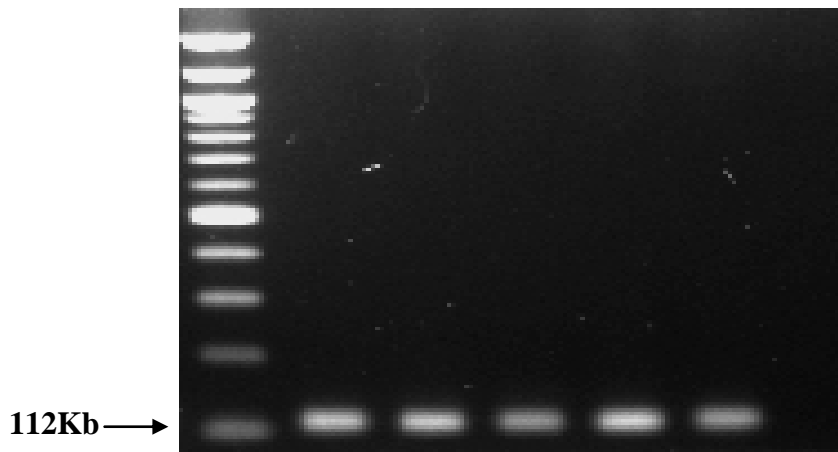


Figure 8 : Amplification du gène spécifique d'*Enterococcus*

La bande correspondant à 112 Kb, correspond au gène d'*Enterococcus*

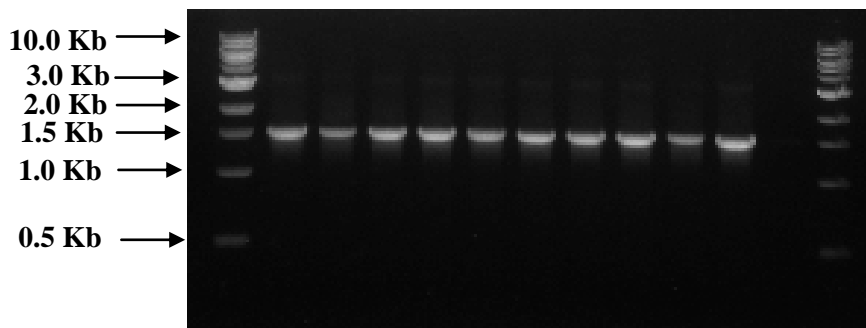


Figure 9 : Amplification du gène 16S ADN des souches testées

L'apparition des bandes électrophorétiques de 1,5Kb correspond au poids moléculaire de l'ADN des bactéries lactiques

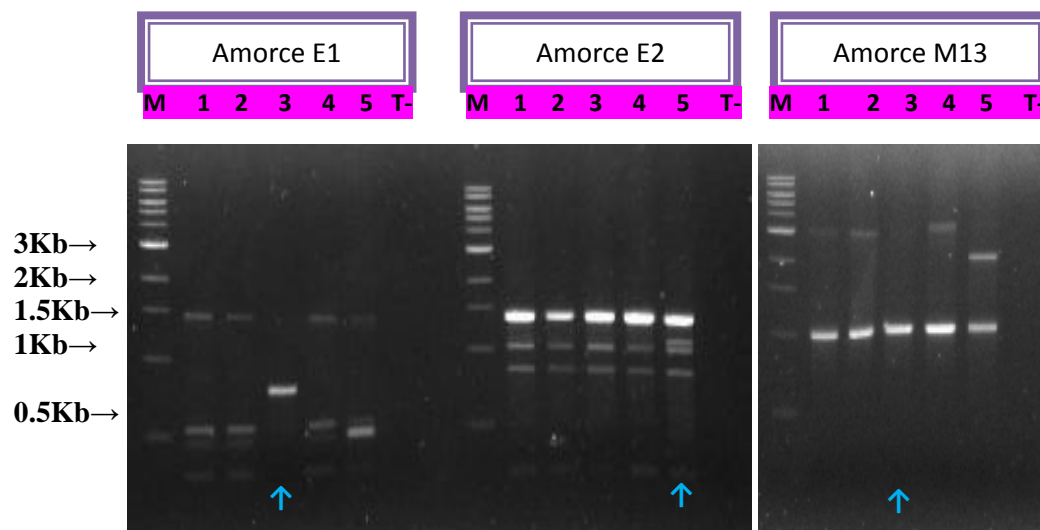


Figure 10 : RAPD-PCR des cinq souches d'*Enterococcus faecium*

L'apparition de plusieurs bandes signifie que nous avons plusieurs souches.

Tableau 11 : Identification phénotypique et géotypique des souches isolées

Code	Identification phénotypique	Identification géotypique
E15	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium1</i>
E10	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium2</i>
E40	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus durans</i>
Lb	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
Lp	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>

1.2 Profil fermentaire des bactéries

1.2.1 Mesure de la production d'acide lactique

Utilisé comme source d'énergie pour assurer leur croissance, les bactéries transforment le lactose du lait en glucose et galactose puis le glucose est transformé en acide lactique. Cette transformation du lactose est due à l'action des enzymes produits par les microorganismes. La quantité d'acide produite exprimée en degré dornic par litre de lait ($^{\circ}\text{D}/\text{l}$) intervient comme facteur de coagulation du lait et reflète le caractère acide du ferment.

Au début de la fermentation (T_0), la quantité d'acide initiale est de $26 \pm 0,44$; $26,6 \pm 0,24$; $27,4 \pm 0,51$; $26 \pm 0,67$; $25,8 \pm 0,37$ $^{\circ}\text{D}$ respectivement pour E15, E40, E10, Lb et Lp. Après vingt quatre heures de fermentation à 45°C , la quantité maximale d'acide produite est de $51,6 \pm 1,4$ ($p < 0,0001$) pour Lb suivi de $50,4 \pm 0,7$ ($p < 0,0001$) pour E15 ; $50,2 \pm 0,9$ ($p < 0,0001$) pour Lp ; 49 ± 1 ($p < 0,0001$) pour E10 et $48,1 \pm 0,8$ $^{\circ}\text{D}$ ($p < 0,0001$) pour E40 (Fig. 11).

1.2.2 Mesure de la cinétique de variation du pH

Le suivi de l'évolution du pH pendant 24h de fermentation à 45°C par les différentes souches est représenté dans la figure 12.

L'évolution des valeurs du pH au cours de la fermentation est caractérisée par une importante diminution pour toutes les souches testées. Au début de la fermentation (T_0), les valeurs du pH sont de $6,24 \pm 0,16$; $6,24 \pm 0,18$; $6,27 \pm 0,15$; $6,28 \pm 0,1$; $6,29 \pm 0,09$ et $6,69 \pm 0,09$ respectivement pour Lb, Lp, E15, E40, E10 et T. Après vingt quatre heures de fermentation à 45°C , une baisse significative est observée dont la plus importante est de $5,11 \pm 0,2$ ($p < 0,0001$) pour Lb suivi de $5,17 \pm 0,2$ ($p < 0,0001$) pour Lp ; $5,21 \pm 0,09$ ($p < 0,0001$) pour E15 ; $5,24 \pm 0,1$ ($p < 0,0001$) pour E40 ; $5,35 \pm 0,1$ ($p < 0,0001$) pour E10

1.2.3 Cinétique de croissance des bactéries

Les souches utilisées trouvent dans le lait un milieu propice à leur développement avec la présence d'eau, d'azote, de carbone et de sels minéraux considérés comme facteurs de croissance.

Le suivi de la croissance des différentes souches pendant 24 heures de fermentation a montré que la croissance des souches est comparable.

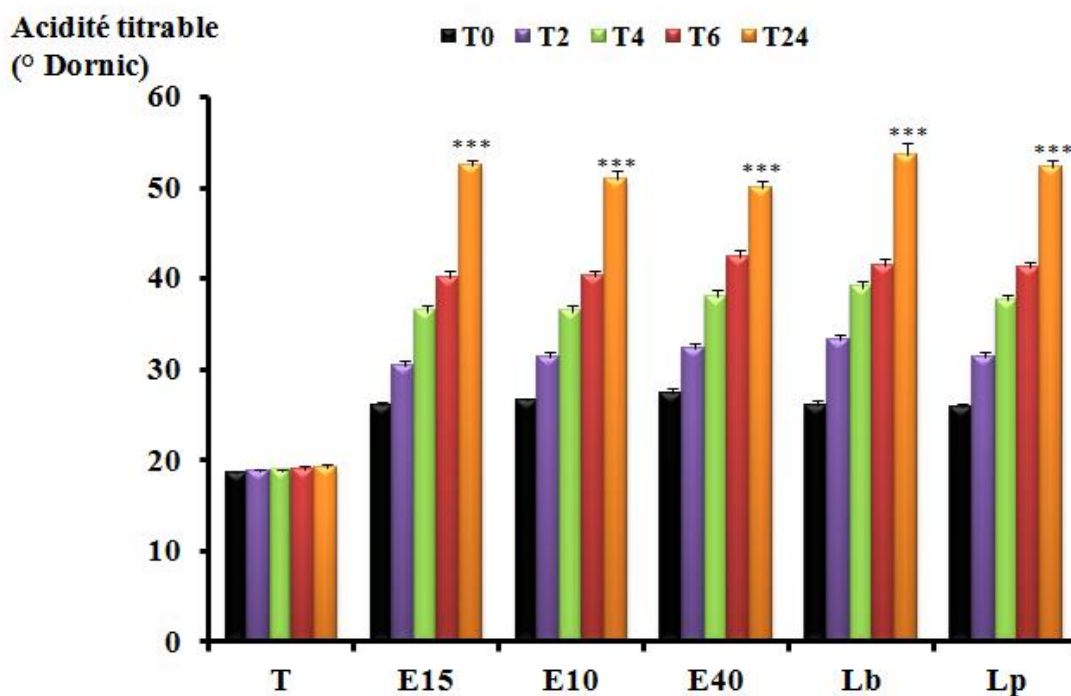


Figure 11: Cénitique de production de l'acide lactique au cours de la fermentation du lait de vache à 45°C par *Enterococcus faecium* (E15), *Enterococcus faecium* (E10), *Enterococcus durans* (E40), *Lactobacillus brevis* (Lb) et *Lactobacillus plantarum* (Lp) et lait stérile sans ferment (T).

T0 : début de la fermentation

T2 : 2 heures

T4 : 4 heures

T6 : 6 heures

T24 : 24 heures

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreur standard. (n=5).

*** : (t_0) vs (t_{24}) ($p < 0,0001$).

- Nous notons qu'il n'y pas de différence significative entre t_0 et t_{24} dans le lait stérile sans ferment (T).
- La différence est hautement significative ($p < 0,0001$) entre le début et la fin de la fermentation dans les différents laits fermentés par les différentes souches.

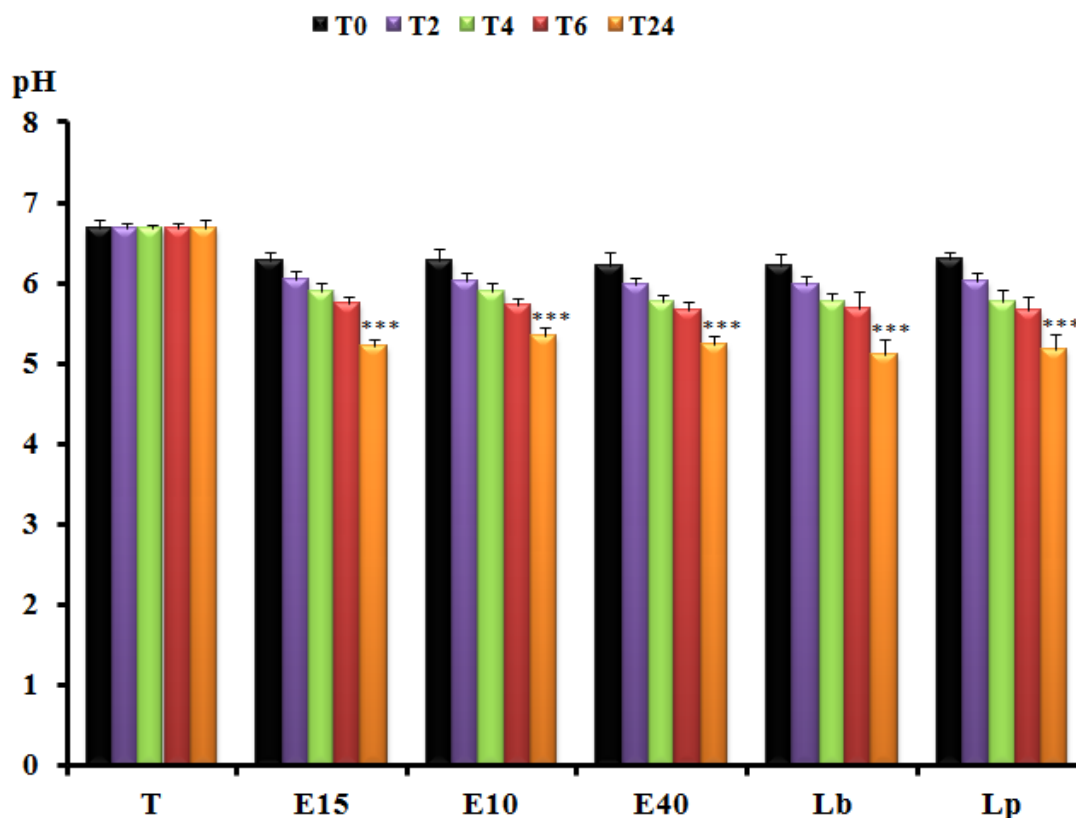


Figure 12: Cinétique de variations du pH au cours de la fermentation de lait de vache à 45°C par *Enterococcus faecium* (E15), *Enterococcus faecium* (E10), *Enterococcus durans* (E40), *Lactobacillus brevis* (Lb) et *Lactobacillus plantarum* (Lp) et lait stérile sans ferment (T).

T0 : début de la fermentation

T2 : 2 heures

T4 : 4 heures

T6 : 6 heures

T24 : 24 heures

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreur standard. (n=5).

*** : (t_0) vs (t_{24}) ($p < 0,0001$).

- Nous notons qu'il n'y pas de différence significative entre t_0 et t_{24} dans le lait stérile (T).
- La différence est hautement significative ($p < 0,0001$) entre le début et la fin de la fermentation dans les différents laits fermentés par les différentes souches.
- La souche E15 avec un taux final de $1,5 \times 10^{10}$; E10 avec $1,3 \times 10^{10}$, E40 avec $1,4 \times 10^{10}$; Lb avec $1,5 \times 10^{10}$ et enfin Lp avec $1,7 \times 10^{10}$ Ufc/mL.

Les valeurs représentées sont les moyennes de trois expériences (Fig.13)

2.1 Caractérisation biochimique des laits fermentés

2.1.1 Mise en évidence de l'activité protéolytique des bactéries lactiques

Au cours de la fermentation, les bactéries assurent leur croissance en dégradant obligatoirement les protéines du lait en peptides et acides aminés qu'elles utilisent comme source d'azote par le biais des endopeptidase et exopeptidase.

2.1.1.1 Dosage des fonctions α -NH₂ libérées (DOI et *al.*, 1981)

La dégradation des protéines par les enzymes bactériennes libère des fonctions α -NH₂ caractéristiques de la protéolyse. Cette dernière est mesurée par la mesure des fonctions α -NH₂ libérées au cours de la fermentation du lait à 45 °C ; elle est exprimée en μ M/mg de l'échantillon.

Les résultats obtenus (Fig.14), révèlent une importante libération des fonctions α -NH₂ dans tous les laits fermentés.

Au début de la fermentation, les taux initiaux sont les suivants en (μ M/mg): 15,65 \pm 0,4 ; 13,33 \pm 0,3; 10,44 \pm 0,9; 19,23 \pm 2,14 ; 20,8 \pm 1,8 et 8,15 \pm 0,36 respectivement pour E15, E10, E40, Lb et Lp.

Après vingt quatre heures de fermentation à 45 °C, le taux le plus élevé est observé pour Lp 98,62 \pm 5,25; suivi de Lb 90,78 \pm 9,62; E15 63,78 \pm 1,68; E10 54,12 \pm 1,9 et E40 48,23 \pm 2,82 μ M/mg.

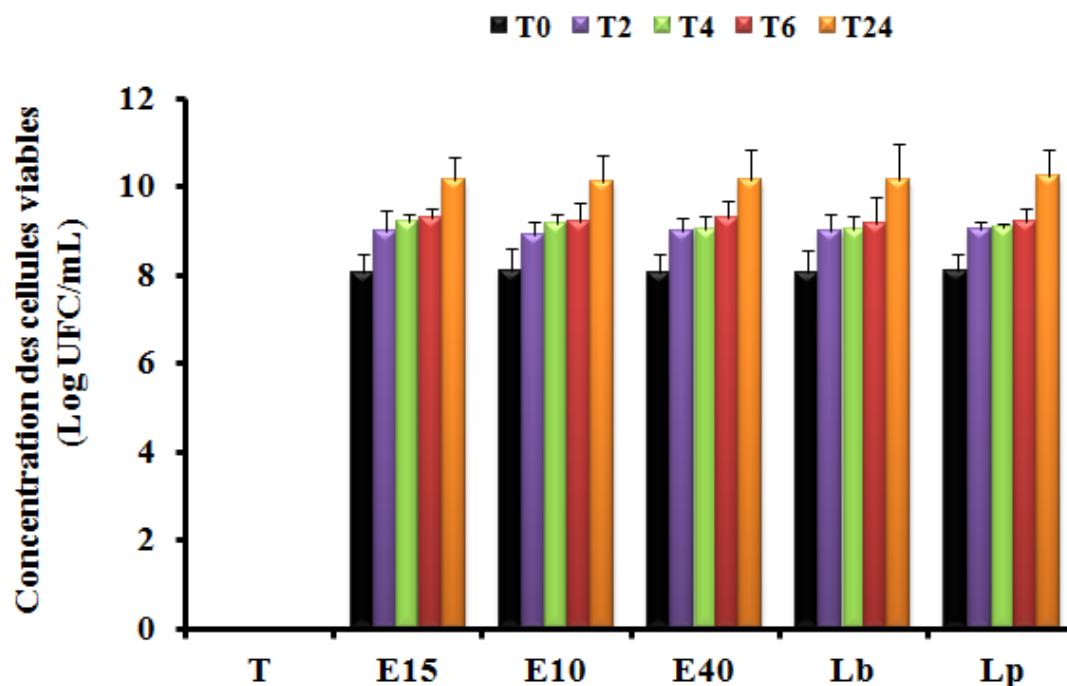


Figure 13: Cinétique de croissance (Log UFC/mL), après fermentation de lait de vache à 45 °C par *Enterococcus faecium* 1 (E15), *Enterococcus faecium* 2 (E10), *Enterococcus durans* (E40), *Lactobacillus brevis* (Lb), *Lactobacillus plantarum* (Lp), T : lait de vache stérile sans ferment (témoin).

T0 : début de la fermentation

T2 : 2 heures

T4 : 4 heures

T6 : 6 heures

T24 : 24 heures

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standards (n=3)

- A la fin de la fermentation (T24), nous notons une forte augmentation de la concentration bactérienne dans les différents laits fermentés.

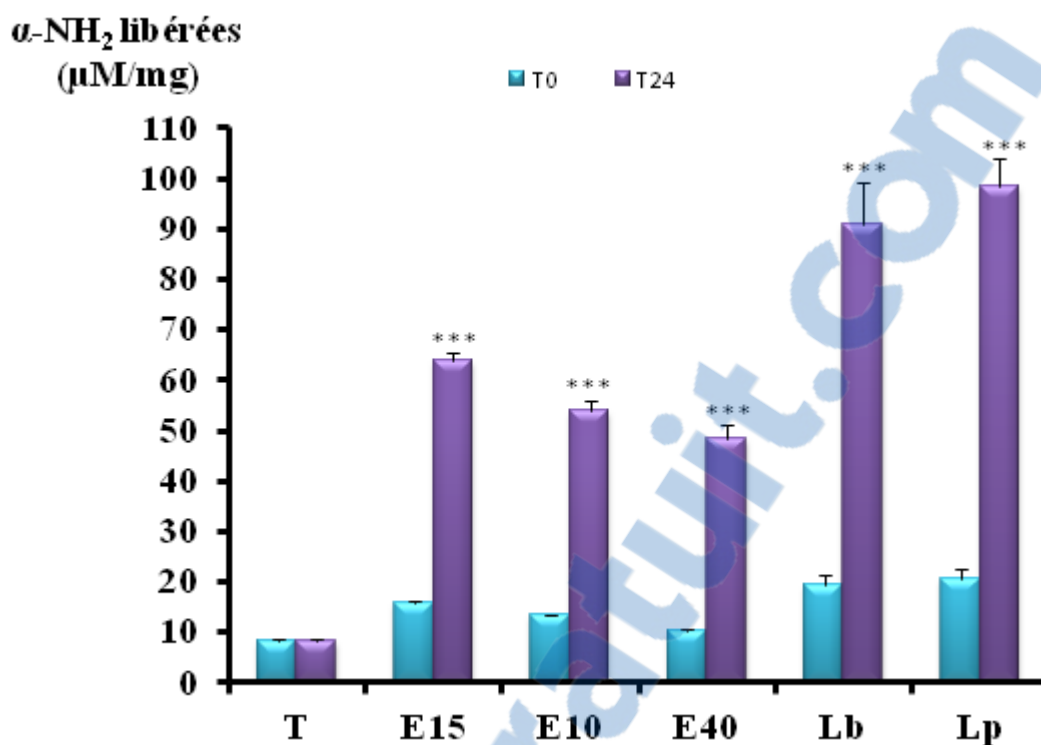


Figure 14: Taux des fonctions α -NH₂ libérées (μ M/mg), après fermentation de lait de vache à 45 °C par *Enterococcus faecium* 1 (E15), *Enterococcus faecium* 2 (E10), *Enterococcus durans* (E40), *Lactobacillus brevis* (Lb), *Lactobacillus plantarum* (Lp), T : lait de vache stérile sans ferment (témoin).

T0 : début de la fermentation

T24 : 24 heures (fin de la fermentation)

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standards (n=5)

- Nous notons une augmentation hautement significative ($p \leq 0.0001$) entre le début (T0) et la fin (T24) de la fermentation dans tous les laits fermentés par les bactéries lactiques.

2.1.1.2 Etude de l'activité protéolytique

2.1.1.2.1 Test sur milieu lait écrémé UHT

L'analyse par électrophorèse SDS-PAGE de l'activité protéolytique des cinq souches (Fig. 15) a montré que *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum* dégradent après 24H de fermentation les caséines, la β -Lg et l' α -Lac. En revanche, chez *Enterococcus faecium*1 (E15) l'activité protéolytique a commencé qu'après 48 heures de la fermentation, caractérisée par une atténuation très importante des bandes électrophorétiques de α_{S2} -caséine, β -caséine et α -Lac. Après 72h de fermentation, cette atténuation devient accentuée jusqu'à la disparition des bandes des caséines et de l' α -Lac.

2.1.1.2.2 Activité protéolytique sur le caséinate de sodium et le lactosérum dénaturé

L'analyse par électrophorèse SDS-PAGE de l'activité protéolytique sur caséinate de sodium et lactosérum dénaturé (Fig.16) est réalisée effectuée uniquement pour les souches qui ont une activité protéolytique très importante après 24 heures de fermentation du lait.

Après 6 heures d'incubation, nous avons observé l'apparition des bandes peptidiques chez *Lactobacillus plantarum*. Nos résultats ont montrés chez *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum*, après 9 heures de fermentation, la disparition de la bande correspondant à la caséine α_{S2} . Le produit de dégradation est matérialisé par l'apparition de nombreuses bandes peptidiques. Après 24 heures d'incubation, nous avons observé une diminution accentuée de la bande des caséines α_{S1} , α_{S2} et β avec apparition des peptides.

Le résultat de l'incubation sur lactosérum dénaturé montre que l'hydrolyse de la β -Lg et l' α -Lac commence après 9 heures d'incubation pour *Lactobacillus plantarum*, tandis que chez *Lactobacillus brevis* l'hydrolyse est observée que pour l' α -Lac. Après 24 heures d'incubation, l'hydrolyse de la β -Lg et l' α -Lac est plus au moins importante pour les deux souches testées.

2.1.1.2.3 Facteurs influençant l'activité protéolytique

Effet du pH

L'analyse par électrophorèse du rôle du pH sur l'hydrolyse des caséines et du lactosérum dénaturé montre que le pH modifie l'hydrolyse de ces protéines.

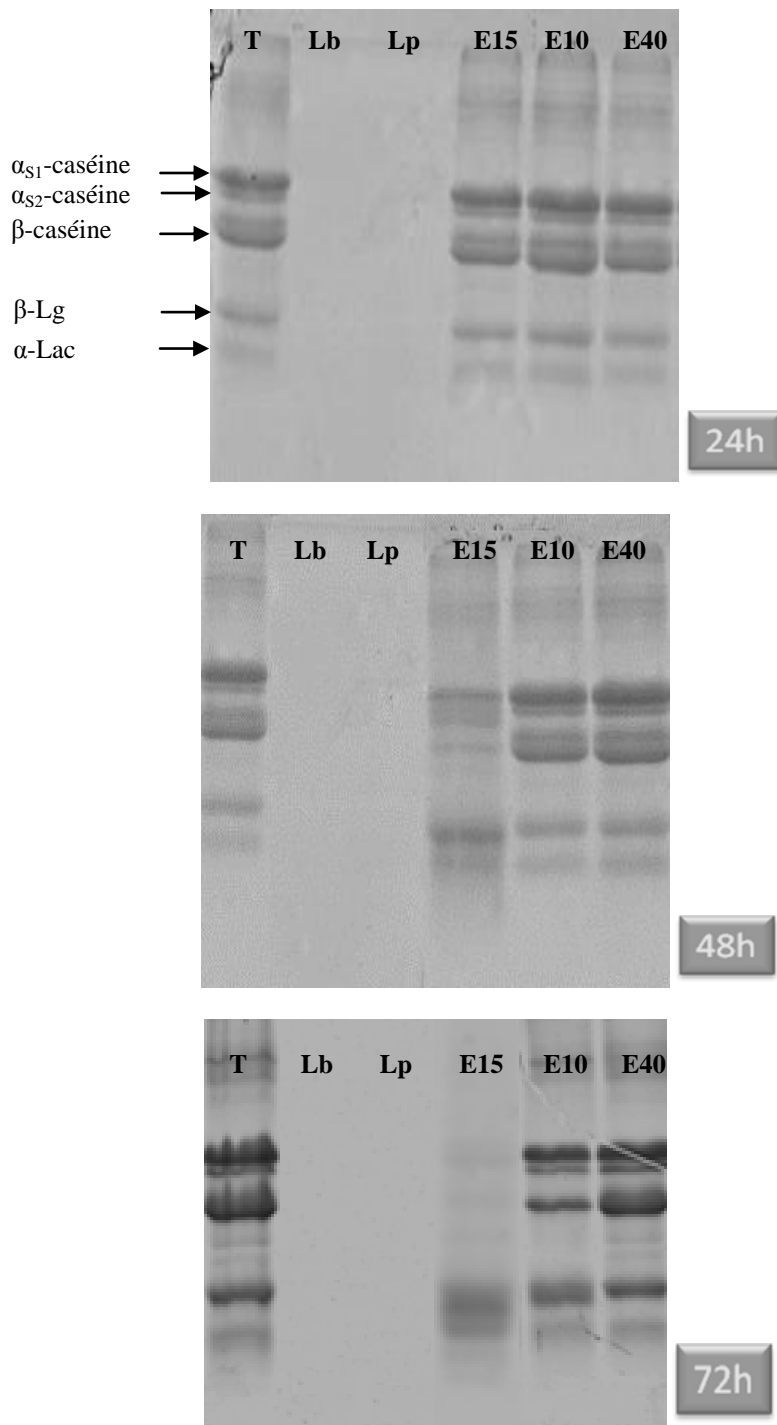


Figure 15 : Electrophorèse SDS-PAGE des hydrolysats issue des bactéries inoculées dans le milieu lait UHT (37°C/24h, 48h et 72h)

- T : Témoin
- Lb : *Lactobacillus brevis*
- Lp : *Lactobacillus plantarum*
- E15 : *Enterococcus faecium 1*
- E10 : *Enterococcus faecium 2*
- E40 : *Enterococcus durans*

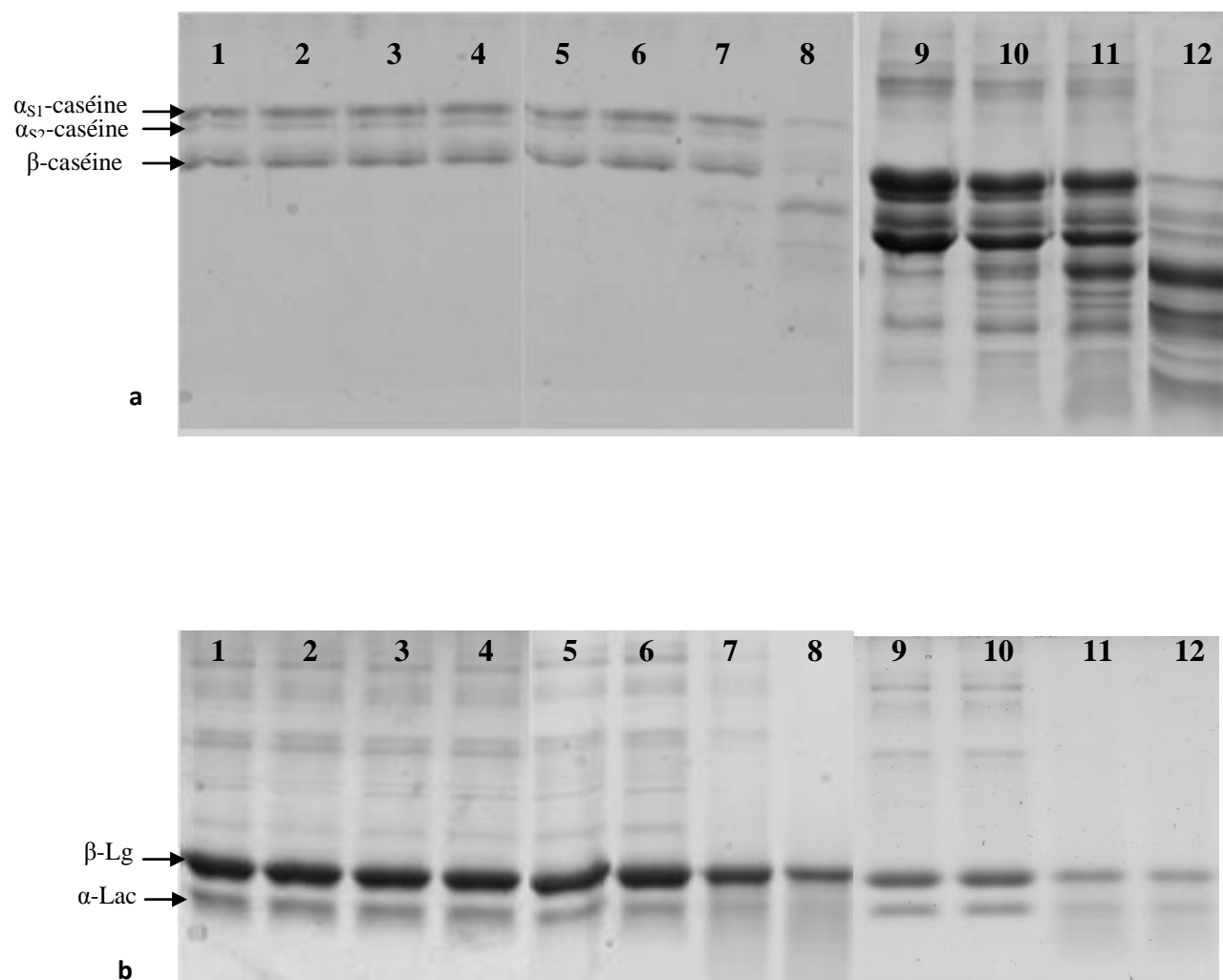


Figure 16 : Electrophorèse SDS-PAGE des hydrolysats issue des bactéries inoculées dans Caséinate de sodium (a) et dans lactosérum dénaturé (b), incubé à 37 °C pendant 3, 6, 9 et 24h.

Puits 1, 2, 3, 4: témoin; **puits 5, 6, 7, 8 :** *Lactobacillus brevis*, **puits 9, 10, 11, 12 :** *Lactobacillus plantarum*.

Nous avons observé (Fig.17) chez *Lactobacillus brevis* une légère hydrolyse des caséines à pH 5.4, 5.7, 6 et pH 6.5. Par contre, nous avons obtenu à pH 7.2 une hydrolyse très poussée voir totale. L'activité protéolytique de la souche *Lactobacillus plantarum* est moins importante à pH 6 et pH 6.5 et plus forte à pH 7.2.

Nous avons observé une hydrolyse totale de l' α -Lac et partielle de la β -Lg à pH 5.4, 5.7, 6, 6.5 pour *Lactobacillus brevis*. Par contre l'activité protéolytique de *Lactobacillus plantarum* est optimale dans les zones proches du pH neutre. La souche *Lactobacillus brevis* dégrade totalement à pH 7.2 la β -Lg et l' α -Lac.

Effet de la température

L'analyse par électrophorèse de l'influence de la température sur l'activité protéolytique des protéases bactériennes montre qu'il y a des différences dans l'hydrolyse des caséines et des protéines de lactosérum après 24 heures d'incubation (Fig.18).

Chez *Lactobacillus brevis*, nous observons à 37 et 45°C une hydrolyse totale des caséines α_{S1} , α_{S2} , β et des protéines de lactosérum. Cette hydrolyse reste très poussée à 30°C, mais elle est moins importante que les deux autres températures.

Chez *Lactobacillus plantarum*, le degré de la protéolyse est très important à 37°C où nous avons observé des bandes peptidiques issues de l'hydrolyse des caséines avec une atténuation accentuée des lactoprotéines bovine. A 30°C nous avons observé une hydrolyse totale de la caséine α_{S2} et partielle de la caséine β avec apparition des bandes peptidiques. Par contre les principales protéines du lactosérum ne semblent pas être affectées. Par ailleurs, à 45°C nous notons une faible hydrolyse de la caséine α_{S2} .

Effet des inhibiteurs

Nous avons testé les inhibiteurs suivant : acide Iodoacétique, phénylméthyl-sulfonyl fluoride et l'acide éthylène diamine tétraacétique. Ce test est pour but de déterminer le type de protéase produit par les bactéries (Fig.19).

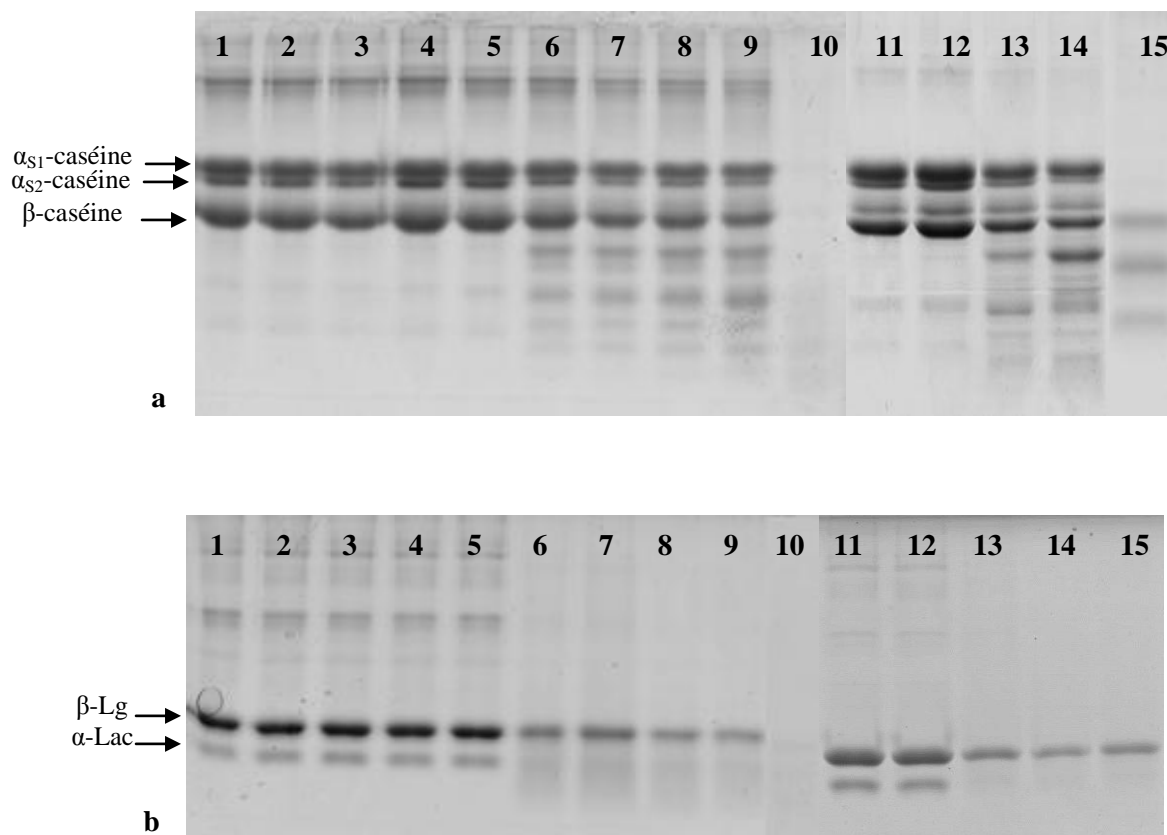


Figure 17: Effet du pH sur l'activité protéolytique chez *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum* après inoculation dans caséinate de sodium (a) et dans lactosérum dénaturé (b) et incubation à 37°C pendant 24H

1 : Témoin pH 5.4, 2 : Témoin pH 5.7, 3 : Témoin pH 6, 4 : Témoin pH 6.5, 5 : Témoin pH 7.2
 6 : *Lactobacillus brevis* pH 5.4, 7 : *Lactobacillus brevis* pH 5.7, 8 : *Lactobacillus brevis* pH 6
 9 : *Lactobacillus brevis* pH 6.5, 10 : *Lactobacillus brevis* pH 7.2, 11 : *Lactobacillus plantarum* pH 5.4, 12 :
Lactobacillus plantarum pH 5.7, 13 : *Lactobacillus plantarum* pH 6, 14 : *Lactobacillus plantarum* pH 6.5,
 15 : *Lactobacillus plantarum* pH 7.2

- Nous notons que le pH optimum d'hydrolyse des protéines bovines chez *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum* est de 7.2.

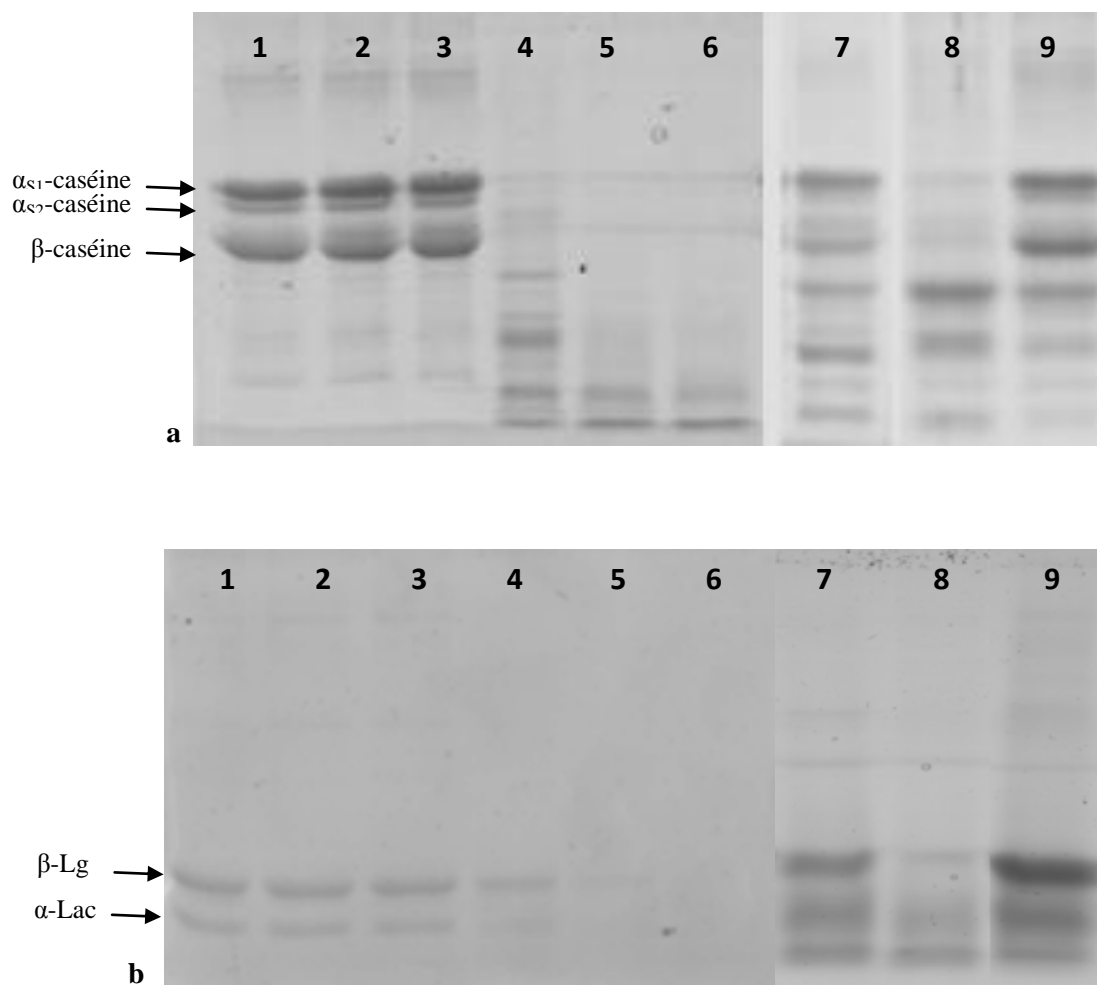


Figure 18: Effet de la température sur l'activité protéolytique des souches inoculées dans caséinate de sodium (a) dans lactosérum dénaturé (b) pendant 24H.

1 : Témoin incubé à 30°C, 2 : Témoin incubé à 37°C, 3 : Témoin incubé à 45°C, 4 : *Lactobacillus brevis* incubé à 30°C, 5 : *Lactobacillus brevis* incubé à 37°C, 6 : *Lactobacillus brevis* incubé à 45°C, 7 : *Lactobacillus plantarum* incubé à 30°C, 8 : *Lactobacillus plantarum* incubé à 37°C, 9 : *Lactobacillus plantarum* incubé à 45°C

- Nous observons que la température optimale chez *Lactobacillus brevis* est entre 37 et 45°C. Par ailleurs, chez *Lactobacillus plantarum* la température optimale est à 37°C

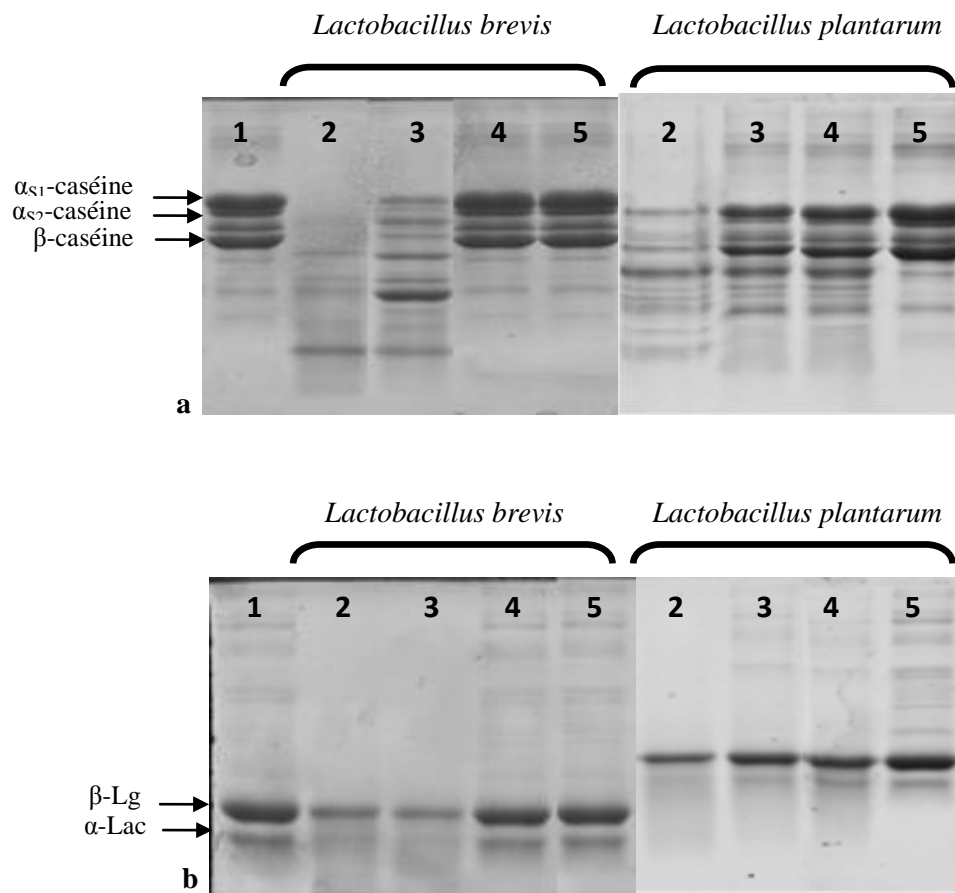


Figure 19: Effet des inhibiteurs sur l'activité protéolytique de *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum*.

(a): caseinate de sodium; (b): lactosérum dénaturé; **1** : T-: caseinate de sodium et lactosérum denature sans souche; **2** : T+: caseinate de sodium et lactosérum denature traité par *Lactobacillus brevis* WD19 et *Lactobacillus plantarum* en absence d'inhibiteur; **3** : IOD: en présence d'acide Iodoacétique, **4** : PMSF: en présence de phénylméthyl-sulfonyl fluorure, **5** : EDTA: en présence d'acide éthylène diamine tétraacétique.

- Nous observons que les protéases sont principalement des métallo- et des sérines protéases chez *Lactobacillus brevis* et des métallo-, des sérines et des cystéines protéase chez *Lactobacillus plantarum*.

A la fin de la période d'incubation, le surnageant des souches et du témoin est analysé par électrophorèse SDS-PAGE. Le profil protéique est comparé en référence avec le témoin.

Les résultats obtenus montrent que les protéases des lactobacilles testées sont principalement des métallo-protéase et sérine protéase par contre l'activité cystéine protéase qui est absente.

2.2 Etude de l'activité antibactérienne

2.2.1 Méthode de diffusion en puits pour la détection de l'activité antibactérienne

Les bactériocines sont produites par les bactéries afin d'inhiber la croissance des autres bactéries. Les bactéries utilisées comme souche cible sont *Listeria ivanovii* et *Lactobacillus sakei*.

Parmi les cinq souches testées, seules les *Enterococcus* montrent une inhibition importante par l'apparition d'une zone claire autour des souches cibles (Fig.20)

2.2.1.1 Action des enzymes digestives

Les cultures bactériennes sont centrifugées, le pH des surnageants est ajusté à pH neutre. Les enzymes suivantes la Protéinase K, la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine ou le pronase E sont ajoutés dans les différents surnageants. Nos résultats montrent que l'activité inhibitrice a disparu et les diamètres des zones d'inhibition sont nuls. Par contre les zones d'inhibition sont toujours détectées dans les surnageants contenant la catalase, la lipase ou l' α -amylase. Ces résultats montrent que les substances inhibitrices contenues dans le surnageant sont de nature protéique (Tab. 12).

2.2.1.2 Effet de la température

L'activité antibactérienne d'*Enterococcus faecium* (E15), *Enterococcus faecium* (E10) et *Enterococcus durans* reste stable vis-à-vis de *Lactobacillus sakei* à 100°C pendant 10 et 30 min. cette activité persiste après autoclavage à 121°C pendant 15min. De même l'activité antibactérienne de ces trois souches reste stable à 100°C vis-à-vis de *Listeria ivanovii*, par contre cette activité disparaît après autoclavage à 121°C pendant 15min. Ce qui indique que nos souches sont thermostables (Tab.13).

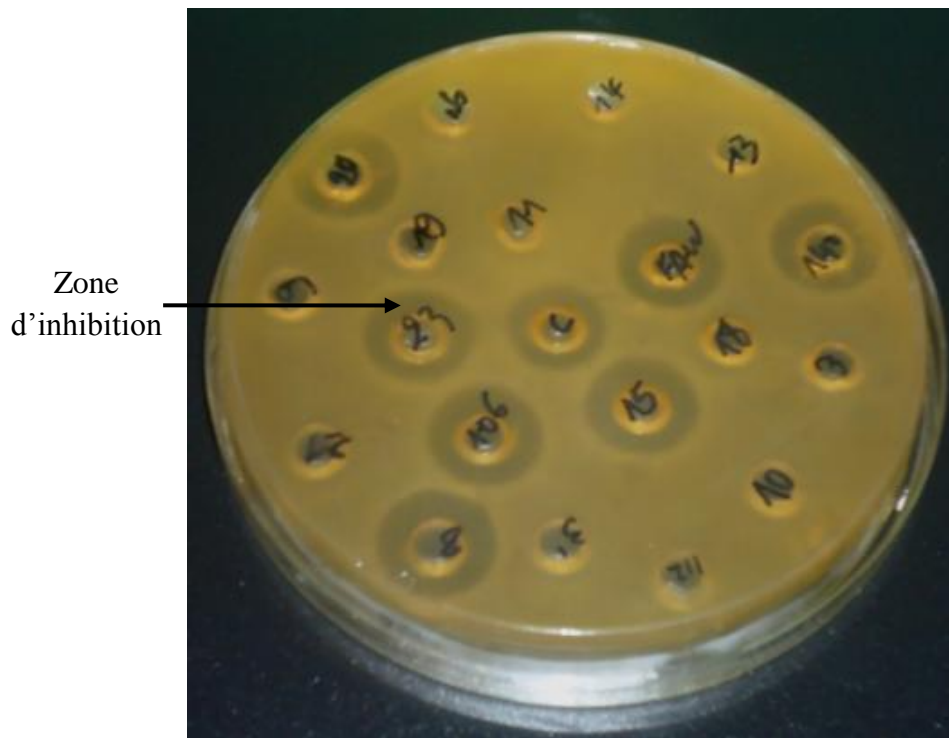


Figure 20 : Inhibition de *Listeria ivanovii* par *Enterococcus*
15 : *E.faecium*1, 106 : *E.faecium*2, 140 : *E.durans*

Tableau 12: Effet des enzymes sur l'activité antibactérienne des différentes souches

	<i>Latobacillus sakei</i>			<i>Listeria ivanovii</i>		
	1	2	3	1	2	3
Protéinase K	-	-	-	-	-	-
Trypsine	-	-	-	-	-	-
α-chymotrypsine	-	-	-	-	-	-
Pepsine	-	-	-	-	-	-
Pronase E	-	-	-	-	-	-
Lipase	+	+	+	+	+	+
α-amylase	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+

1 : *Enterococcus faecium* W15

2 : *Enterococcus faecium* W10

3 : *Enterococcus durans*

+ : Présence de zone d'inhibition

- : Absence de zone d'inhibition

Tableau 13: Effet de la température sur l'activité antibactérienne des différentes souches

	<i>Lactobacillus sakei</i>			<i>Listeria ivanovii</i>		
	100°C/10min	100°C/30min	121°C/20min	100°C/10min	100°C/30min	121°C/20min
<i>Enterococcus faecium</i> 1	+	+	+	+	+	-
<i>Enterococcus faecium</i> 10	+	+	+	+	+	-
<i>Enterococcus durans</i>	+	+	+	+	+	-

2.2.1.2 Effet du pH

Le pH ne semble pas représenter un facteur limitant, puisque nos résultats indiquent que l'activité antibactérienne vis-à-vis les deux souches cibles reste stable sur une large gamme de pH entre 2 et 10 (Tab. 14).

2.2.2 Spectre d'activité antibactérienne vis-à-vis deux souches indicatrices

Un large spectre d'activité antibactérienne vis-à-vis *Lactobacillus sakei* est obtenu chez la souche *E. faecium* (E10) par rapport à *Enterococcus faecium* (E15) et *Enterococcus durans* (Tab.15). Ce spectre est identique chez les trois *Enterococcus* lorsqu'elles sont testées vis-à-vis de *Listeria ivanovii*.

2.2.3 Le spectre d'activité antimicrobienne de différentes souches testées vis-à-vis des bactéries pathogènes

Toutes les souches testées inhibent la croissance des souches pathogène suivantes : *Carnobacterium maltaromaticum* CIP 103135, *Carnobacterium piscicola* S4312, *Enterococcus faecalis* JH2-2, *Enterococcus faecalis* JH2-2 rr 04, *Enterococcus faecium* P13, *Listeria grayi* CLIP 12518, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes* et *Vagococcus penaei* CIP 109914^T. Par ailleurs, *Escherichia coli* ATCC25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sont inhibées que par *Enterococcus faecium*2 (E10) et *Enterococcus durans* (Tab.16).

2.2.4 Caractérisation des entérocoques par PCR

Deux souches d'*Enterococcus faecium* ont montré leurs capacités de produire deux bactériocines identifiées comme étant une entérocoque A et une entérocoque B. En revanche, *Enterococcus durans* a montré sa capacité de produire l'entérocoque P et l'entérocoque 31 (Fig.21).

Tableau 14 : Effet du pH sur la stabilité de l'activité antibactérienne des différentes souches

	<i>Lactobacillus sakei</i>					<i>Listeria ivanovii</i>				
	pH2	pH4	pH6	pH8	pH10	pH2	pH4	pH6	pH8	pH10
<i>Enterococcus faecium 15</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecium 10</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus durans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 15: Spectre d'activité antibactérienne vis-à-vis deux souches indicatrices

Souches	Activité antibactérienne (UA/ml)	
	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Listeria ivanovi</i>
<i>Enterococcus faecium w15</i>	640	640
<i>Enterococcus faecium w10</i>	1280	640
<i>Enterococcus durans</i>	640	640

Tableau 16 : Spectre d'activité antimicrobienne de différentes souches vis-à-vis les bactéries pathogènes

Souches indicatrices	Sources	Conditions de croissance (h/°C)	Activité antimicrobienne ^c		
			E15	E10	E40
<i>Bacillus subtilis</i> 168 T	ONIRIS, Nantes ^a	37 °C/24 h	-	-	-
<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20171 ^T	ONIRIS, Nantes	25 °C/24 h	-	-	-
<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSMZ 20599	ONIRIS, Nantes	25 °C/24 h	-	-	-
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> CIP 103135 ^T	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	+++	+++	+++
<i>Carnobacterium piscicola</i> S4312	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	++	++	++
<i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2	ONIRIS, Nantes	37 °C/24 h	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2 rr 04	ONIRIS, Nantes	37 °C/24 h	+	+	+
<i>Enterococcus faecium</i> CTC492/t136 2	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> P13	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	+++	+++	+++
<i>Esherichia coli</i> ATCC25922	Hopital, Oran	37 °C/24 h	-	++++	++++
<i>Listeria innocua</i> 1	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	+++	+++	+++
<i>Listeria innocua</i> CIP 80.11 ^T	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	++	+++	++
<i>Listeria innocua</i> F	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	+++	+++	+++
<i>Listeria innocua</i> P	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	+++	+++	+++
<i>Listeria ivanovii</i>	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	++	++	++
<i>Listeria ivanovii</i> CIP 78.42 T	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	++	++	++
<i>Listeria monocytogenes</i>	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	-	-	-

<i>Listeria monocytogenes</i> CIP 78.35	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	+++	++++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> DSM 12464	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	++++	++++	++++
<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	++	++	++
<i>Listeria monocytogenes</i> RF124	IFREMER, Nantes ^b	30 °C/24 h	+++	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> RF125	IFREMER, Nantes	30 °C/24 h	+++	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> RF131	IFREMER, Nantes	30 °C/24 h	+++	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> RF132	IFREMER, Nantes	30 °C/24 h	+++	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> RF133	IFREMER, Nantes	30 °C/24 h	+++	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> RF142	IFREMER, Nantes	30 °C/24 h	+++	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> RF151	IFREMER, Nantes	30 °C/24 h	+++	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> RF152	IFREMER, Nantes	30 °C/24 h	+++	+++	+++
<i>Moelleralla wisconsensis</i> MIP 2451	ONIRIS, Nantes	20 °C/24 h	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Hopital, Oran	37 °C/24 h	-	+++	++++
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 10	ONIRIS, Nantes	28 °C/24 h	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i>	ONIRIS, Nantes	37 °C/24 h	-	-	-
<i>Salmonella montevideo</i>	ONIRIS, Nantes	37 °C/24 h	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	ONIRIS, Nantes	37 °C/24 h	-	-	-

<i>Serratia liquefaciens</i> CIP 103238 ^T	ONIRIS, Nantes	25 °C/24 h	-	-	-
<i>Vagococcus penaei</i> CIP 109914 ^T	ONIRIS, Nantes	30 °C/24 h	+	+	+

^a ONIRIS: Ecole Nationale Nantes Atlantique Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes, France

^b IFREMER: Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, Nantes, France

^c puits (5 mm de diamètre) remplis avec 50µl de surnageant. Diamètre de la zone d'inhibition (mm). -, pas de zone d'inhibition; +, zone < 3 mm; ++, zone 3-6 mm; +++, zone 7-10 mm; +++++, zone > 10 mm.

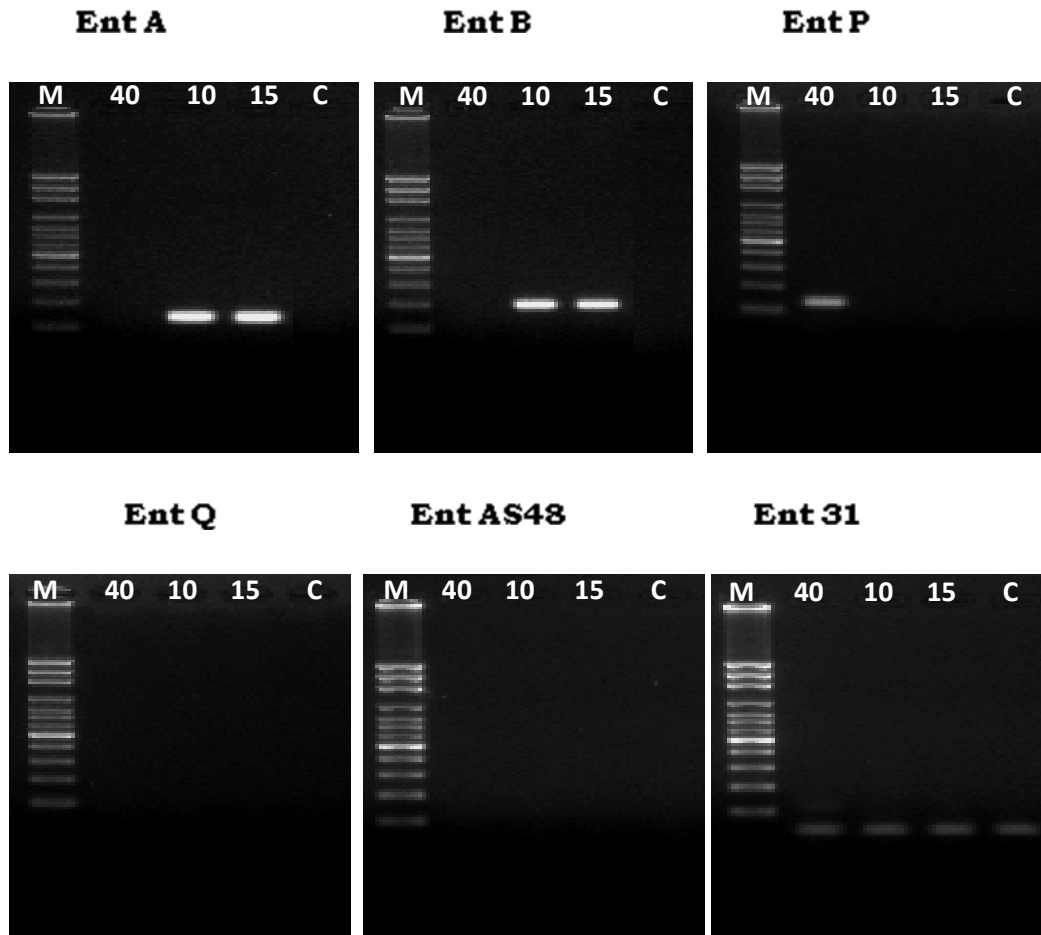


Figure 21 : détection des gènes codant des entérocinés

M : marqueur de taille, **40** : *E. durans*; **10** : *E. faecium* 2; **15** : *E. faecium* 1, **C** : témoin sans souche.

- On note la présence des entérocinés A et B chez *Enterococcus faecium* 15 et 10, les entérocinés P et 31 sont présentes chez *Enterococcus durans*.

2.3 Mise en évidence *in vitro* de quelques propriétés probiotiques

2.3.1 Résistance aux conditions gastro-intestinales simulées

2.3.1.1 Test de résistance des bactéries lactiques à pH acide

La survie des souches aux conditions drastiques du tube digestif représente un des caractères des probiotiques. Pour cela, l'étude de l'exposition prolongée des souches aux conditions acides similaires à celles de l'estomac est réalisée par incubation de ces derniers à différents pH pendant 3 heures.

D'après les résultats obtenus, les lactobacilles résistent mieux que les entérocoques dans les conditions acides (Fig. 22).

Nous observons que les 5 souches que nous avons testé, résistent à pH 3 pendant 3h d'incubation à 37 °C (Fig. 22a). Par contre elles résistent uniquement pendant deux heures à pH 2 (Fig. 22b).

2.3.1.2 Résistance aux sels biliaires

Les cinq souches testées présentent une résistance très différente à l'exposition aux sels biliaires. Ainsi, les souches *Lb. plantarum* et *Lb. brevis* présentent une très bonne résistance. Les trois souches restantes présentent une faible survie, en particulier les souches *E. faecium* (E10) et *E. durans*.

La viabilité des souches probiotiques après un stress biliaire 0,3% pendant 4 h sont présentées dans la figure 23.

Au début de l'exposition des souches aux stress acide biliaire, les taux de croissance bactérienne représentait 80,48% (E15), 61,33% (E10), 63,85% (E40), 97,23% (Lb), 99,19% (Lp). A la fin de l'exposition, les taux de croissance bactérienne atteind les valeurs suivantes : 54,51% (E15), 45,24% (E10), 48,6% (E40), 86,21% (Lb), 95,02% (Lp).

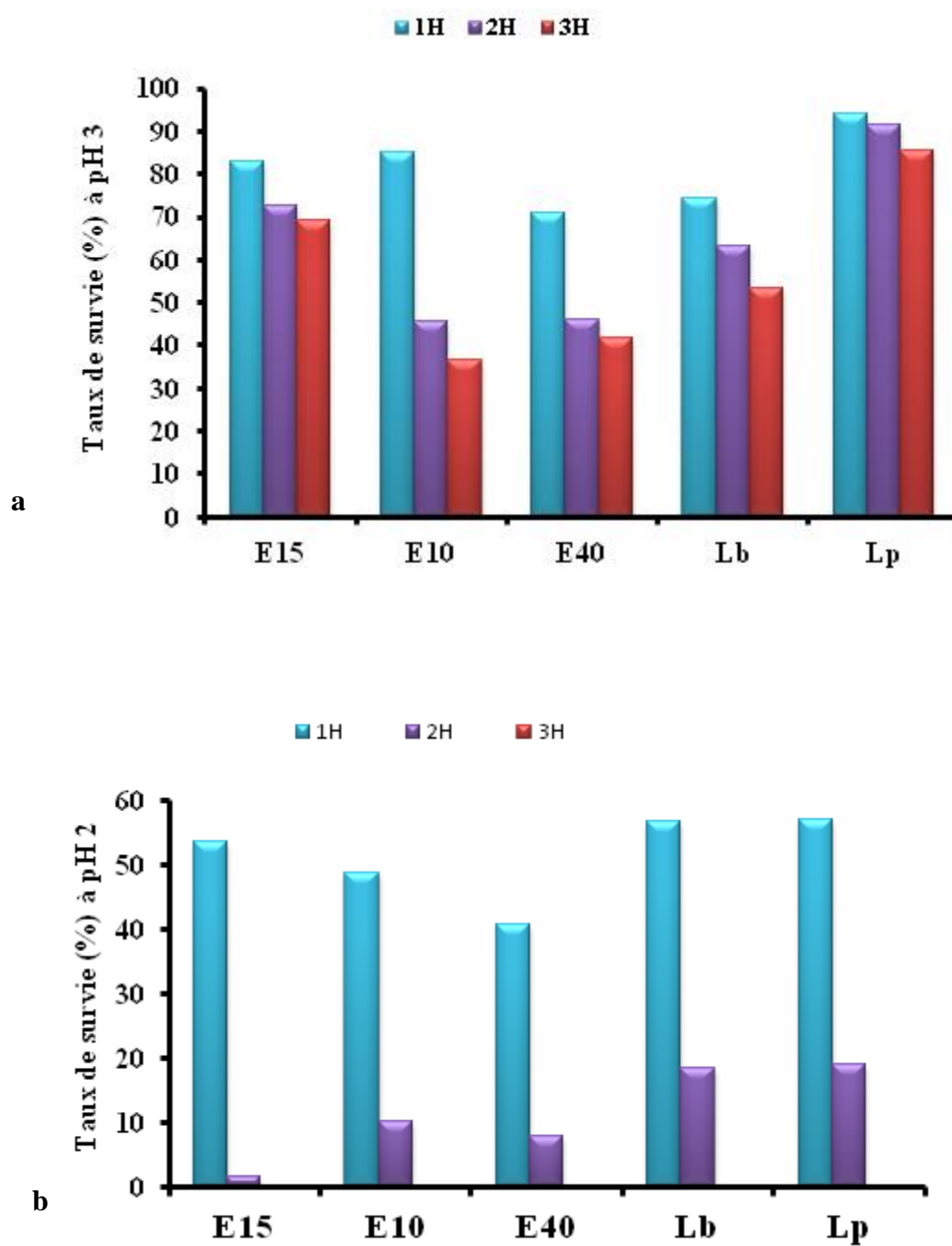


Figure 22 : Résistance des bactéries lactiques à pH acide (pH2, pH3) pendant 180 min d'incubation à 37 °C.

E15: *Enterococcus faecium* W15, **E10:** *Enterococcus faecium* W10,

E40: *Enterococcus durans*, **Lb:** *Lactobacillus brevis*, **Lp:** *Lactobacillus plantarum*.

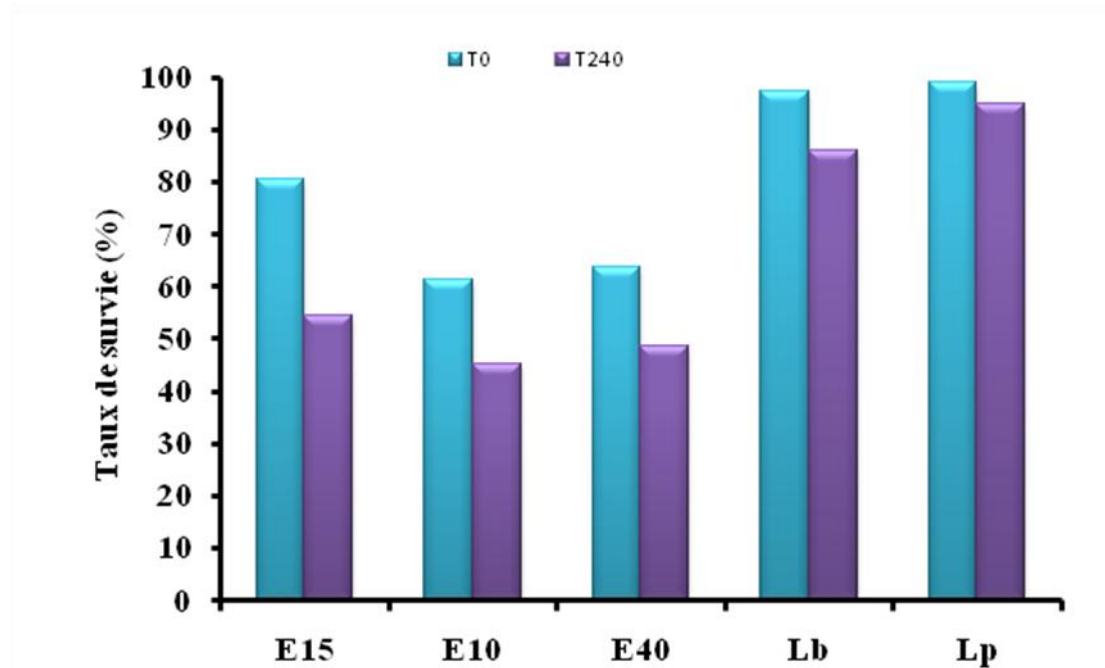


Figure 23 : Résistance des bactéries lactiques aux sels biliaires (0,3%) pendant 240 min d'incubation à 37 °C.

E15: *Enterococcus faecium* W15, **E10:** *Enterococcus faecium* W10,

E40: *Enterococcus durans*, **Lb:** *Lactobacillus brevis*, **Lp:** *Lactobacillus plantarum*.

2.3.2 Test d'hémolyse

Pour déterminer le type d'hémolyse chez les cinq souches nous avons utilisé une gélose au sang cuit. Les résultats obtenus montrent une absence d'halo qui représente un gamma hémolyse indiquant que les souches ne sont pas pathogènes (Fig.24).

2.3.3 Résistance aux antibiotiques

Enterococcus faecium (E15) et *Enterococcus faecium* (E10) sont sensibles à l'ampiciline, à la péniciline, à la tétracycline et au chloramphénicol par contre elles sont résistantes à la gentamicine. *Enterococcus durans* est sensible à l'ampiciline, à la péniciline, à la tétracycline par contre elle est résistante à la gentamicine et au chloramphénicol. En revanche, on note chez les lactobacilles une sensibilité vis-à-vis tous les antibiotiques testés (Tab.17).

2.3.4 Gène de virulence

Le potentiel de pathogénécité des souches d'*Enterococcus* est évalué par la recherche d'une éventuelle présence de 5 gènes codant pour les facteurs de virulence: *asal*, *Esp*, *ace*, *efafs*, *Cyl A*.

D'après nos résultats (Tab.18), toutes les souches testées présentent le gène de virulence responsable substance d'aggregation (*asal*) et l'antigène de surface d'*Enterococcus* (*efafs*).

Par contre les gènes suivants, Cytolysine (*cylA*), Protéine de surface d'*Enterococcus* (*esp*) et de l'adhésine du collagène (*ace*) sont absents chez toutes les souches.

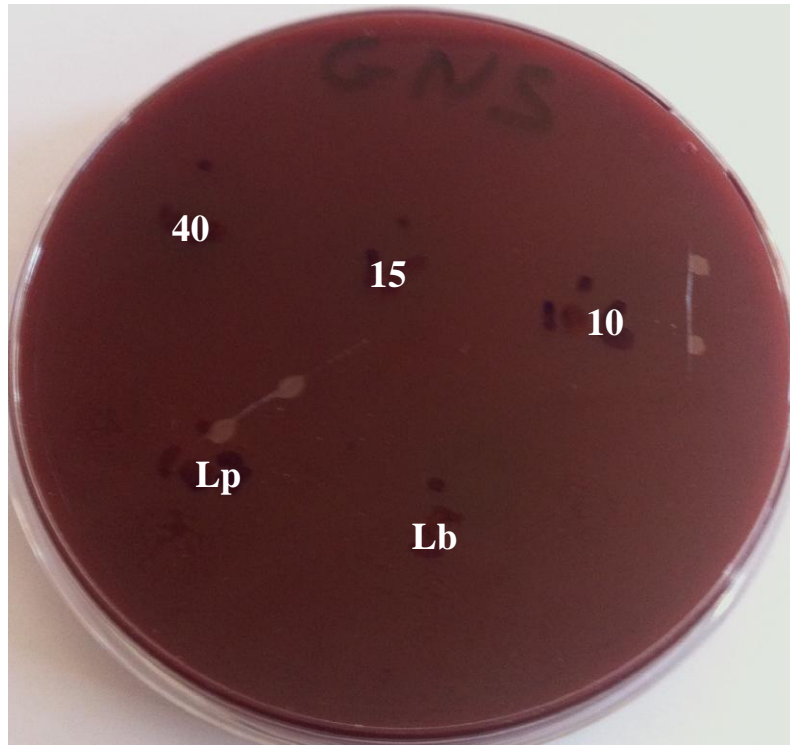


Figure 24 : Test de type d'hémolyse des bactéries lactiques isolées sur gélose au sang.

15 : *E.faecium1*, **10** : *E.faecium2*, **40** : *E.durans*, **Lp** : *L.plantarum*, **Lb** : *L.brevis*

Nous notons une absence d'hémolyse chez toutes les souches testées

Tableau 17 : Test de sensibilité vis-à-vis les antibiotiques

Souches \ ATB	<i>L.plantarum</i>	<i>L.brevis</i>	<i>E.faecium1</i>	<i>E.faecium2</i>	<i>E.durans</i>
Ampicilline	S	S	S	S	S
Pénicilline	S	S	S	S	S
Gentamicine	S	R	R	R	R
Tétracycline	S	S	S	S	S
Chloramphénicol	S	S	S	S	R

CMI : Concentration minimale d'inhibition selon EFSA (2008)

S : sensible, **R :** résistante

Tableau 18: Détection de différents gènes de virulence chez les différentes souches

gène de virulence \ souches	Gene de virulence				
	<i>asal</i>	<i>Esp</i>	<i>ace</i>	<i>efafs</i>	<i>Cyl A</i>
<i>E.faecium W15</i>	+	-	-	+	-
<i>E.faecium W10</i>	+	-	-	+	-
<i>E.durans W40</i>	+	-	-	+	-

Toutes nos souche présentent deux gènes de virulences (*asal* et *efafs*)



3 Etude de la modulation de la réponse allergénique chez les souris Balb/c

3.1 Titres sériques en anticorps anti β -Lg et anti α -Lac

3.1.1 Titre des anticorps IgG sériques anti β -Lg et anti α -Lac

Les animaux sont sacrifiés au 35^{ème} jour et nous avons évalué le titre des immunoglobulines suivantes IgG, IgG1, IgG2a et IgE dirigées contre la β -Lg et l' α -Lac.

Les titres en IgG sériques anti β -Lg sont de 1/262000^{ème} chez le groupe de souris témoin positif et respectivement de 1/64^{ème}, 1/550^{ème}, 1/550^{ème}, 1/73^{ème}, 1/91^{ème}, chez les groupes de souris intubées avec les bactéries lactiques *Enterococcus faecium* (E15), *Enterococcus faecium* (E10), *Enterococcus durans* (E40), *Lactobacillus brevis* (Lb) et *Lactobacillus plantarum* (Lp) (Fig. 25).

Les titres en IgG sériques anti α -Lac sont de 1/4000^{ème} chez le groupe de souris témoin positif et de 1/73^{ème}, 1/550^{ème}, 1/54^{ème}, 1/82^{ème}, 1/45^{ème}, chez les groupes de souris intubées avec les bactéries lactiques E15, E10, E40, Lb et Lp respectivement (Fig. 26).

Ces résultats montrent que la production des IgG anti β -Lg et α -Lac est atténuée chez les animaux ayant reçu au préalable par voie orale des différentes souche de bactéries lactiques ($p < 0.0001$).

3.1.2 Titre des anticorps IgE sériques anti β -Lg

Nos résultats indiquent que les souris du groupe témoin positif présentent une réponse IgE anti β -Lg positive, titrant 1/82^{ème} (Fig. 27).

Chez le groupe témoin positif sensibilisé à l' α -lac, les titres en IgG sériques anti- α -Lac sont de 1/46^{ème} (Fig. 28).

D'autre part, nous constatons que les titres en IgE sérique anti- β -Lg ou α -Lac, dans les sérums des groupes de souris intubées respectivement avec la souche E15, E10, E40, Lb et Lp, sont significativement plus faible ($p \leq 0,0001$) par rapport au groupe intubé avec une solution saline.

Par ailleurs, nous ne notons aucune différence significative entre les groupes intubés avec les bactéries lactiques puis sensibilisés à la β -Lg ou à l' α -Lac.

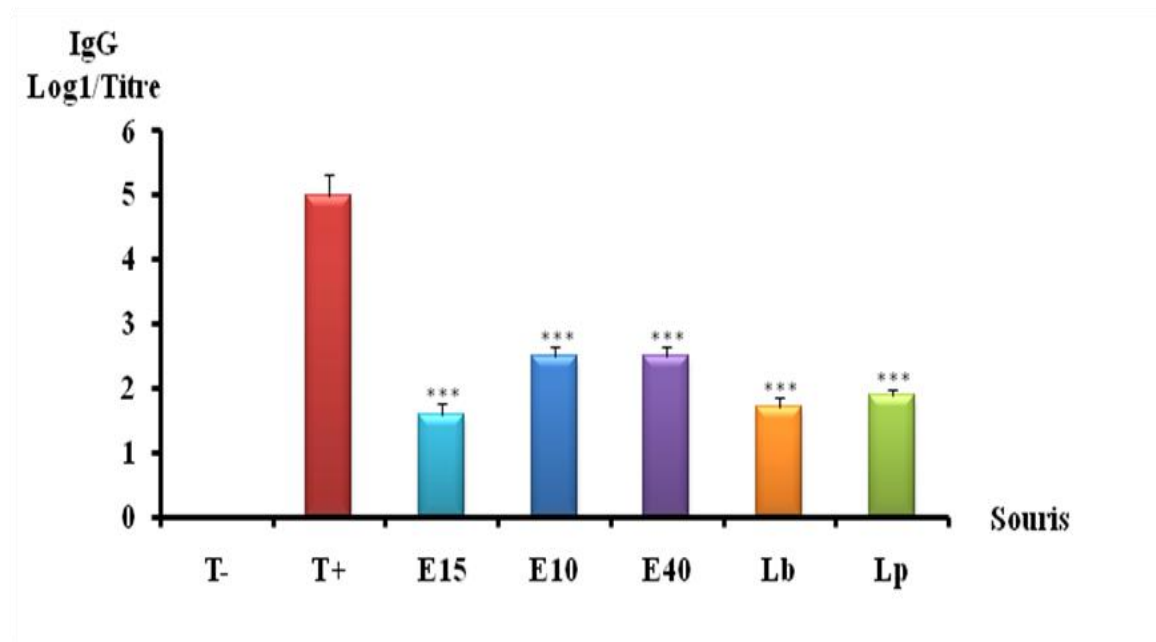


Figure 25 : Titres en anticorps IgG sériques anti β -Lg mesurés chez les souris colonisées par les différentes souches bactériennes, les souris témoins négatif et positif (n=10) sacrifiés au 35^{ème} jour.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à la β -Lg

E15 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w15* puis sensibilisé à la β -Lg

E10 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w10* puis sensibilisé à la β -Lg

E40 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus durans* puis sensibilisé à la β -Lg

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à la β -Lg

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à la β -Lg

*** : E15 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : E15 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ;

*** : E40 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : Lb vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : Lp vs T+ ($p \leq 0,0001$)

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standards (n=10)

Nous notons que :

- Les IgG sériques anti β -lg ne sont pas détectables chez le groupe témoin négatif.
- Le titre IgG sériques anti β -lg chez le groupe témoin positif a augmenté significativement par rapport à E15, E10, E40, Lb et Lp ($p \leq 0,0001$).
- La différence est très significatif en titres IgG sérique anti β -lg chez les groupes E15, Lb et Lp par rapport aux autres groupes expérimentaux (E10, E40) ($0,001 \leq p \leq 0,01$).

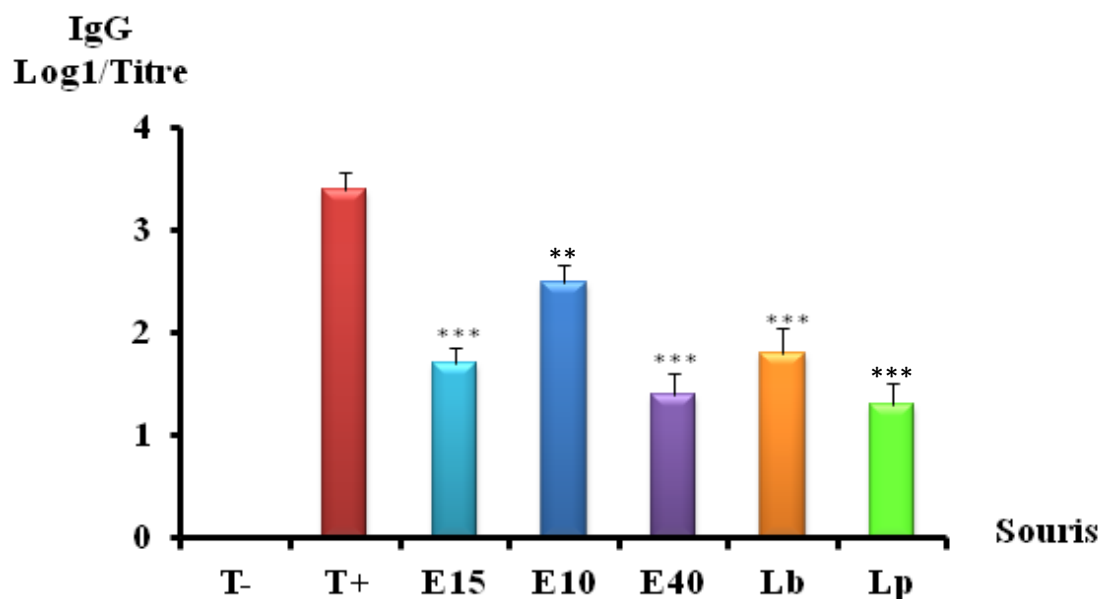


Figure 26 : Titres en anticorps IgG sériques anti α -Lac mesurés chez les souris colonisées par les différentes souches bactériennes, les souris témoins négatif et positif (n=10) sacrifiés au 35^{ème} jour.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à l' α -lac

E15 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium* w15 puis sensibilisé à l' α -lac

E10 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium* w10 puis sensibilisé à l' α -lac

E40 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus durans* puis sensibilisé à l' α -lac

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à l' α -lac

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à l' α -lac

*** : E15 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; ** : E10 vs T+ ($0,001 \leq p \leq 0,01$) ;

*** : E40 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : Lb vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : Lp vs T+ ($p \leq 0,0001$)

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standards (n=10)

Nous notons que :

- Les IgG sériques anti α -lac ne sont pas détectables chez le groupe témoin négatif.
- Le titre IgG sériques anti α -lac chez le groupe témoin positif a augmenté significativement par rapport à E15, E10, E40, Lb et Lp ($p \leq 0,0001$).
- Une augmentation très significative en titres IgG sérique anti α -lac chez le groupe intubé avec E10 par rapport à E15, E40 et Lp ($p \leq 0,0001$). Cette augmentation est significative par rapport à Lb ($p < 0,05$).

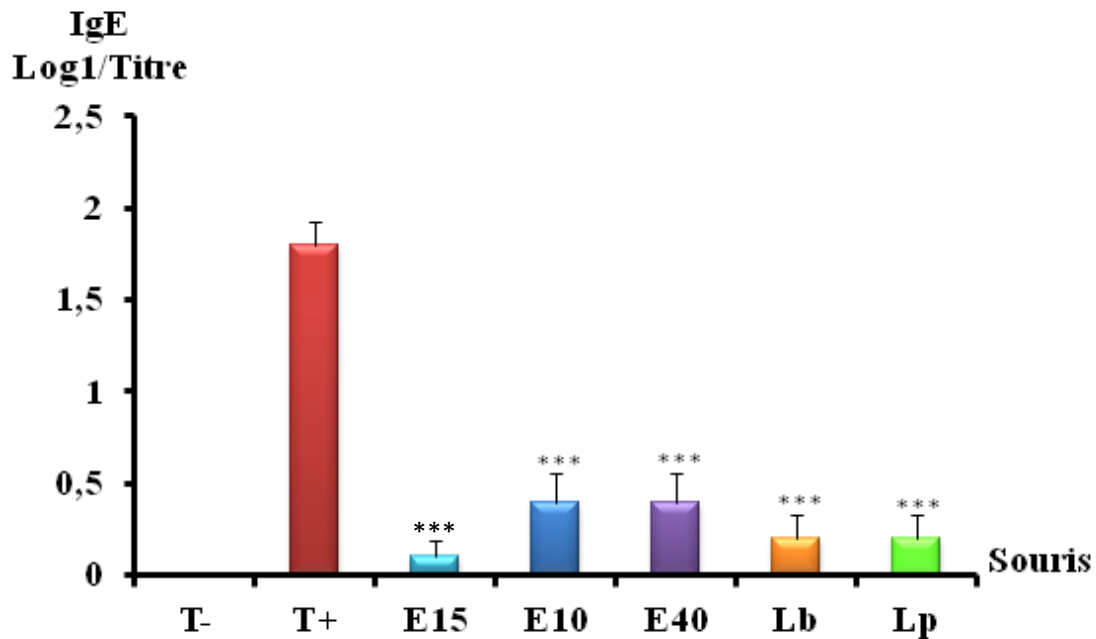


Figure 27 : Titres en anticorps IgE sériques anti β -Lg mesurés chez les souris colonisées par les différentes souches bactériennes, les souris témoins négatif et positif (n=10) sacrifiés au 35^{ème} jour.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à la β -Lg

E15 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w15* puis sensibilisé à la β -Lg

E10 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w10* puis sensibilisé à la β -Lg

E40 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus durans* puis sensibilisé à la β -Lg

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à la β -Lg

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à la β -Lg

*** : E15 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : E15 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ;

*** : E40 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : Lb vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : Lp vs T+ ($p \leq 0,0001$)

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standards (n=10)

Nous notons que :

- Les IgE sériques anti β -lg ne sont pas détectables chez le groupe témoin négatif.
- Le titre IgE sériques anti β -lg de E15, E10, E40, Lb et Lp sont diminués par rapport au témoin positif ($p \leq 0,0001$).

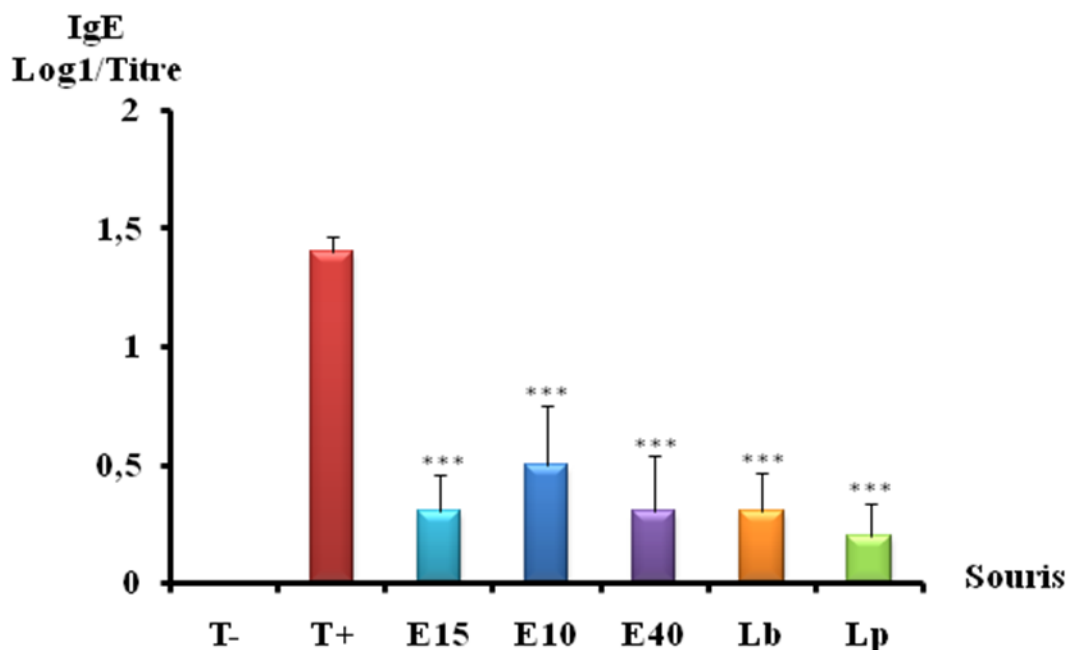


Figure 28 : Titres en anticorps IgE sériques anti α -lac mesurés chez les souris colonisées par les différentes souches bactériennes, les souris témoins négatif et positif (n=10) sacrifiés au 35^{ème} jour.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à l' α -lac

E15 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w15* puis sensibilisé à l' α -lac

E10 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w10* puis sensibilisé à l' α -lac

E40 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus durans* puis sensibilisé à l' α -lac

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à l' α -lac

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à l' α -lac

*** : E15 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : E15 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ;

*** : E40 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : Lb vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : Lp vs T+ ($p \leq 0,0001$)

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standards (n=10)

Nous notons que :

- Les IgE sériques anti α -Lac ne sont pas détectables chez le groupe témoin négatif.
- Le titre IgE sériques anti α -Lac est significativement plus faible chez les différents groupes intubés avec les bactéries lactiques par rapport au groupe témoin positif ($p \leq 0,0001$).

3.1.3 Titre des anticorps IgG1 sériques anti β -Lg

Nos résultats montrent que les teneurs sériques en IgG1 anti β -Lg et anti α -Lac sont très élevés chez le groupe témoin positif, car elles titrent $1/4600^{\text{ème}}$ et $1/550^{\text{ème}}$ respectivement. Par contre, chez les groupes intubés avec E15, E10, E40, Lb et Lp; les titres sont très faibles et la différence avec le groupe témoin positif est hautement significative ($p < 0,0001$) (Fig. 29, 31).

3.1.4 Titre des anticorps IgG2a sériques anti β -Lg

Le niveau sérique de production des IgG2a anti β -Lg et anti α -Lac est significativement élevé (Fig. 30, 32) chez le groupe témoin positif par rapport au groupe intubé avec les bactéries lactiques. Les titres sont de $1/424^{\text{ème}}$ pour les IgG2a anti β -Lg et de $1/64^{\text{ème}}$ pour IgG2a anti α -Lac ($p < 0,0001$).

3.1.5 Analyse de la réponse immune des souris à partir du rapport IgG1/IgG2a

Il est admis que le rapport IgG1/IgG2a est parmi les paramètres qui renseignent sur le type de réponse immune développée par les animaux après une immunisation.

Les rapports IgG1/IgG2a sont de 1,7 et de 1,56 respectivement pour les souris immunisées à la β -Lg et pour les souris immunisées à l' α -Lac.

Ces rapports étant supérieurs à 1. Ce résultat indique que les souris du groupe témoin positif ont développé une réponse immunitaire à prédominance Th2. Par ailleurs, ce rapport est inférieur à 1 chez les groupes des souris intubées avec *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum*, développant une réponse de type Th1.

3.2 Dénombrement des bactéries lactiques au niveau du chyme intestinal et des selles de souris

L'évaluation de l'effet des souches intubées par voie intra gastrique sur la prolifération des bactéries lactiques au niveau du chyme intestinal et des fèces est représentée dans les figures 33, 34, 35, 36.

Prolifération de bactéries lactiques au niveau de la muqueuse intestinale

Nos résultats montrent que toutes les souches testées, augmentent le nombre de bactéries lactiques au niveau de la muqueuse mais à des niveaux différents. Les valeurs obtenues sont comparées par rapport aux témoins positifs (Fig. 33, 34).

Le nombre des bactéries lactiques (15×10^7 , 94×10^6) chez les groupes intubés avec *Lactobacillus brevis* puis immunisés à la β -Lg ou l' α -Lac est très élevé. Chez

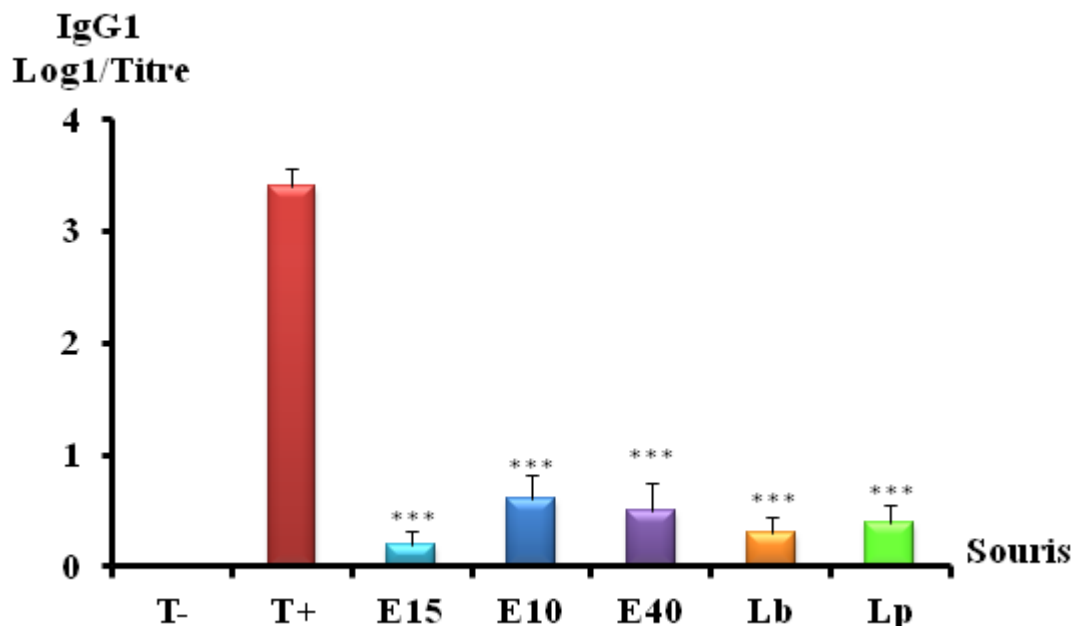


Figure 29 : Titres en anticorps IgG1 sériques anti β -Lg mesurés chez les souris colonisées par les différentes souches bactériennes, les souris témoins négatif et positif (n=10) sacrifiés au 35^{ème} jour.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à la β -Lg

E15 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w15* puis sensibilisé à la β -Lg

E10 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w10* puis sensibilisé à la β -Lg

E40 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus durans* puis sensibilisé à la β -Lg

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à la β -Lg

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à la β -Lg

*** : E15 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : E15 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ;

*** : E40 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : Lb vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : Lp vs T+ ($p \leq 0,0001$)

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standards (n=10)

Nous notons que :

- Les IgG1 sériques anti β -lg ne sont pas détectables chez le groupe témoin négatif.
- Le titre IgG1 sériques anti β -lg chez le groupe témoin positif a augmenté par rapport aux groupes intubés avec les bactéries lactiques ($p \leq 0,0001$).

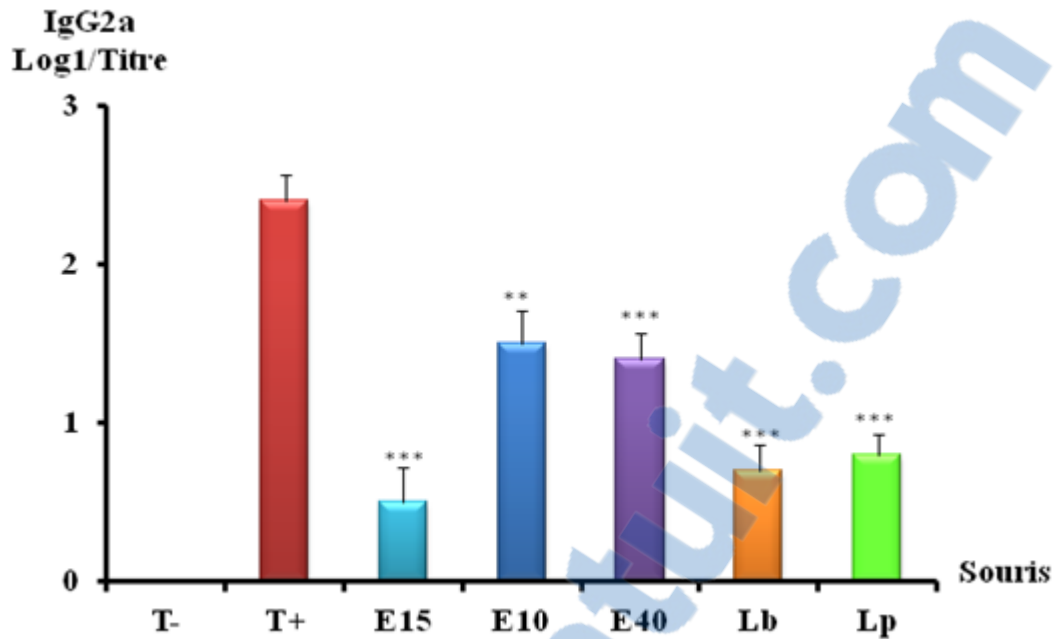


Figure 30 : Titres en anticorps IgG2a sériques anti β -Lg mesurés chez les souris colonisées par les différentes souches bactériennes, les souris témoins négatif et positif (n=10) sacrifiés au 35^{ème} jour.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à la β -Lg

E15 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w15* puis sensibilisé à la β -Lg

E10 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w10* puis sensibilisé à la β -Lg

E40 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus durans* puis sensibilisé à la β -Lg

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à la β -Lg

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à la β -Lg

*** : E15 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; ** : E10 vs T+ ($0,001 \leq p \leq 0,01$);

*** : E40 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; ** : Lb vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; ** : Lp vs T+ ($p \leq 0,0001$)

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standards (n=10)

Nous notons que :

- Les IgG2a sériques anti β -Lg ne sont pas détectables chez le groupe témoin négatif.
- Le titre IgG2a sériques anti β -Lg chez le groupe témoin positif a augmenté par rapport autres groupes. ($p \leq 0,0001$)

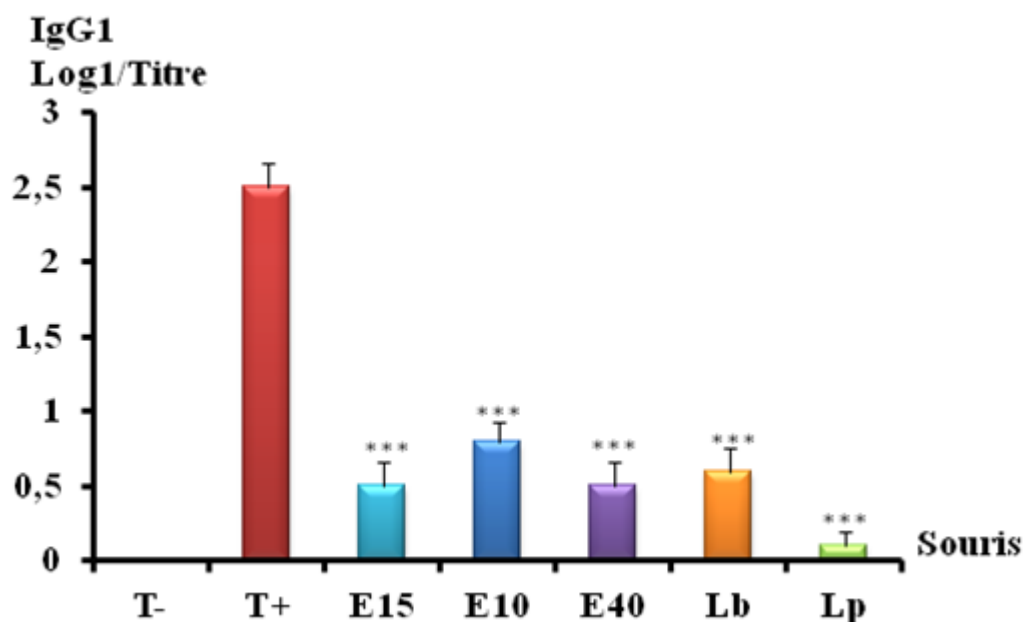


Figure 31 : Titres en anticorps IgG1 sériques anti α -Lac mesurés chez les souris colonisées par les différentes souches bactériennes, les souris témoins négatif et positif (n=10) sacrifiés au 35^{ème} jour.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à l' α -Lac

E15 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w15* puis sensibilisé à l' α -Lac

E10 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w10* puis sensibilisé à l' α -Lac

E40 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus durans* puis sensibilisé à l' α -Lac

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à l' α -Lac

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à l' α -Lac

*** : E15 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : E15 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ;

*** : E40 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : Lb vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : Lp vs T+ ($p \leq 0,0001$)

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standards (n=10)

Nous notons que :

- Les IgG1 sériques anti α -Lac ne sont pas détectables chez le groupe témoin négatif.
- Le titre IgG1 sériques anti α -Lac chez le groupe témoin positif a augmenté par rapport aux autres groupes ($p \leq 0,0001$).
- Le titre IgG1 du lot E10 est significativement plus élevé par rapport au lot Lp ($p \leq 0,0001$).

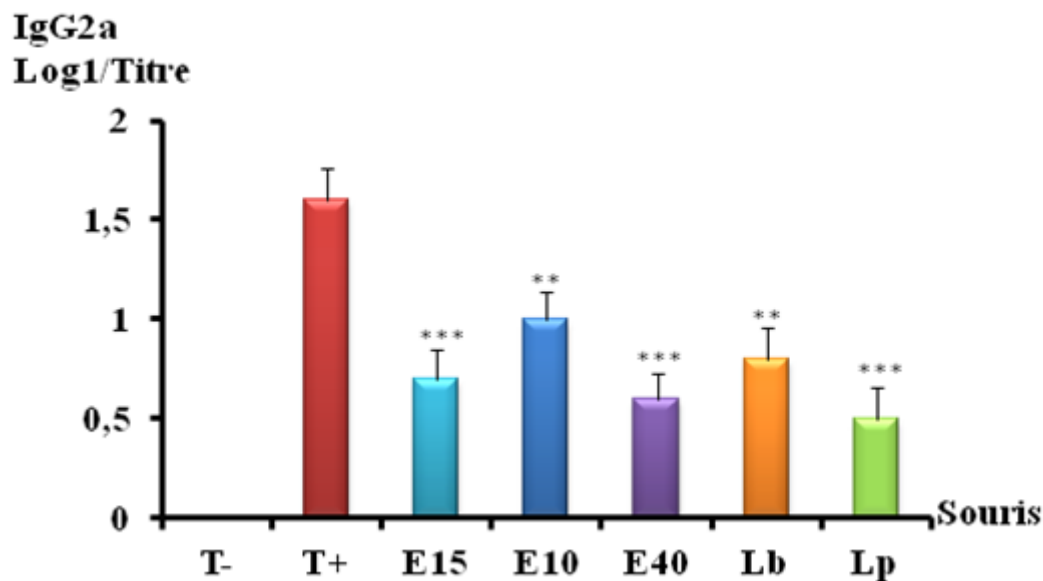


Figure 32 : Titres en anticorps IgG2a sériques anti α -Lac mesurés chez les souris colonisées par les différentes souches bactériennes, les souris témoins négatif et positif (n=10) sacrifiés au 35^{ème} jour.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à l' α -lac

E15 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w15* puis sensibilisé à l' α -lac

E10 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w10* puis sensibilisé à l' α -lac

E40 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus durans* puis sensibilisé à l' α -lac

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à l' α -lac

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à l' α -lac

*** : E15 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; ** : E10 vs T+ ($0,001 \leq p \leq 0,01$) ;

*** : E40 vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : Lb vs T+ ($p \leq 0,0001$) ; *** : Lp vs T+ ($p \leq 0,0001$)

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standards (n=10)

Nous notons que :

- Les IgG2a ne sont pas détectables chez le groupe témoin négatif.
- Le titre IgG2a dans le lot témoin positif a augmenté très significativement par rapport aux autres lots ($p \leq 0,0001$).

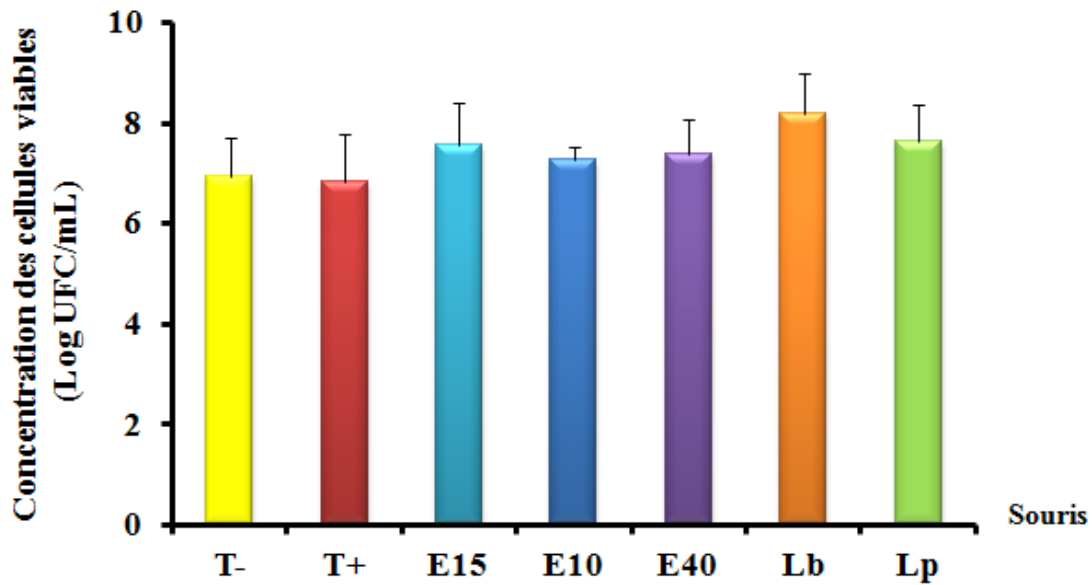


Figure 33 : Dénombrement des cellules viables au niveau de jéjunum chez des souris immunisées à la β -Lg.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à la β -Lg

E15 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium* W15 puis sensibilisé à la β -Lg

E10 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium* W10 puis sensibilisé à la β -Lg

E40 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus durans* puis sensibilisé à la β -Lg

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à la β -Lg

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à la β -Lg

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standard (n= 3)

- on note une forte augmentation de la concentration bactérienne chez les souris intubées avec *Lactobacillus* comparée à celle des souris témoin positif.

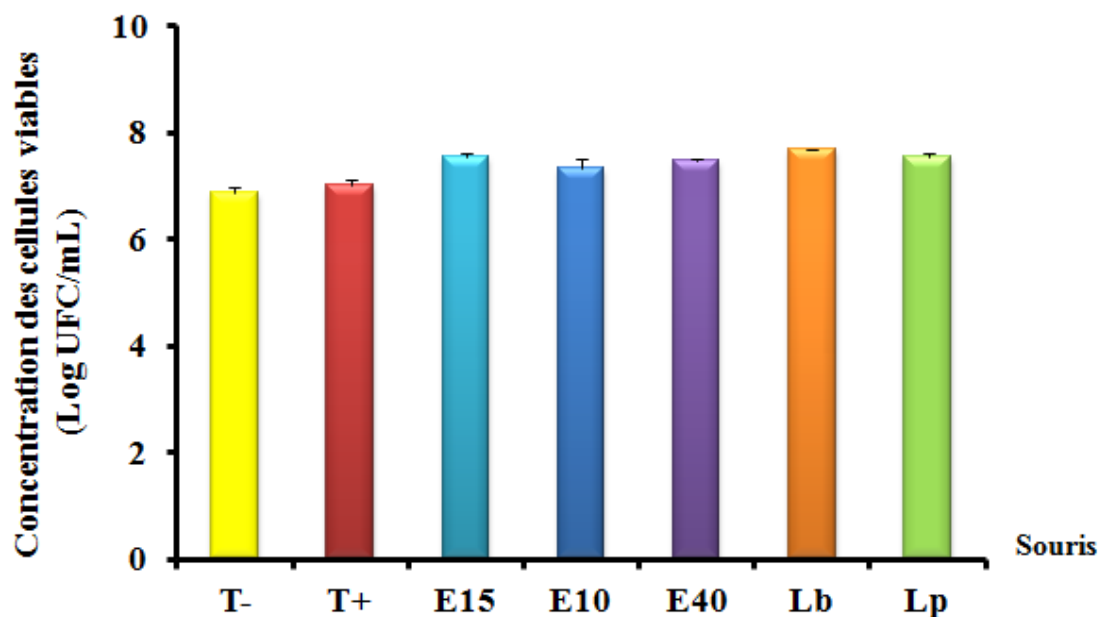


Figure 34 : Dénombrement des cellules viables au niveau de jéjunum chez des souris immunisées à la α -Lac.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à l' α -lac

E15 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w15* puis sensibilisé à l' α -lac

E10 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w10* puis sensibilisé à l' α -lac

E40 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus durans* puis sensibilisé à l' α -lac

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à l' α -lac

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à l' α -lac

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standard (n= 3)

- La croissance bactérienne est importante chez les souris intubées avec *Lactobacillus* et *Enterococcus faecium* W15 comparée à celle des souris témoin positif. Cette augmentation est moins importante chez le groupe intubé avec *Enterococcus durans*.

les groupes ayant reçu par voie orale *Lactobacillus plantarum* (37×10^6), *Enterococcus faecium* w15 (38×10^6) et *Enterococcus durans* (32×10^6) puis immunisés à l' α -Lac, le nombre de bactéries est légèrement élevé. Par ailleurs, on enregistre également une augmentation chez les groupes intubés avec *Lactobacillus plantarum* (45×10^6), *Enterococcus faecium* w15 (36×10^6) et *Enterococcus durans* (24×10^6) puis immunisés la β -Lg mais elle reste peu impotante par rapport au groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis*.

Prolifération de bactéries lactiques au niveau des fèces

Nos résultats montrent également que l'administration par voie orale des souches de bactéries lactiques sélectionnées favorise la croissance des bactéries lactiques dans les fèces, mais à des niveaux différents. Les résultats sont comparés en référence aux groupes témoins positifs.

Nous observons une forte augmentation du nombre de bactéries lactiques dans les fèces chez les groupes de souris intubées par *Lactobacillus brevis* (12×10^9), *Lactobacillus plantarum* (54×10^8) et *Enterococcus faecium* w15 (42×10^8). En revanche, nous notons une faible augmentation chez le groupe intubé par *Enterococcus durans* puis immunisé à la β -Lg (38×10^8). La croissance bactérienne chez les groupes intubés par *Lactobacillus brevis* (87×10^8) et *Lactobacillus plantarum* (34×10^8) est élevée chez les groupes immunisés par l' α -Lac.

3.3 Test de provocation *ex vivo* en Chambre de Ussing

L'objectif de cette méthode est de vérifier l'existence d'une éventuelle réponse anaphylactique locale, puis de mesurer son amplitude lorsque la muqueuse jéjunale est mise en contact direct avec la protéine sensibilisante (β -Lg).

Les paramètres électrophysiologiques sont mesurés. Nous rappelons que le dispositif de la chambre de Ussing permet de mesurer le courant de court circuit (I_{sc} , $\mu A/cm^2$) qui est un index de la sécrétion électrogénique de Cl^- et la conductance (G , $mmho/cm^2$) qui exprime un index de l'intégrité épithéliale, en particulier au niveau des jonctions cellulaires.

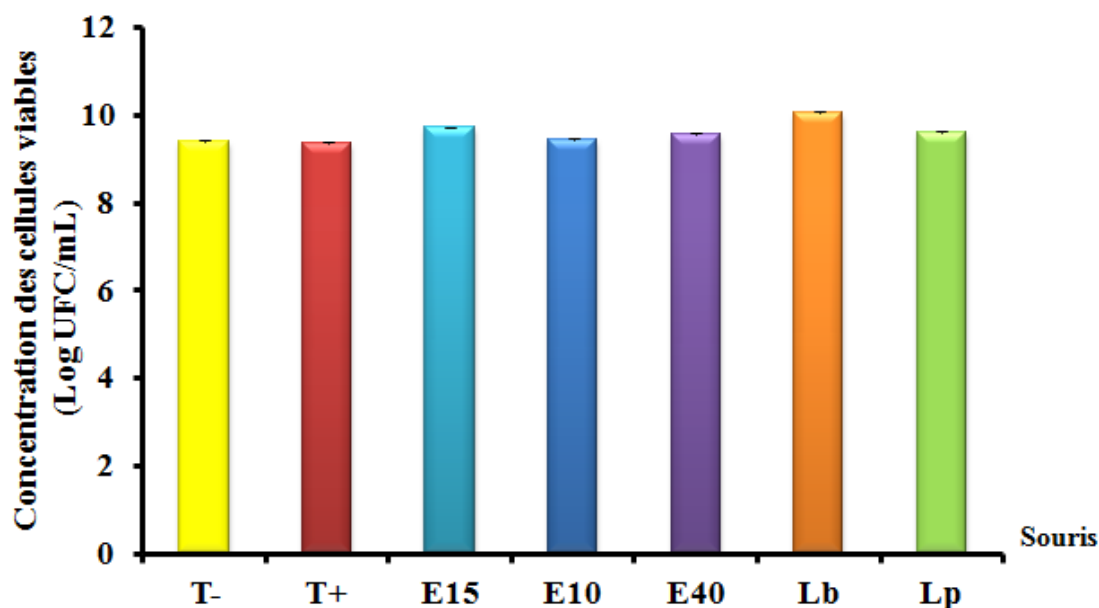


Figure 35 : Dénombrement des cellules viable au niveau des fèces chez des souris immunisées à la β -Lg.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à la β -Lg

E15 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium* W15 puis sensibilisé à la β -Lg

E10 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium* W10 puis sensibilisé à la β -Lg

E40 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus durans* puis sensibilisé à la β -Lg

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à la β -Lg

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à la β -Lg

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standard (n= 3)

- On note un nombre très élevé des bactéries lactiques chez les souris intubées avec *Lactobacillus brevis* comparée à celle des souris témoin positif. Cette augmentation est moins importante chez le groupe intubé avec *Enterococcus faecium* W15, *Lactobacillus plantarum* et *Enterococcus durans*.

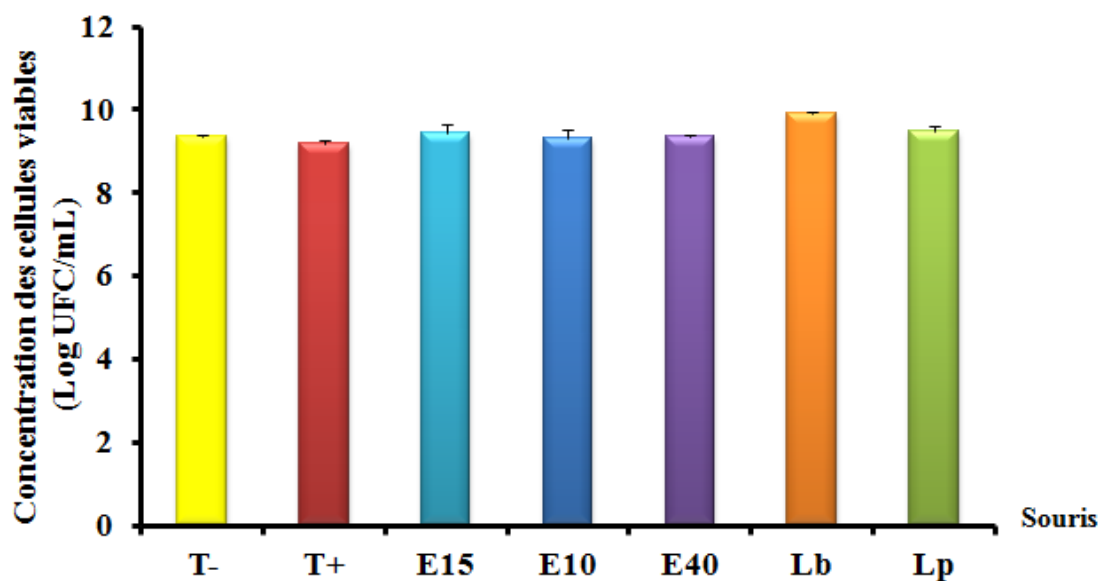


Figure 36 : Dénombrement des cellules viable au niveau des fèces chez des souris immunisées à l' α -Lac.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à l' α -lac

E15 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w15* puis sensibilisé à l' α -lac

E10 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w10* puis sensibilisé à l' α -lac

E40 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus durans* puis sensibilisé à l' α -lac

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à l' α -lac

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à l' α -lac

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standard (n= 3)

- On observe une bonne croissance bactérienne chez les souris intubées avec *Lactobacillus brevis* comparée à celle des souris témoin positif.

3.3.1 Effets de β -Lg sur l'Isc

Lorsque les fragments jéjunaux des souris immunisées à la β -Lg sont montés en chambre de Ussing puis stimulés par la β -Lg, on enregistre une augmentation très significative de l'Isc (Δ Isc = $28,51 \pm 5,73 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) ($0,001 \leq p \leq 0,01$) (Fig. 37). Par contre, une petite variation non significative de l'Isc est enregistrée chez les groupes intubés avec *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum* (Δ Isc = $10,46 \pm 2,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; $10,18 \pm 2,26 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) par rapport au témoin négatif.

3.3.2 Effet de l'ovalbumine sur l'Isc

Pour vérifier que l'augmentation de l'Isc des fragments de souris sensibilisées est spécifique à la β -Lg, nous avons testé dans les mêmes conditions l'effet de l'ovalbumine sur les tissus des souris sensibilisées à la β -Lg.

Nos résultats montrent que le dépôt de l'ovalbumine dans le compartiment séreux des tissus des animaux sensibilisés ne se traduit par aucun effet significatif sur l'évolution de l'Isc (Fig. 38).

3.3.3 Effets de la β -Lg sur la conductance

Les variations de la conductance G sont reportées dans le tableau 17. On remarque que lorsque la β -Lg est ajoutées du côté séreux, La conductance est significativement élevée $3,33 \pm 1,10 \text{ mmho}/\text{cm}^2$ ($p < 0,05$) par rapport au témoin négatif. En revanche, le contact de la β -lg avec les fragments jéjunaux des souris ayant reçu respectivement *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum* n'entraîne aucune variation significative de la conductance.

3.3.4 Effet du furosémide

Nos précédents résultats montrent clairement que l'Isc et la conductance sont significativement modifiés lorsque les épithéliums des souris immunisées sont exposés aux antigènes sensibilisants. On considère que ces paramètres électriques, en particulier l'Isc, sont une mesure des mouvements ioniques à travers l'épithélium intestinal et leur modification traduit un changement dans le transport des électrolytes, principalement le Cl⁻ et le Na⁺.

Pour déterminer de la nature des mécanismes mis en jeu dans l'augmentation de l'activité sécrétoire de l'épithélium intestinal en présence de la β -Lg, nous avons testé l'action d'un diurétique, le furosémide. Cet agent est un inhibiteur spécifique du

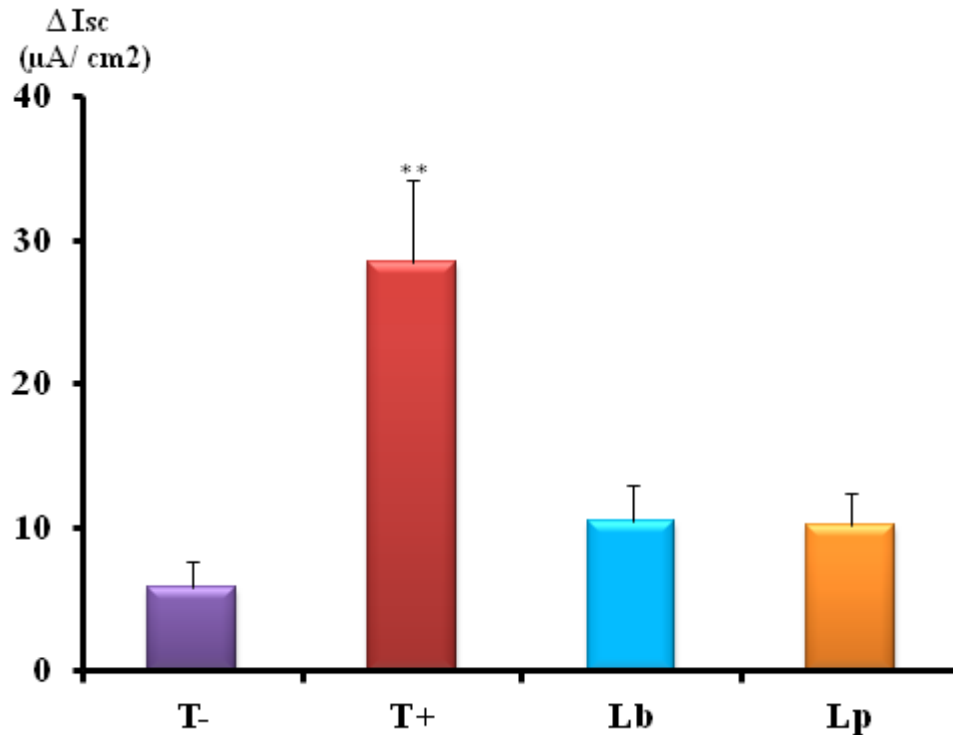


Figure 37 : Effet de l'intubation avec *Lactobacillus* sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -lg.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à la β -Lg

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à la β -Lg

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à la β -Lg

- On note une augmentation très significative de la différence de l'Isc après dépôt de la β -lg.
- L'Isc n'est pas modifiée chez les groupes de souris intubées avec *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum*.

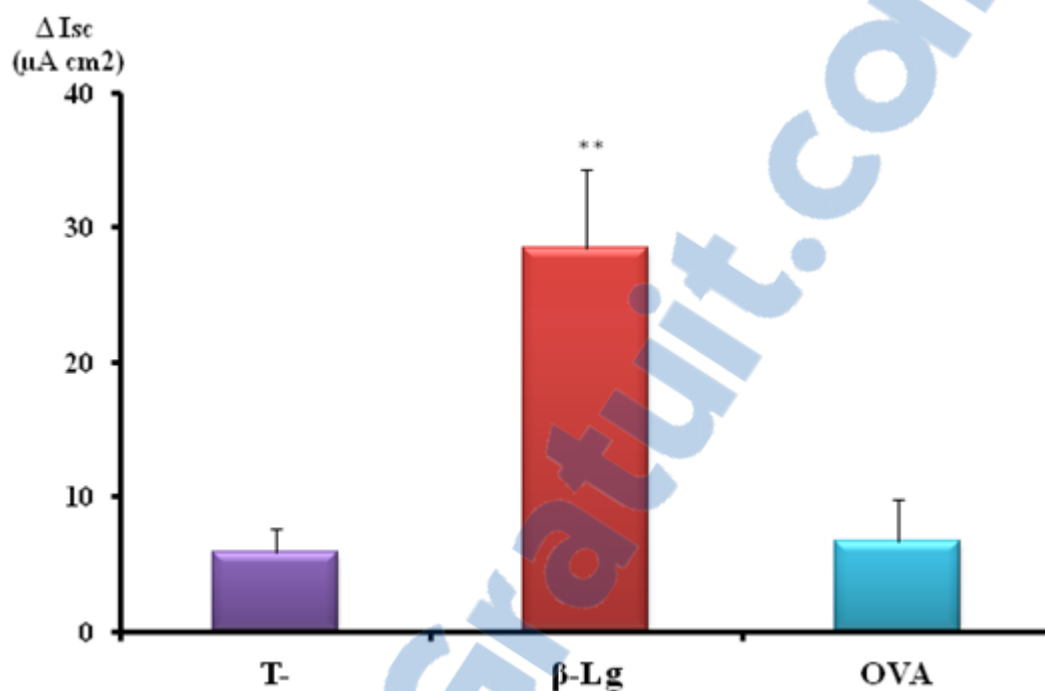


Figure 38 : Effet de la β -Lg et de l'ovalbumine sur le courant de court circuit (ΔI_{sc}) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées.

T- : Tissus de souris non sensibilisées

β -Lg : Tissus de souris sensibilisées à la β -Lg puis stimulés à la β -Lg

OVA : Tissus de souris sensibilisées à la β -Lg puis stimulés à l'ovalbumine

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards (n=8).

- Le dépôt de la β -Lg provoque une augmentation très significative de l' I_{sc} . Par contre, le dépôt de l'ovalbumine (OVA) n'entraîne aucune modification significative de l' I_{sc}

Tableau 19 : Effet des différents traitements sur la conductance (G) des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -lg montés en chambre de Ussing.

	ΔG (mmho cm ⁻²)	Signification
Témoin -	2,48 \pm 0,46	
Témoin +	6,46 \pm 1,34**	** : 0,001 \leq p \leq 0,01
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,53 \pm 0,21	Non Significatif
<i>Lactobacillus brevis</i>	2,61 \pm 0,57	Non Significatif

système de cotransport Cl/Na/K situé sur la membrane basolatérale. Le furosémide entraîne une déplétion de la cellule en Cl⁻ qui engendre une diminution de la sécrétion de Cl⁻.

Les résultats ont montré que lorsque le furosémide est ajouté du côté séreux, l'Isc reste stable au cours du temps (Fig. 39). De même, n'observons aucune différence significative lorsqu'on dépose la β-Lg sur le même fragment. La conductance reste également stable durant toute la période de l'expérimentation.

3.4 Histologie de la muqueuse intestinale des souris expérimentales

Cette partie de notre travail a pour but de vérifier l'effet de l'intubation intragastrique des souris par les bactéries lactiques sur la structure de l'épithélium intestinal, particulièrement au niveau de l'architecture villositaire.

3.4.1 Aspect des muqueuses intestinales des souris

Sur le plan structural, les villosités intestinales des souris témoin négatif apparaissent longues et fines, bordées par un épithélium simple unistratifié, constitué de cellules cylindriques pourvues de noyaux réguliers en position basale. Le chorion est d'aspect fibreux contenant des cellules immunitaires peu abondantes.

En revanche, on distingue chez les souris témoin positif un raccourcissement des villosités suggérant la présence d'une atrophie villositaire, avec un élargissement accentué (Fig. 40, 41) ainsi qu'une infiltration très prononcée des lymphocytes intra-épithéliaux. Ces résultats suggèrent que l'immunisation par voie intra-péritonéale à la β-Lg et à l'α-Lac affecte de manière significative la structure de base de l'épithélium intestinal.

Chez les groupes intubés par voie intragastrique avec *Lactobacillus* et *Enterococcus faecium* W15, on remarque que l'aspect des villosités est comparable à celui des villosités du groupe témoin négatif (Fig. 40, 41). Par ailleurs, chez les groupes intubés avec *Enterococcus faecium* W10 et *Enterococcus durans* puis immunisés à la β-Lg, on observe un léger élargissement des villosités intestinales (Fig. 40).

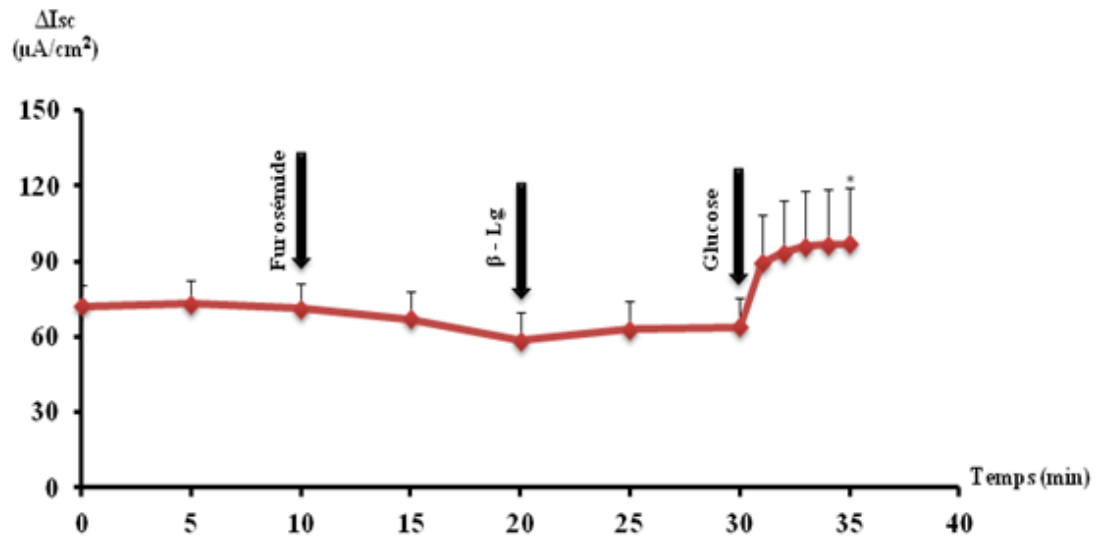


Figure 39: Effet de la β -Lg sur le courant de court-circuit après dépôt du furosémide mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris immunisées.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à la β -Lg

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à la β -Lg

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à la β -Lg

- Le dépôt du furosémide inhibe totalement l'augmentation de l'Isc après le dépôt de la β -Lg.
- En fin d'expérience, le glucose est déposé à la concentration de 10mM dans les compartiments séreux et muqueux. Une modification significative de l'Isc est observée.

* $p < 0,05$

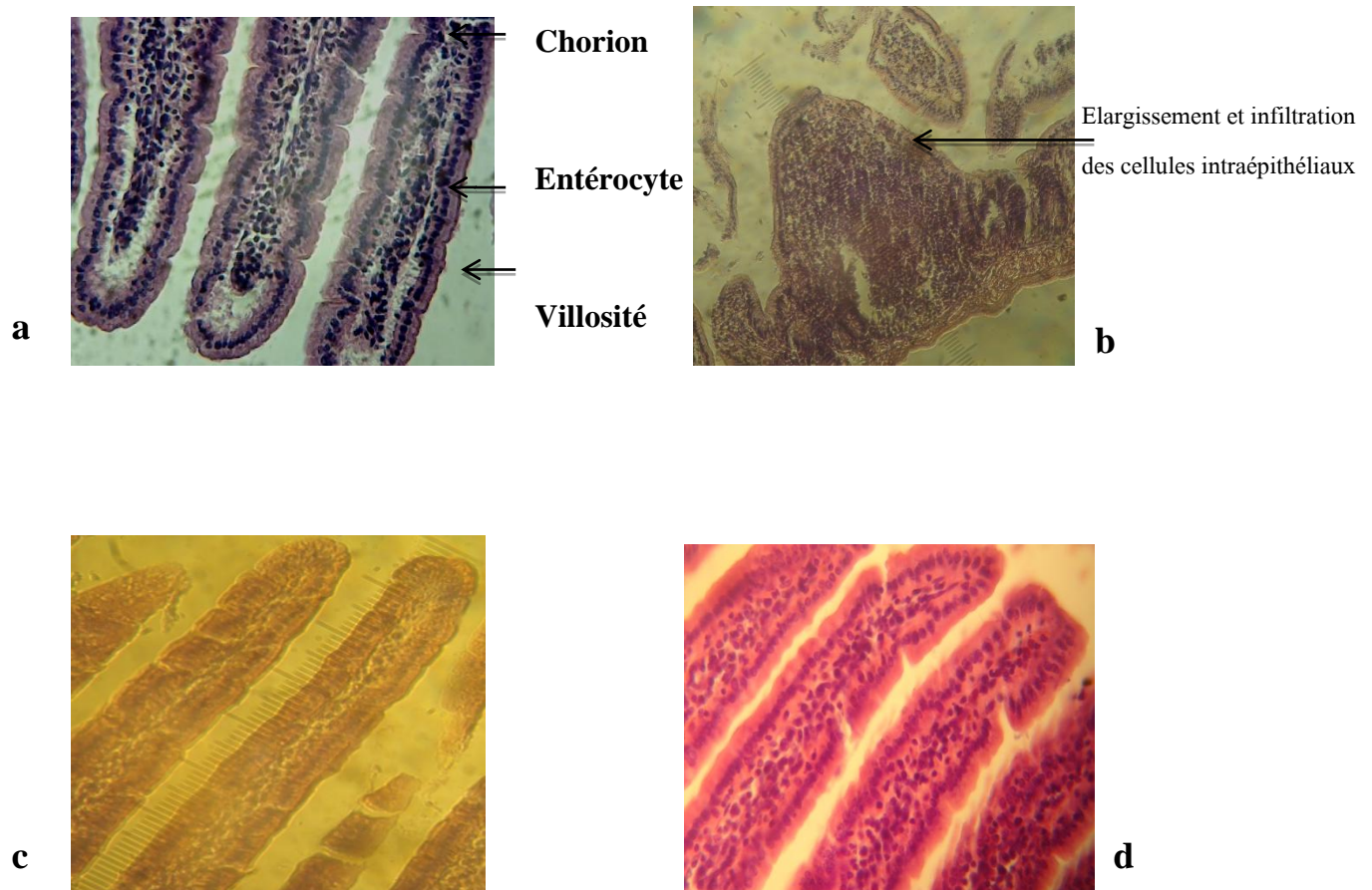


Figure 40a: Fragment de jéjunum coloré à l'hémalum-éosine des souris (GX40)

a: témoin négatif

b: souris intubée avec solution saline puis immunisée à la β -Lg (témoin positif)

c: souris intubée avec *Lactobacillus brevis* puis immunisée à la β -Lg

c: souris traitée avec *Lactobacillus plantarum* puis immunisée à la β -Lg

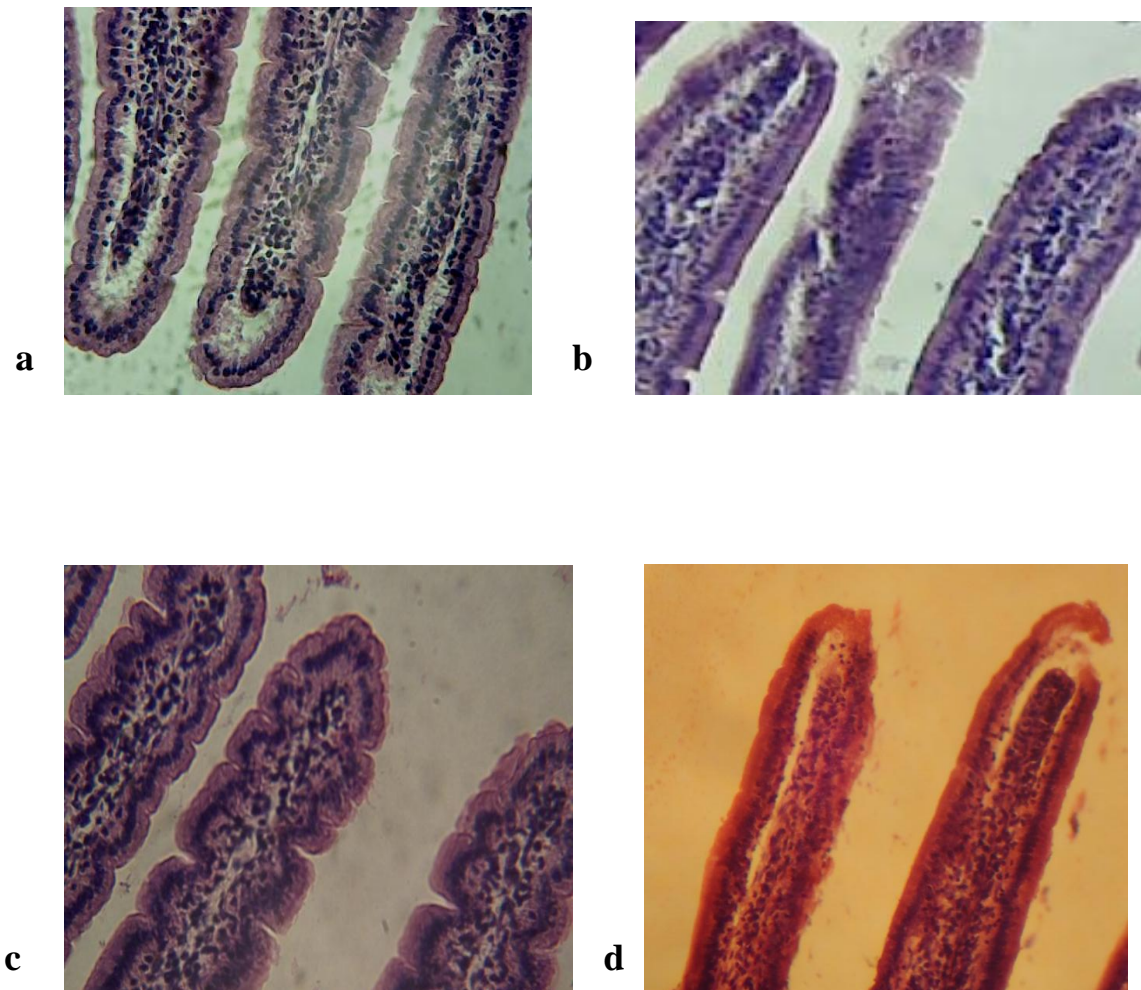


Figure 40b: Fragment de jéjunum coloré à l'hémalum-éosine des souris (GX40)

a: témoin négatif

b: souris intubée avec *Enterococcus durans* puis immunisée à la β -Lg

c: souris intubée avec *Enterococcus faecium* (E15) puis immunisée à la β -Lg

d: souris intubée avec *Enterococcus faecium* (E10) puis immunisée à la β -Lg

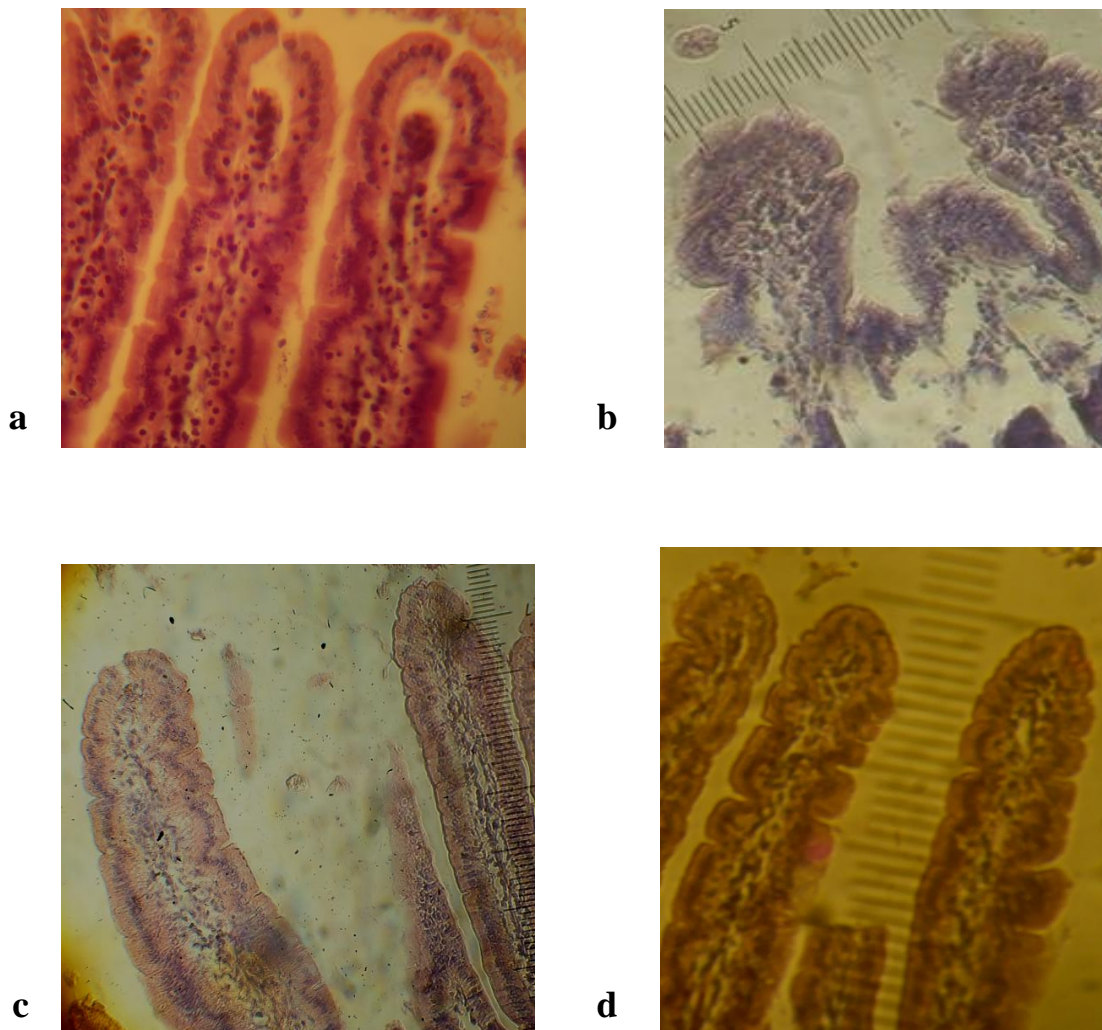


Figure 41a: Fragment de jéjunum coloré à l'hémalun-éosine des souris (GX40)

a: témoin négatif

b: souris intubée avec solution saline puis immunisée à l' α -Lac (témoin positif)

c: souris intubée avec *Lactobacillus brevis* puis immunisée à l' α -Lac

d: souris traitée avec *Lactobacillus plantarum* puis immunisée à l' α -Lac

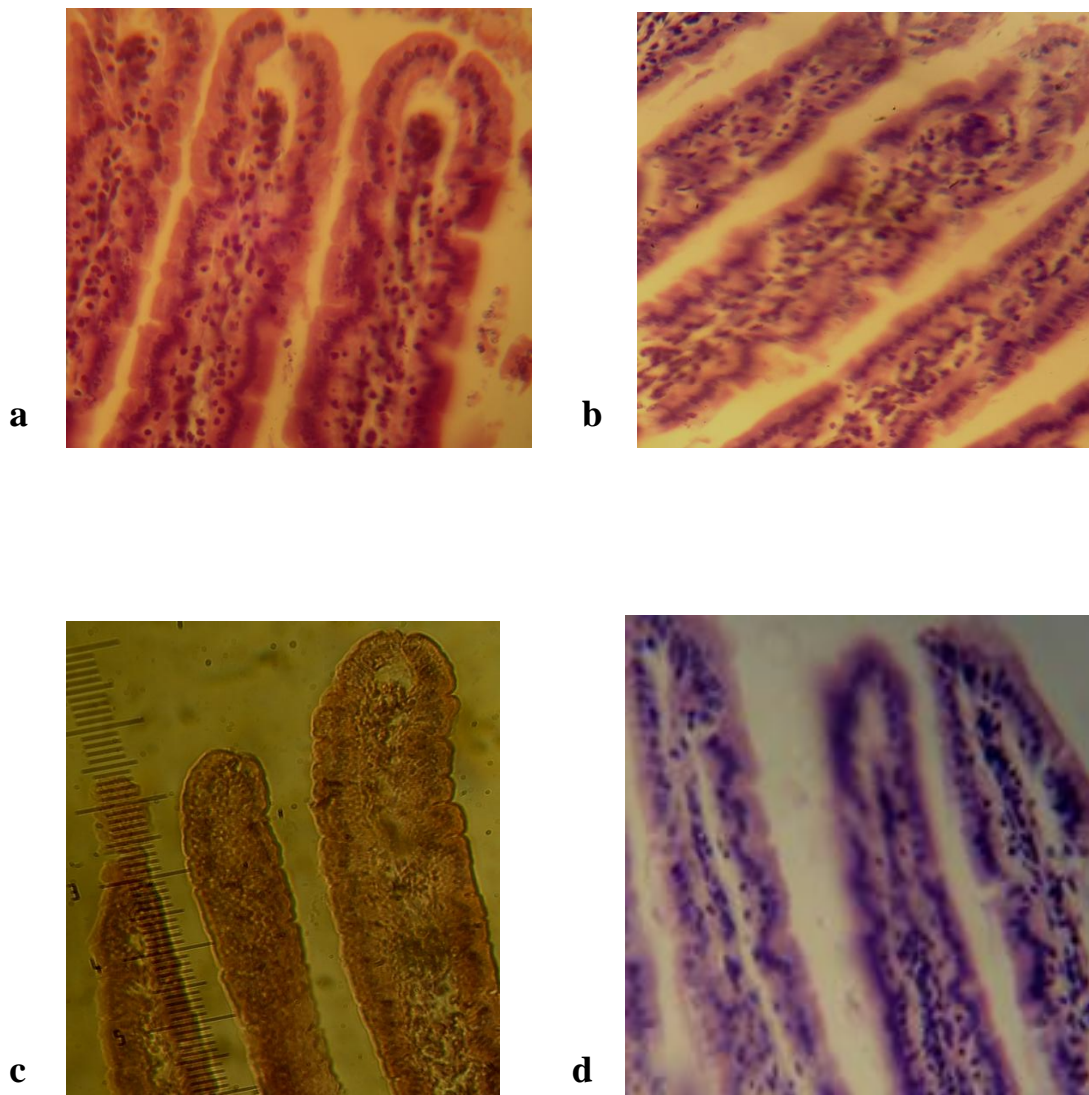


Figure 41b: Fragment de jéjunum coloré à l'hémalun-éosine des souris (GX40)

a: témoin négatif

b: souris intubée avec *Enterococcus durans* puis immunisée à l' α -Lac

c: souris intubée avec *Enterococcus faecium* (E15) puis immunisée à l' α -Lac

d: souris intubée avec *Enterococcus faecium* (E10) puis immunisée à l' α -Lac

3.4.2 Effet des bactéries lactiques sur la hauteur des villosités intestinales

La hauteur des villosités des souris témoin positif immunisées à la β -Lg et à l' α -Lac est diminuée d'une manière hautement significative $31,9 \pm 3,2 \mu\text{m}$ et $33,83 \pm 2,09$ respectivement par rapport au témoin négatif ($p \leq 0,0001$) (Fig. 42 et 43). Par ailleurs, la hauteur villositaire chez tous les groupes intubés avec les différentes souches reste comparable à celle du témoin négatif.

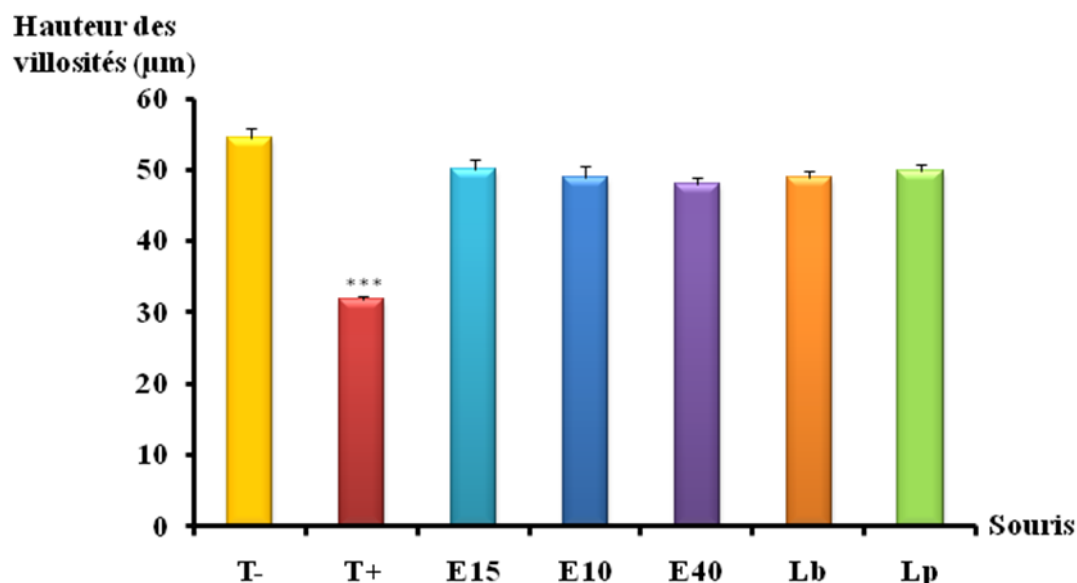


Figure 42 : Evaluation de la hauteur villositaire des fragments jéjunaux des souris intubées avec des bactéries lactiques puis sensibilisées à la β -Lg.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à la β -Lg

E15 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w15* puis sensibilisé à la β -Lg

E10 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w10* puis sensibilisé à la β -Lg

E40 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus durans* puis sensibilisé à la β -Lg

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à la β -Lg

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à la β -Lg

*** : T+ vs T- ($p \leq 0,0001$)

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standards (n=6)

Après la sensibilisation à la β -Lg, nous notons :

- Il y a une diminution hautement significative de la hauteur des villosités ($p \leq 0,0001$) chez les souris témoin positif comparée à celle des souris témoin négatif.
- Il y a aucune diminution significative de la hauteur des villosités de souris intubées avec *Enterococcus* puis immunisées à la β -Lg, comparée à celle de témoin négatif.

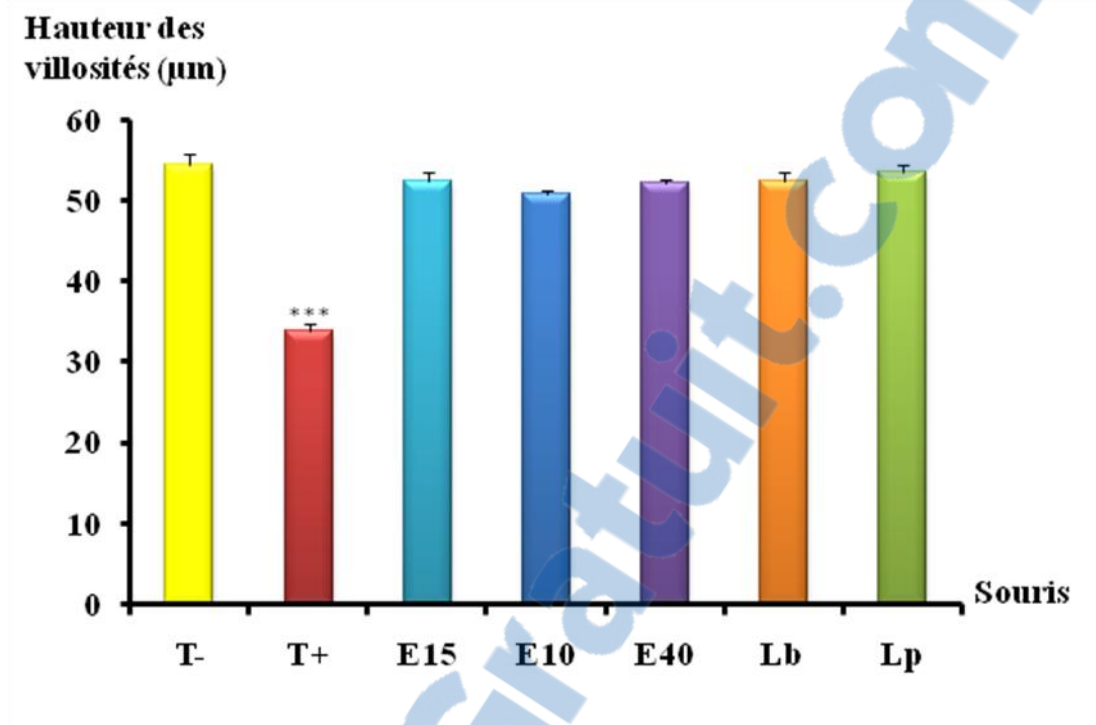


Figure 43 : Evaluation de la hauteur villositaire des fragments jéjunaux des souris intubées avec des bactéries lactiques puis sensibilisées à l' α -Lac.

T- : Témoin négatif non sensibilisé

T+ : Témoin positif intubé avec une solution saline puis sensibilisé à l' α -lac

E15 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w15* puis sensibilisé à l' α -lac

E10 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus faecium w10* puis sensibilisé à l' α -lac

E40 : Groupe de souris intubé avec *Enterococcus durans* puis sensibilisé à l' α -lac

Lb : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus brevis* puis sensibilisé à l' α -lac

Lp : Groupe de souris intubé avec *Lactobacillus plantarum* puis sensibilisé à l' α -lac

Les valeurs indiquées sont des moyennes \pm erreurs standard (n= 6)

Après la sensibilisation à l' α -Lac, nous notons :

- Il y a une diminution hautement significative de la hauteur des villosités ($p \leq 0.0001$) chez les souris témoin positif comparée à celle des souris témoin négatif.

Discussion

Identification phénotypique et génotypique des souches

La galerie API 50 CH est un test qui étudie la fermentation des hydrates de carbone et permet également d'identifier les isolats. D'après Huys *et al.* (2006), ils ont démontré que l'utilisation des galeries API 50 CHL n'a pas permis une identification précise pour certaines bactéries lactiques. De même, Benito *et al.* (2008) ; Nigatu, 2000, ont utilisé les galeries API 50 CHL pour identifier la population lactique dans différents types de produits fermentés. Selon ces auteurs, cette identification induit maintes erreurs au niveau du genre et de l'espèce.

L'avènement de la biologie moléculaire et le développement des techniques de manipulation de l'ADN, permettant d'extraire l'ADN ou l'ARN et de produire une empreinte génétique à partir d'un produit de PCR (Randazzo *et al.*, 2009). Ces techniques donnent une image globale de structure génétique de la communauté bactérienne. Les gènes cibles les plus utilisés lors de l'analyse des flores microbiennes sont ceux de l'opéron ribosomal, particulièrement l'ARN 16S. Les propriétés phylogénétiques de l'ARN 16S ainsi que le nombre important des séquences disponibles représentent des avantages considérables. Les gènes bactériens codant pour l'ARNr 16S contiennent 9 régions très stables V1-V9, dont la diversité de séquence diffère de manière importante selon l'espèce (Baker *et al.*, 2003).

Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature. En ce qui concerne les *Lb. brevis*, on n'a pas trouvé de concordance entre l'identification phénotypique et l'identification génotypique. Par contre, l'identification des *Enterococcus* par VITEK Compact 2 (identification phénotypique) est identique à l'identification génotypique. Les souches sont comme suit : *Enterococcus faecium1*, *Enterococcus faecium2*, *Enterococcus durans*.

Pour comparer le profil des souches *Enterococcus faecium1*, *Enterococcus faecium2* nous avons utilisé la technique de RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) en utilisant les amorces E1, E2 et M13. Les amorces utilisées vont s'hybrider de façon aléatoire dans la séquence d'ADN et produire des fragments amplifiés de tailles différentes. Ces fragments sont révélés par électrophorèse ce qui nous permet d'identifier de manière précise la différence entre les espèces. Nos résultats ont montré que ces deux souches présentent des bandes électrophorétiques différentes, indiquant que nous sommes en présence de deux souches. L'utilisation de cette technique a permis à de nombreux auteurs de différencier de nombreuses souches. (Andrighetto *et al.*, 2001 ; Silva *et al.*, 2015).

L'un des objectifs de notre travail est d'évaluer les propriétés technologiques de ces bactéries en étudiant l'activité protéolytique et l'activité antimicrobienne.

Parmi les propriétés biotechnologiques, on trouve le pouvoir acidifiant qui est basé sur la conversion des carbohydrates en acide lactique. Cette conversion compte parmi les plus importantes étapes pour l'industrie agro-alimentaire. Les laits fermentés sont des produits laitiers transformés par une fermentation essentiellement lactique qui aboutit à l'acidification et à la gélification du lait (Béal & Sodini, 2012). La croissance des bactéries lactiques est caractérisée par la formation de composés acides comme l'acide lactique, qui s'accumulent dans leur environnement au cours de la fermentation. C'est d'ailleurs cette production de composés organiques qui rend le milieu acide défavorable à la croissance des autres microorganismes.

Au cours de la fermentation du lait à 45°C, nous avons obtenu une quantité importante d'acide ce qui entraîne une baisse considérable de pH chez toutes les souches étudiées. Ce résultat indique que l'ensemble de nos souches a un très bon profil fermentaire mais à des niveaux différents. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Chekroun et *al.* (2011) et Pereira de Souza et *al.* (2013). Ces variations imputables au développement des bactéries lactiques conduisent à l'acidification du milieu par la production d'acide lactique d'où la baisse du pH du lait (Chekroun et *al.*, 2011).

A la fin de la fermentation, nous observons une augmentation de la concentration bactérienne dans les laits fermentés par les souches étudiées. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Dib et *al.*, 2012, Pereira de Souza et *al.*, (2013), qui ont montré que *L. plantarum* et *L. paracasei* présentent une forte croissance dans le lait.

Pour atteindre une densité importante de cellules, les bactéries lactiques doivent hydrolyser les protéines du lait, c'est-à-dire utiliser des enzymes qui leur permettent d'hydrolyser les protéines en peptides et acides aminés libres.

Caractérisation biochimique des laits fermentés

Activité protéolytique

Nous avons évalué l'activité protéolytique des différentes souches par la mesure de la libération des fonctions α -NH₂ pendant la fermentation.

Les résultats obtenus montrent une augmentation de la libération des fonctions α -NH₂ dans les laits fermentés par les différentes souches. Nous observons cependant une variation

du niveau de production des fonctions α -NH₂ selon les espèces. Nos résultats concordent avec Bouton *et al.*, (1993) ; Chekroun *et al.*, (2011), qui ont montré que les bactéries lactiques hydrolysent les protéines pour les besoins de leur croissance mais à différents niveaux.

La protéolyse des protéines du lait conduit au changement structural des caséines, de la β -Lg et de l' α -Lac qui a pour conséquence la production des peptides matérialisés par l'apparition de nouvelles bandes en électrophorèse SDS PAGE.

L'analyse de l'activité protéolytique des bactéries lactiques testées montre que les lactobacilles hydrolysent toutes les protéines du lait. Après 24 heures de fermentation, nous observons une disparition des bandes correspondant aux protéines du lait. Le pH et la température sont des facteurs importants dans la régulation de la protéolyse. En effet, cette activité est optimale à pH 7,2. La souche *Lactobacillus brevis* présente une croissance optimale entre 37 et 45°C tandis que pour *Lactobacillus plantarum* elle est obtenue à 37°C. Nos résultats sont en accord avec ceux de El - Ghaish *et al.* (2010b) ; Ahmadova *et al.*, (2011) ; Hadji Sfaxi *et al.* (2012) qui montrent une activité protéolytique marquée chez *Lactobacillus fermentum* IFO 3956, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paracasei* I-N-10.

L'étude de l'effet des inhibiteurs sur l'activité protéolytique nous permet de caractériser les enzymes impliquées dans la protéolyse bactérienne. Chez *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum* les métallo-protéases sont prédominantes. Nous observons également chez cette souche la présence de sérine-protéases. Tandis que chez *Lactobacillus plantarum* on rencontre à la fois une sérine protéase et une cystéine protéase. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Hadji Sfaxi *et al.* (2012) et Pereira de Souza *et al.* (2001) qui montrent que *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus curvatus* et *Lactobacillus homohiochii* produisent principalement des métallo-protéase et des sérines protéases. Une autre étude (Ahmadova *et al.*, 2011) a montré que chez *Enterococcus faecalis* AN1 les métallo-protéases sont prédominantes mais la présence des sérine protéase et cystéine protéase reste détectable.

L'activité protéolytique dépend des enzymes produites par des souches bactériennes utilisées. En effet certaines souches comme *Lb. sanfranciscensis* CB1 ont la capacité à dégrader les protéines ou les peptides durant la fermentation (Gobbetti *et al.*, 1996).

Activité antimicrobienne

La production de substances antibactériennes telles que les bactériocines par des bactéries lactiques représente une voie intéressante pour lutter contre les micro-organismes

pathogènes. Les bactériocines jouent un rôle très important dans le domaine alimentaire en prolongeant la durée de conservation et en empêchant la croissance des bactéries pathogènes (Nes, 2011).

Les *Enterococcus* sont des bactéries lactiques, ubiquitaires, trouvées fréquemment dans la flore microbienne du tractus gastro-intestinal des animaux ainsi que dans une variété de produits alimentaires. Ils sont utilisés dans les aliments comme agents antimicrobiens, mais également pour leurs propriétés organoleptiques et parfois comme probiotiques. (Aguilar-Galvez et al., 2012).

E. faecium RZS C5, un isolat naturel du fromage, a des propriétés anti-*Listeria* spp mais ne possède pas de facteurs de virulence. L'étude énonce la possibilité d'utiliser cette souche en co-culture, par exemple dans la production de saucisses fermentées, afin de réduire le risque de croissance de *Listeria* spp (Leroy et al., 2003).

Les entérocoques ont une importance bactériologique majeure. En effet, elles sont largement utilisées en industrie agroalimentaire pour inhiber la croissance de *Listeria* spp. (FAO/OMS, 2004). Dans un premier temps, nous avons testé trois différentes souches ; *Enterococcus faecium* (E15), *Enterococcus faecium* (E10), *Enterococcus durans*, contre *Listeria ivanovii* et *Lactobacillus sakei*. Nous avons pu montrer que nos trois souches présentent un effet inhibiteur contre les deux souches cibles.

Pour vérifier la nature de nos bactériocines, nous avons testé l'effet des enzymes digestives sur l'activité antibactérienne des trois souches. Nos résultats ont montré qu'en présence de la lipase, la catalase et l'amylase, l'activité anti-*Listeria ivanovii* et anti-*Lactobacillus sakei* persiste. Par contre, en présence des enzymes protéolytiques l'activité antibactérienne disparaît. Ce résultat indique que nos bactériocines sont de nature protéique. Les bactériocines sont généralement décrites dans la littérature comme étant de nature protéique (Klaenhammer, 1988 ; Du Toit et al., 2000 ; H-Kittikun et al., 2015).

Le test de l'influence du pH et de la température sur l'activité antimicrobienne a montré que ces deux facteurs ne modifient pas l'activité antibactérienne. Puisqu'elles restent stables dans une large plage de pH compris entre 2 et 10 et sont également thermorésistantes.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Parente et al., 1994, Pinto et al., 2009, Elsilk et al., 2015 qui ont montré que *Lactococcus lactis* et *Enterococcus sanguinicola* sont des bactéries lactiques thermostables et qui gardent leur activité à pH acide et basique.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'action inhibitrice des bactériocines produites par les bactéries lactiques sur les bactéries pathogènes. L'inhibition de la microflore pathogène et de contamination des aliments est un souci constant dans la transformation des produits alimentaires. En effet, la réduction des cas des intoxications alimentaires provoquées par les germes nuisibles peut être obtenue par l'exploitation des potentialités des bactéries lactiques capables de produire des substances diverses dotées d'une activité antimicrobienne.

Nos résultats ont montré une forte activité antibactérienne contre les bactéries à Gram+ et Gram-. L'activité inhibitrice a été observée contre les bactéries pathogènes suivantes : *Carnobacterium maltaromaticum* CIP 103135, *Carnobacterium piscicola* S4312, *Enterococcus faecalis* JH2-2, *Enterococcus faecalis* JH2-2 rr 04, *Enterococcus faecium* P13, *Listeria grayi* CLIP 12518, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes* et *Vagococcus penaei* CIP 109914^T, *Escherichia coli* ATCC25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Jack et al. 1995; McAuliffe et al. 1998; Bredholt et al. 2001; Cleveland et al. 2001. Ils ont montré que les bactériocines sont capables d'inhiber les bactéries entéropathogènes, Clostridia, Listeria, et les bactéries à gram négatif. Ces bactériocines sont considérées comme candidats pour la bioconservation des aliments. De même, une étude récente (Enan et al., 2014) montre que la souche *Enterococcus faecium* NM2 inhibe les bactéries pathogènes à gram positif et gram négatif comme *Enterococcus faecalis* TW5, *Streptococcus pyogenes* TW12, *Proteus mirabilis* TW17, *Escherichia coli* et *Burkholderia cepacia* TCH4.

Les espèces *Enterococcus* sont connues pour produire une grande variété d'entérocoines incluant les entérocoines A, B et P, lesquelles sont actives contre les espèces Listeria, Clostridium et Staphylococcus aureus (Campos et al., 2006). La plupart des bactériocines produites par *E. faecalis* et *E. faecium* sont identiques aux entérocoines A et B décrites chez *E. faecium* CTC492 et *E. faecium* T136 (De Vuyst et al., 2003, De Kwaadsteniet et al., 2005).

Les effets bactéricides des bactériocines semblent être dus à la perméabilisation de la paroi cellulaire. La structure enroulée des peptides entrant en contact avec la paroi cellulaire, formerait une hélice, qui s'incorporerait et traverserait la membrane, créant ainsi un pore. Ce mode d'action a été observé avec l'entérocoine P. Le pore résultant cause un

relâchement des ions K⁺, une perte du potentiel membranaire et une inhibition de l'absorption des acides aminés. Tout ceci aurait pour résultat la mort cellulaire (Garneau et al., 2002) .

D'après Eijssink et al., 1998 ; Fimland et al., 2000 ; Drider et al., 2006 ; Richard et al., 2006, les bactériocines de classe II ont une activité contre *Listeria monocytogenes*. De plus, elles ont une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large.

Les résultats obtenus par PCR du gène codant pour les entérocoques, montrent que nos bactériocines sont principalement les entérocoque A, B, P et 31. Selon la classification de Franz et al. (2007), nous pouvons classer nos bactériocine dans la classe II.

La résistance aux antibiotiques est un facteur important pour l'évaluation de l'utilisation des entérocoques en toute sécurité (Klein et al., 1998; Franz et al., 2001; Temmerman et al., 2003). Dans notre travail nous avons utilisé la concentration minimale d'inhibition qui correspond à la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique qui entraîne l'inhibition de toute croissance bactérienne visible, selon Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (2003). Cette méthode est standardisée en 2008 par European Food Safety Authority (EFSA).

Nos résultats ont montré que les souches *Enterococcus faecium* (E15), *Enterococcus faecium* (E10), *Enterococcus durans*, *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum* sont sensibles à la famille des β-Lactamines (ampiciline, péniciline), la famille des cyclines (tétracycline), la famille des phénicoles (chloramphénicol) à l'exception d'*Enterococcus durans*. Par contre, toutes nos souches sont résistantes à la famille des aminosides (gentamicine) à l'exception de *Lactobacillus plantarum*.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par El Ghaish et al., 2011, qui ont montré que l'*Enterococcus faecium* E980 est sensible à l'ampiciline, ciprofloxacine, vancomycine, et péniciline mais résiste à tetracycline et à chloramphénicol. H-Kittikun et al., (2015) ont montré que l'*Enterococcus faecalis* KT2W2G est sensible a la kanamycine, tétracycline et à la vancomycine mais résistante à l'ampiciline et la péniciline et à la gentamicine. D'autres études réalisées par Kalta et al., (2001) et Ammor et al., (2007) ont montré que les lactobacilles sont sensibles à l'ampicilline and chloramphénicol.

Mise en évidence *in vitro* de quelques propriétés probiotiques

La cinétique de croissance chez les différentes souches testées à montré que les souches réagissent différemment par rapport au pH acide et aux sels biliaires. Nous avons

observé que les lactobacilles présentent une meilleure résistance à différentes conditions de pH et de concentrations en sels biliaries. Par contre, pour les entérocoques leurs croissances se trouvent légèrement affectées à l'exception de l'*Enterococcus faecium* (E15).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Both et *al.*, (2010), qui ont montré que *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei* ont une bonne croissance à pH 3 et peuvent résister jusqu'à 3 heures d'incubation. En revanche, à pH 2 ces souches ne peuvent résister que pendant 30min. La cinétique de croissance dans différentes concentrations de sels biliaries a montré que la croissance est optimale à 0.5% de bile chez *Lactobacillus acidophilus*.

La survie des bactéries aux conditions du tube digestif est un critère incontournable de sélection de souches probiotiques (FAO/WHO, 2006). Cependant, c'est une fonction complexe mettant en jeu de nombreux mécanismes permettant aux bactéries de survivre à des environnements successifs très divers (pH bas, présence de sels biliaries).

De nombreuses techniques existent pour étudier la résistance aux pH acide. Elles sont basées sur la survie des bactéries mesurées principalement par le dénombrement sur des milieux de culture gélosés après exposition à des conditions mimant le pH de l'estomac. Les niveaux de pH et les durées d'expositions varient énormément et l'absence de standardisation de ces méthodes rend les comparaisons difficiles. De plus, il est connu que les bactéries possèdent des mécanismes inductibles connus sous le nom de tolérance au stress acide (Foster & Hall, 1991). Chez les bactéries lactiques, la tolérance au stress acide est augmentée en phase de croissance exponentielle.

Après ingestion, les bactéries lactiques rencontrent un environnement acide, l'estomac. La plupart des bactéries lactiques comme les streptocoques et lactobacilles sont naturellement bien adaptés à un pH acide, pouvant produire dans ces conditions des acides, et de fonctionner à bas pH (van de Guchte et al., 2002).

Une étude (Saadi, 2006) montre que les souches pures mésophiles de *Lactobacillus paracasei* présentent un taux de survie meilleur à pH4,3. La plupart des enzymes du métabolisme ayant un optimum d'activité à pH légèrement acide, une diminution brutale du pH entraîne un arrêt du métabolisme bactérien. En raison de leur catabolisme, les bifidobactéries acidifient leur environnement à travers la fermentation des sucres par la production d'acétate et de lactate (Vernazza et al., 2006).

Toutes nos souches ont montré une absence du caractère hémolytique. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Arasu et *al.*, (2015) qui ont montré que *Lactobacillus brevis* P68 ne présente pas le caractère hémolytique et cela indique que cette souche n'est pas virulente.

Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence des entérocoques représentent un sujet de recherche d'actualité. Leur présence est de plus en plus inquiétante lors d'infections nosocomiales et d'une multi résistance aux antibiotiques. Busani et *al.*, (2004) et Ben Omar et *al.*, (2004), ont montré que les espèces *Enterococcus* avec le plus haut niveau de virulence sont celles isolées des cas cliniques.

Les facteurs de virulence sont définis comme des éléments qui augmentent la capacité des microorganismes à provoquer la maladie : ils ne sont pas indispensables à la survie de la bactérie mais diminuent leurs potentiels pathogènes lorsqu'ils sont absents (Casadevall et Pirofski, 2001). Ces facteurs ont pour rôle de permettre l'adhérence aux cellules hôtes et à la matrice extra-cellulaire, de faciliter l'invasion des tissus, de moduler la réponse immunitaire et inflammatoire et causer des dommages par l'intermédiaire de toxines. Bien que la pathogénicité des entérocoques soit discutée dans certaines situations, des facteurs de virulence ont été décrits dans des modèles expérimentaux, mais les données concernant leur fréquence dans les isolats cliniques sont rares. De plus, la relation entre présence du facteur de virulence et gravité de la maladie n'est que peu soulignée (Dupont et Plantefève, 2002). Les entérocoques ne sont pas des bactéries très virulentes par rapport aux autres cocci à Gram positif comme le staphylocoque ou le pneumocoque si l'on considère la définition de la virulence par la quantité de bactéries qui tue 50 % des animaux (dose létale 50 %) (Casadevall et Pirofski, 2001).

Nos résultats montrent que les souches *Enterococcus faecium* (E15), *Enterococcus faecium* (E10), *Enterococcus durans*, présentent le gène de virulence responsable de la substance d'aggrégation (*asal*) et l'antigène de surface d'*Enterococcus* (*efafs*). En revanche, les gènes de virulence suivants sont absents chez nos souches testées, comme la Cytolysine (*cylA*), la Protéine de surface d'*Enterococcus* (*esp*) et de l'adhésine du collagène (*ace*).

La substance d'agrégation est un facteur trouvé exclusivement chez les souches d'*Enterococcus faecalis*. Il est codé par le gène *asal*, responsable d'une potentialisation de la

transmission de certains plasmides d'un entérocoque à un autre (Eaton et Gasson, 2001; Franz et al., 2001; Vankerckhoven et al., 2004).

Aucune étude n'a montré la pathogénicité des souches lorsqu'elles présentent une substance d'agrégation seule. En outre, une étude montre que la combinaison d'hémolysine et de la substance d'agrégation entraîne une mortalité accrue dans l'endocardite due à *E. faecalis* (Chow et al., 1993).

L'adhésine Ace (adhésine du collagène d'*E. faecalis*), facteur lié aux protéines de liaison au collagène. C'est le premier facteur décrit chez les entérocoques (Rich et al., 1999; Kowalski et al., 2006). Mais le rôle de l'adhésine Ace lors d'une infection n'est pas encore clairement déterminé, puisque les mutants par délétion, construits jusqu'à maintenant, n'ont pas été testés in vivo (Hall et al., 2007).

D'après Singh et al. (1998) le facteur de virulence efaAf est un gène responsable de l'adhésion à la paroi cellulaire. En outre, une étude récente (Lauková et al., 2015) a montré qu'*Enterococcus faecium* peut contenir gelE, efaAfm. Le gène efaAf ne peut pas causer une pathogénicité en absence d'autre gène de virulence (EFSA, 2004), et son rôle pathogène n'est pas encore prouvé (Eaton & Gasson, 2001)

D'autres auteurs ont montré que les gènes de virulences chez les *Enterococcus faecium* sont moins présents que chez *Enterococcus faecalis*, et l'incidence de ces gènes est faible chez *Enterococcus faecium* (Eaton & Gasson, 2001 ; Franz et al., 2001).

Etude de la modulation de la réponse allergénique chez les souris Balb/c

Les activités immunostimulantes ou immunomodulantes sont très recherchées chez les probiotiques. Celles-ci peuvent être étudiées par l'analyse de paramètres très variés liés à la réponse immunitaire innée ou adaptative de l'hôte. D'une façon générale, les probiotiques améliorent la réponse immunitaire innée mais leurs effets sur la réponse adaptative est souche dépendante (Gourbeyre et al., 2011)

Plusieurs mécanismes touchant à l'immunité ou à l'état de la muqueuse ont été suggérés pour expliquer l'effet protecteur des bactéries lactiques. Celles-ci pourraient, en diminuant la perméabilité intestinale très augmentée en période de réactivité allergique, participer à la diminution du passage des protéines alimentaires (Rautava et al., 2002).

Les résultats obtenus montrent que la sensibilisation des souris témoins positifs à la β -Lg et l' α -Lac se traduit par la production d'anticorps spécifiques avec prédominance des

IgG, IgG1 et IgE. La forte production de ce type d'immunoglobulines est parmi les paramètres qui traduisent une réponse immune de type Th2. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont montré que suite à une immunisation, les animaux produisent des titres importants en IgG totales, IgG1 et IgE (Adel- Patient et *al.*, 2000; Lifrani et *al.*, 2005 ; Negaoui et *al.*, 2009).

Par ailleurs, les souris intubées avec les différentes bactéries lactiques ont développé une faible production des immunoglobulines de type IgG, IgG1 et IgE, avec une forte production des IgG2a, ce type de production est parmi les indicateur d'une éventuelle réponse immune de type Th1 (Li et *al.*, 2003; Fukusawa et *al.*, 2007 ; Yu et *al.*, 2011).

En ce qui concerne l'étude de l'effet préventif de l'allergie, une première évaluation clinique portant sur l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* GG à des mères (2 à 4 semaines avant leur accouchement) et à leurs enfants (jusqu'à l'âge de 6 mois) a démontré une réduction de 50% de l'incidence de l'eczéma à l'âge de 2 ans (Kalliomaki et *al.*, 2001). La persistance dans le temps de cet effet préventif (à 4 et 7 ans) a pu être démontré par la suite par deux autres études portant sur les mêmes populations d'individus (Kalliomaki et *al.*, 2003 ; Kalliomaki et *al.*, 2007). Kalliomaki et *al.*, (2001) ont observé qu'après deux mois de traitement avec une formule supplémentée en *L. rhamnosus* GG et *B. lactis* Bb12, il y a une amélioration plus rapide de l'état atopique en comparaison avec le groupe placebo. Un effet préventif de *L. rhamnosus* GG a aussi été observé chez des enfants à risque nés de parents atopiques. Les mécanismes ainsi que les processus régulateurs de l'allergie sont loin d'être tous connus. Il a été montré également que *Lactobacillus rhamnosus* GG diminue l'allergie aux protéines de lait de vache chez des souris (Thang et *al.*, 2011).

De même, Maassen et *al.* (1998) ont montré que la phase de croissance de souches de lactobacilles pouvait changer le profil de réponse IgG1/IgG2a lorsque les bactéries étaient administrées oralement à des souris immunisées par un antigène T-dépendant, suggérant des capacités immunomodulatrices variables et donc des capacités différentielles à prévenir des réponses allergiques selon l'état des bactéries.

Dans ce contexte un groupe de travail (Fiocchi et *al.*, 2015), comprenant des expert internationaux de la World Allergy Organisation (WAO), a établi des recommandations pour la prise en charge préventive de l'allergie chez les enfant à risque. Ces nouvelles recommandation ont pour objectif d'encourager l'utilisation des probiotiques à titre préventif chez les femmes enceintes à haut risque d'allergie et chez leurs enfants.

Nos résultats montrent que l'intubation par le genre *Lactobacillus* aide à la prolifération des bactéries lactiques. Contrairement à *Enterococcus* où nous avons observé une prolifération moins importante.

Il a été montré que chez l'homme, l'administration de *bifidobacterium bifidum* ou de *Lactobacillus acidophilus* permet de multiplier environ par un facteur 10 le nombre de *colony forming units* (CFU) par gramme de selle. ces résultats sont également observés par Schriffin et *al.*, 1995 qui montrent que l'administration par voie orale des bactéries lactiques favorise le nombre de colonies dans les selles. Cette augmentation dépend du nombre de bactéries administrées par voie orale et le seuil critique dépend de l'espèce de micro-organisme. Pour *Lactobacillus casei* souche GG, la dose minimale pour induire une colonisation est de $1,2 \cdot 10^{10}$ CFU (Saxelin et *al.*, 1995). Chez l'homme supplémenté avec *Lactobacillus acidophilus*, on observe une augmentation significative du nombre de lactobacilles et de bifidobactéries.

Une autre étude a montré des modifications de l'activité métabolique et la composition de la microflore fécale humaine après administration de probiotiques chez les patients ayant syndrome de l'intestin irritable (Brigidi et *al.*, 2001).

Une barrière intestinale déficiente est très souvent associée à des pathologies liées à l'inflammation (colite ulcéreuse, maladie de Crohn) et à des maladies infectieuses (John et *al.*, 2011). Bien que les mécanismes ne soient pas encore clairement élucidés, certains probiotiques sont capables de renforcer la barrière intestinale et de limiter ainsi les infections par des pathogènes. Les allergies sont désormais l'une des maladies chroniques les plus répandues dans les pays développés (WHO, 1998). De nos jours, quelques études se concentrent sur les capacités des probiotiques à améliorer les symptômes des personnes souffrant d'allergies grâce à leur capacité à améliorer la maturation du tissu lymphoïde associé à l'intestin (Gut Associated Lymphoid Tissue, GALT). Il a été démontré que les probiotiques sont plus efficaces chez l'enfant que chez l'adulte. En fait, les bactéries aident à la maturation du système immunitaire et particulièrement dans le tissu lymphoïde intestinal. En condition normale, le GALT est immature pendant la grossesse, et l'environnement maternel permet d'initier une réponse immunitaire de type Th2 chez le nourrisson qui bascule vers une réponse non-allergique de type Th1 après la naissance afin de permettre l'établissement d'un microbiote (Falk et *al.*, 1998; Calder et *al.*, 2006).

Etude histologique de la muqueuse intestinale

Nos résultats montrent chez le groupe de souris sensibilisées aux lactoprotéines une atrophie villositaire accentuée et une infiltration des lymphocytes intra-épithéliaux. Les mêmes observations ont été faites par Addou et *al.*, 2004 Mehedi et *al.*, 2007, chez les animaux sensibilisés à la β -Lg.

Les probiotiques, par l'action de divers mécanismes et notamment leurs capacités à dialoguer avec les cellules du système immunitaire, peuvent maintenir l'équilibre entre le microbiote et le système immunitaire associé à la muqueuse (Grangette, 2011).

Nous avons également obtenu, peu de différences sur le plan structural chez les groupes de souris intubées avec *Enterococcus faecium* 1 (E15), *Enterococcus faecium* 2 (E10), *Enterococcus durans* (E40), *Lactobacillus brevis* (Lb), *Lactobacillus plantarum* (Lp), les villosités intestinales sont longues et fine, l'unistratification de l'épithélium reste comparable à celle du groupe témoin négatif. Chez les groupes de souris intubées avec *Enterococcus faecium* 2 (E10), *Enterococcus durans* (E40) puis immunisé à la β -Lg, l'infiltration lymphocytaire est plus au moins marquée. Nos résultats suggèrent que l'ingestion de probiotiques a un effet bénéfique sur la structure de l'épithélium intestinal des souris. Ces résultats sont en accord avec Fernandez, 2011, qui montrent que les probiotiques favorisent l'intégrité de l'épithélium intestinal en exerçant un rôle protecteur sur la structure de l'épithélium.

De nombreuses études ont analysé l'influence des probiotiques, utilisés seuls ou en associations, sur les allergies et les maladies.

Les probiotiques favorisent l'intégrité de l'épithélium intestinal en exerçant un rôle protecteur sur la structure de l'épithélium. Il a été montré *in vitro* que *L. rhamnosus* GG favorise la survie de cellules de côlon humaines et murines en diminuant le nombre de cellules apoptotiques (Lam et *al.*, 2007). La prévention de la destruction de l'épithélium induite par des médiateurs pro-inflammatoires, est une caractéristique des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Sartor, 2006).

L'écosystème microbien digestif est composé du microbiote de l'hôte et des aliments, il est responsable de l'homéostasie et participe au maintien de la santé de l'hôte (Barbut & Joly, 2010).

Test de provocation *ex vivo* en Chambre de Ussing

Des études réalisées chez des modèles animaux, sensibilisés par l'ovalbumine (Matsuzaki *et al.*, 1998) ou la caséine (Murosaki *et al.*, 1998), ont également mis en évidence une inhibition des réponses allergiques, néanmoins les mécanismes d'action permettant d'expliquer les effets potentiels des probiotiques sur l'allergie restent très mal connus (Grangette, 2007).

Il a été montré que les probiotiques ont une influence locale au niveau intestinal en diminuant la perméabilité de la barrière épithéliale et ainsi en diminuant la pénétration des antigènes dans la circulation systémique (Ozdemir, 2010). Ils ont un effet anti-inflammatoire en agissant à différents niveaux : Ils augmentent la production de lymphocytes Treg, ils stimulent les TLRs, favorisent la réponse Th1 et activent des cellules dendritiques tolérogènes, c'est-à-dire qui produisent davantage de médiateurs anti-inflammatoires et moins de médiateurs proinflammatoires (McLoughlin & Mills, 2011).

Nos résultats montrent une forte activité électrogénique reflétée par une augmentation hautement significative de l'Isc des jéjunums de souris immunisées à la β -Lg. Ils indiquent très clairement que cette augmentation de l'Isc est spécifique à l'antigène sensibilisant. Ces résultats sont en accord avec d'autres recherches réalisées *ex vivo* (Saïdi, 1995; Caldwell *et al.*, 2001; Addou *et al.*, 2004; Negaoui *et al.*, 2009; El-Mecherfi *et al.*, 2014).

De même, nos résultats révèlent une augmentation de la conductance des tissus des souris témoin positif ce qui suggère une altération de la barrière intestinale et une augmentation de la perméabilité de la voie paracellulaire, au niveau des jonctions serrées. Ces résultats sont en accord avec les travaux rapportés par la littérature (Addou *et al.*, 2004; Negaoui *et al.*, 2009; El-Mecherfi *et al.*, 2014).

Nos résultats montrent que la réaction anaphylactique locale produite par l'interaction directe de la β -Lg avec l'épithélium intestinal des souris sensibilisées, est atténuée chez les souris intubées par *Lactobacillus*. En effet, le dépôt de la β -Ig du côté séreux produit une faible stimulation de l'Isc et de la conductance des tissus. Ces résultats suggèrent que l'administration par voie orale de nos souches produit un effet préventif.

Afin de connaître la nature de l'augmentation de l'Isc, les tissus de témoin positif sont traités au furosémide. Ce diurétique est connu comme un inhibiteur du cotransporteur Cl/Na/K au niveau de la membrane basolatérale de l'entérocyte entraînant une déplétion de la cellule en Cl⁻ et donc une diminution de la sécrétion de chlore.

Nos résultats montrent clairement que cette augmentation de l'Isc spécifique à l'antigène sensibilisant est inhibée par le furosémide. Ces résultats permettent de conclure que les variations du courant de court circuit de base induite par la β -Lg sont essentiellement dues à un courant de chlore. Nos résultats concordent avec les travaux réalisés sur l'anaphylaxie intestinale se traduisant par la sécrétion de chlorure, chez de nombreuses espèces animales. (Saïdi et *al.*, (1994); Berin et *al.*, (1998); Addou et *al.*, (2004); Negaoui et *al.*, (2009)).

Conclusion

Dans ce travail nous avons évalué les propriétés technologiques, probiotiques et étudié l'effet préventif des bactéries lactiques isolées à partir du lait de chèvre sur la réponse allergénique aux lactoprotéines bovines chez la souris Balb/c.

Nous avons identifié cinq souches de bactéries lactiques; *Enterococcus faecium* W15, *Enterococcus faecium* W10, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum*.

Les cinq souches présentent un bon profil fermentaire associé à une forte production d'acide lactique avec une baisse de pH et une croissance bactérienne élevée.

L'évaluation de l'activité protéolytique montre que les lactobacilles hydrolysent les protéines (caséines, β -Lg et α -Lac) du lait de vache. Ces souches hydrolysent à pH neutre le caséinate de sodium et le lactosérum dénaturé, cette activité est optimale pour *Lactobacillus brevis* à 37 et 45°C et pour *Lactobacillus plantarum* à 37°C. Le test de l'effet des inhibiteurs montre que les protéases sont principalement des métallo- et des sérines protéases chez *Lactobacillus brevis* et des métallo-, des sérines et des cystéines protéase chez *Lactobacillus plantarum*.

L'activité antimicrobienne a été observée que chez les entérocoques. Les agents actifs sont de nature protéique, stables sur une large plage de pH et après des traitements thermiques sévères. Les bactériocines produites inhibent certaines bactéries lactiques et les bactéries pathogènes à Gram + et Gram- : *Carnobacterium maltaromaticum* CIP 103135, *Carnobacterium piscicola* S4312, *Enterococcus faecalis* JH2-2, *Enterococcus faecalis* JH2-2 rr 04, *Enterococcus faecium* P13, *Listeria grayi* CLIP 12518, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes* et *Vagococcus penaei* CIP 109914^T. Par ailleurs, *Esherichia coli* ATCC25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sont inhibées que par *Enterococcus faecium*2 (E10) et *Enterococcus durans*. L'analyse des trois souches d'*Enterococcus* a montré la présence des entérocoques A, B, chez *Enterococcus faecium* et entérocoques P, 31 chez *Enterococcus durans*.

Les cinq souches sont sensibles à la plupart des antibiotiques. Elles ont également montré une résistance à pH acide et aux sels biliaries, les lactobacilles présentent une meilleure résistance.

L'effet préventif a été observé avec les cinq souches lorsqu'elles sont administrées par voie orale chez des souris préalablement sensibilisées à la β -Lg et à l' α -Lac. Cet effet se traduit par un faible taux des IgG, IgG2a et IgE sériques anti β -Lg et anti α -Lac. Les taux les

plus bas sont observés chez *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* et *Enterococcus faecium* W15.

Le dénombrement au niveau de la muqueuse intestinale et des fèces a montré que les cinq souches stimulent la croissance des bactéries lactiques mais *Lactobacillus brevis* a un effet plus marqué.

L'administration des bactéries lactiques semble produire une faible stimulation de courant du court circuit (Isc) et de la conductance (G), traduisant une modulation de la réaction anaphylactique locale.

L'étude histologique des fragments jéjunaux de souris expérimentales a montré que les bactéries lactiques testées ont un effet probiotique car elles ont un effet protecteur vis-à-vis la muqueuse intestinale en limitant l'atrophie des villosités et l'infiltration lymphocytaire.

À la lumière des résultats obtenus dans cette étude, il est permis de conclure que le lait de chèvre dispose d'une biodiversité de bactéries lactiques qui peuvent être une source précieuse de souches ayant des propriétés technologiques, probiotiques intéressantes.

Les perspectives sont multiples :

- Déterminer la durée de conservation des aliments par nos bactériocines,
- Confirmer la présence des protéases par PCR gène spécifique
- Doser les cytokines pour déterminer le type de la réponse immunitaire
- Utiliser nos bactéries lactiques isolées dans le domaine agroalimentaire et dans la fabrication des laits hypoallergéniques.

Références bibliographiques

- **Abbas MH, Hassan FAM, Abd El-Gawad MAM et Enab AK.** Physicochemical Characteristics of Goat's Milk. *Life Sci. J.*, 2014; **11**(1): 307-317.
- **Accolas JP, Bloquel R et Regnier J.** Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yaourt. *Le Lait*, 1977; **67**: 1-23.
- **Addou S, Tomé D, Kheroua O et Saidi D.** Parenteral immunisation to β -lactoglobulin modifies the intestinal structure and mucosal electrical parameters in rabbit. *Int immunopharmacol*, 2004; **4**: 1559-1563.
- **Adel-Patient K, Créminon C, Bernard H, Clément G, Négroni L, Frobert Y, Grassi J, Wal JM et Chatel JM.** Evaluation of a high IgE responder mouse model of allergy to bovine β -lactoglobulin (β -Lg): development of sandwich immunoassay for total and allergen-specific IgE, IgG1 and IgG2a in β -Lg-sensitized mice. *J. Immunol. Methods*, 2000; **235**: 21-32.
- **Aguilar-Galve A, Dubois-Dauphi R, Destain J, Campos D et Thonart P.** Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2012; **16**(1): 67-76.
- **Ahmadova A, Dimov S, Ivanova I, Choiset Y, Chobert J.-M, Kuliev A et Haertlé T.** Proteolytic activities and safety of use of *Enterococci* strains isolated from traditional Azerbaijani dairy products. *Eur. Food. Res. Technol*, 2011; **233**:131–140.
- **Alais C, Linden G, Miclo L.** Biochimie alimentaire. 5e édition. Paris : Dunod, 2003. 250 p.
- **Al-Otaibi MM.** Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts from sameel milk : Asaudu traditional fermented milk. *Int J dairy Sci*, 2012; **7**(4): 73-83.
- **Ammor S, Tauveron G, Dufor E et Chevalier I.** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small - scale facility 1 -Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control.*, 2006; **17**: 454- 461.
- **Ammor M, Flórez A et Mayo B.** Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.*, 2007; **24**: 559–570.
- **Amroun-Laga TT et Zerrouki N.** Influence des saisons et de l'alimentation sur la composition du lait de chevres bedouines (CAPRA HIRCUS) . 22ème Forum des Sciences Biologiques de L'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB), du 28 au 31 mars 2011
- **Andrews MG.** Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 2001; **48**: 5-16.

- **Andrighetto C, Zampese L et Lombardi A.** RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Lett. Appl. Microbiol.*, 2001; **33**: 26-30.
- **APHA, AWWA, WEF.** Standard Methods for examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington: American Public Health Association; 2012, pp 1360.
- **Arasu MV, Al-Dhabi NA, Rejiniemon TS, Lee KD, Huxley VAJ, Kim DH, Duraipandiyan V, Karuppiyah P et Choi KC.** Identification and Characterization of *Lactobacillus brevis* P68 with Antifungal, Antioxidant and Probiotic Functional Properties. *Indian J Microbiol.*, 2015; **55**(1):19–28
- **Asselin, J, Hebert J et Amiot J.** Effects of *in vitro* proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *J Food Sci*, 1989; **54**: 1037-1039.
- **Atlan D, Gilbert C, Blanc B et Portalier R.** Cloning, sequencing and characterization of the pepIP gene encoding a proline iminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397. *Microbiol.*, 1994; **140**(3): 527-535.
- **Atlan D, Laloi P et Portalier R.** Isolation and Characterization of Aminopeptidase Deficient *Lactobacillus bulgaricus* Mutants. *Appl Environ Microbiol.*, 1989; **55** (7): 1717-1723.
- **Atlan D, Laloi P et Portalier R.** X-Prolyl-Dipeptidyl Aminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: Characterization of the Enzyme and Isolation of Deficient Mutants. *Appl Environ Microbiol.*, 1990; **56** (7): 2174-2179.
- **Badis A, Guetarni D, Moussa Boudjema B, Henni DE, Tornadijo E et Kihal M.** Characteristics of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiol.*, 2004; **21**(3): 343-349.
- **Badis A, Laouabdia-Sellami N, Guetarni D, Kihal M, Ouzrout R.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales ‘‘ARABIA et KABYLE ‘‘. *Sci. Technol*, 2005 ; **23**: 30-37.
- **Badis A, Guetarni D, Boudjema BM, Henni DE et Kihal M.** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiol*, 2004a ; **21**: 579-588.
- **Bahna SL.** Cow's milk allergy versus cow milk intolerance. *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 2002; **89**: 56-60.

- **Baker GC, Smith JJ et Cowan DA.** Review and re-analysis of domain specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods*, 2003; **55**: 541-555.
- **Barbut F et Joly F.** Le microbiote intestinal : équilibre et dysbiose. *Hépto-Gastro & Oncol Digest.*, 2010; **17** (6) : 511-520.
- **Baumgartner M, Brown CA, Exl BM, Secretin MC, van't Hof M et Haschke F.** Controlled trials investigating the use of one partially hydrolyzed whey formula for dietary prevention of atopic manifestations until 60 months of age: an overview using meta-analytical techniques. *Nutr Res*, 1998; **18**:1425-42.
- **Béal C et Sodini I.** Fabrication des yaourts et des laits fermentés, Techniques de l'Ingénieur f6315, Paris France ; 2012,16 p.
- **Béal C, Marin M, Fontaine E, Fonseca F et Obert JP.** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 2008, 661 -765.
- **Ben Omar N, Castro A, Lucas R, Abriouel H, Yousif NMK, Franz CMAP, Holzappel WH, Pérez-Pulido R, Martínez-Cañamero M et Gálvez A.** Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst. Appl Microbiol*, 2004; **27**: 118-130.
- **Benito MJ, Serradilla MJ, Ruiz-Moyano S, Martín A, Pérez-Nevado F et Córdoba G.** Rapid differentiation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of Iberian dry-fermented sausages. *Meat Sci*, 2008; **80**: 656-661.
- **Berin M, Kiliaan AJ, Yang PC, Groot JA, Kitamura Y et Perdue MH.** The influence of the mast cells on pathways of transepithelial antigen transport in rat intestine. *J Immunol*, 1998; **161**: 2561-2566.
- **Biscola V, Todorov SD, Capuano VSC, Abriouel H, Gálvez A et Franco BDGM.** Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. *Meat Sci*, 2013; **93**: 607 –613
- **Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T et Mikelsaar M.** Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol*, 2001; **108** (4):516-20.
- **Botelho MM, Valente-Mesquita VL, Oliveira KMG, Polikarpov I et Ferreira ST.** Pressure denaturation of β -lactoglobulin, different stabilities of isoforms A and B, and an investigation of the Tanford transition. *Eur J Biochem*, 2000; **267** : 2235-2241.

- **Both E, György E, Kibédi-szabó ZC, Tamás E, Ábrahám B, Miklóssy I et Lányi S.** Acid and bile tolerance, adhesion to epithelial cells of probiotic microorganisms. *U.P.B. Sci. Bull.*, 2010; **72** (2): 37-44.
- **Bouton Y, Guyot P, Dasen A et Grappin R.** Activité protéolytique de souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de Comté. *Lait*, 1993 ; **73** : 265-279.
- **Bredholt S, Nesbakken T et Holck A.** Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. *Int J Food Microbiol*, 2001; **71**: 191–196.
- **Brigidi P, Vitali B, Swennen E, Bazzocchi G et Matteuzzi D.** Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Res Microbiol*; 2001, **152**:735-41.
- **Busani L, Del Grosso M, Paladini C, Graziani C, Pantosti A, Biavasco F et Caprioli A.** Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and -resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. *Int J Food Microbiol*, 2004; **97**(1): 17-22.
- **Calder PC, Krauss-Etschmann S, de Jong EC, Dupont C, Frick JS, Frokiaer H, Heinrich J, Garn H, Koletzko S, Lack G, Mattelio G, Renz H, Sangild PT, Schrezenmeir J, Stulnig TM, Thymann T, Wold AE et Koletzko B.** Early nutrition and immunity - progress and perspectives. *Br J Nutr*, 2006; **96** (4): 774-790.
- **Caldwell DJ, Harari Y, Hargis BM et Castro GA.** Intestinal anaphylaxis in chickens: epithelial ion secretion as a determinant and potential component of functional immunity. *Dev Compar Immunol*, 2001; **25**: 169-176.
- **Callon C, Duthoit F, Delbes C, Ferrand M, Le Frileux Y, De Cremoux R et Montel MC.** Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. *Syst. Appl Microbiol*, 2007; **30**: 547-560.
- **Campos CA, Rodríguez Ó, Calo-Mata P, Prado M et Barros-Velázquez J.** Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res Int*, 2006; **39**: 356-364.
- **Carr FJ, Hill D et Maid N.** The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol*, 2002; **28**: 281-370.

- **Casadevall A et Pirofski L.** Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Infect. Dis.*, 2001; **184**:337-344.
- **CEAEQ.** Recherche et dénombrement des entérocoques (2000). Méthode par filtration sur membrane. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, gouvernement du Québec, p27.
- **Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, Lee F et Shroff KE.** Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): The roles of enteric bacteria and viruses. *Dev. Immunol*, 1998; **6**:13-8.
- **Chandra RK.** Five-year follow-up of high-risk infants with family history of allergy who were exclusively breastfed or fed partial hydrolysate, soy, and conventional cow's milk formulae. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1997; **24**:380-388.
- **Chapot-Chartier MP, Rul F, Nardi M et Gripon JC.** Gene cloning and characterization of PepC, a cysteine aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus*, with sequence similarity to the eucaryotic bleomycin hydrolase. *Eur J Biochem.*, 1994; **224** (2): 497-506.
- **Chavagnat F, Meyer J et Casey MG.** Purification, characterisation, cloning and sequencing of the gene encoding oligopeptidase PepO from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Microbiol Lett.*, 2000; **191** (1): 79-85.
- **Chekroun A, Bensoltane A, Kheroua O et Saidi D.** Dietetic valorisation of cow's milk proteins fermented at 45°C by *Lactobacillus acidophilus* associated with *Bifidobacteria*. *J. Agric. Sci. Technol.*, 2011; **5**(3):282–289.
- **Chen YS, Liou MS, Ji SH, Yu CR, Pan SF et Yanagida F.** Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Yan-tsai-shin (fermented broccoli stems), a traditional fermented food in Taiwan. *J. Appl. Microbiol*, 2013; doi:10.1111/jam.12199.
- **Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB et Zervos MJ.** Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993; **37**(11): 2474-2477.
- **Chung HL, Hwang JB, Park JJ, et Kim SG.** Expression of transforming growth factor beta1, transforming growth factor type I and II receptors, and TNF- alpha in the mucosa of the small intestine in infants with food protein-induced enterocolitis syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, 2002; **109**:150–4.
- **Clausen EM, Green BL et Litsky W.** Fecal streptococci: indicators of pollution. Dans: hoadlay AW, Dutka BJ. Bacterial indicators/health hazards associated with water. *American Society for Testing and Materials*, 1977; pp 247-264.

- **Cleveland J, Montville TJ, Nes IF et Chikindas ML.** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol*, 2001; **71**: 1–20.
- **Cogan TM, Barbosa M, Beuquier E, BianchiSalvadori B, Cocconcelli PS, Fernandes I, Gomez J, Gomez R, Kalantzopoulos G, Ledda A, Medina M, Rea MC et Rodriquez E.** Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res*, 1997; **64**: 409-421.
- **Collins JK, Thornton G et Sullivan GO.** Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J*, 1998; **8**: 487-490.
- **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.** Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2003; **21**:364-391.
- **Dacosta Y.** La bioconservation des aliments. L'antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologique. Ed. Yves Dacosta. Paris. 2000, 196p.
- **Dalmasso M, Prestoz S, Rigobello V et Demarigny Y.** Behavior of *Lactococcus lactis subsp lactis* biovar. diacetylactis in a Four Lactococcus Strain Starter during Successive Milk Cultures. *Food Sci Technol Int*, 2008; **14**: 469-477.
- **De Kwaadsteniet M, Todorov SD, Knoetze H et Dicks LM.** Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol*, 2005; **105**(3): 433-44.
- **De Boissieu. D.** Allergie aux protéines du lait de vache, réalités pédiatriques, 2013; **179**: 11-13.
- **De Kwaadsteniet M, Todorov SD, Knoetze H et Dicks LM.** Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol*, 2005; **105**(3): 433-44.
- **De Moreno de Leblanc A, Del Carmen S, Zurita-Turk M, Santos Rocha C, Van de Guchte M, Azevedo V, Miyoshi A et Leblanc JG.** Importance of IL-10 modulation by probiotic microorganisms in gastrointestinal inflammatory diseases. *ISRN gastroenterol*, 2011; doi:10.5402/2011/892971.
- **De Vuyst L, Moreno M et Revets H.** Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int.J.Food Microbiol.*, 2003; **84**: 299-318
- **De Waard R, Claassen E, Bokken CAM, Buiting B, Garssen J et Vos JG.** Enhanced immunological memory responses to *Listeria monocytogenes* in rodents,

as measured by delayed-type hypersensitivity (DTH), adoptive transfer of DTH, and protective immunity, following *Lactobacillus casei* Shirota ingestion. *Clin. Diagn. Lab Immunol*, 2003; **10**: 59-65.

- **Deibel RH.** Group D streptococci. *Bacteriol Reviews*, 1964; **28**: 330-340.
- **Dellaglio F, De Roissart H, Torriani S, Curk MC et Janssens D.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries Lactiques (Tome I), Lorica (ed) 1994, 25-70.
- **Desjeux JF.** Valeur nutritionnelle du lait de chèvre. *Lait*, 1993; **73** : 573-580.
- **Dias MJ, Tanezini CA, D'Alessandro WT, DE Oliveria ABC, Rocha J DE M, Pontes I DOS S, De Carvalho AL, DE Sousa JT.** Mineral characteristics of raw goat milk from the region of Goiania. *Brazil.Aust.J.Sci.*, 1994; **7**: 63-68.
- **Dib H, Hajj Semaan E, Mrad R, Ayoub J, Choueiry L, Moussa H et Bitar G.** Identification et évaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels. *Leban. Sci J.*, 2012; **13** (1):43-48.
- **Doi E, Shibata D et Matoba T.** Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal Biochem*, 1981; **118**: 173-184.
- **Dortu C et Thonart P.** Bacteriocins from lactic acid bacteria: interest for food products biopreservation. *Biotechnol Agron Soc*, 2009; **13**: 143-154.
- **Drider D, Fimland G, He'chard Y, McMullen LM and Prévost H.** The continuing story of class IIa bacteriocin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2006; **70**(2), 564-582.
- **Du Toit M, Franz CM, Dicks LM et Holzapfel WH.** Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J. Appl. Microbiol*, 2000; **88**(3): 482 - 494.
- **Dufour E.** In: Minéraux et produits laitiers. Lavoisier (Ed.); Editions TEC & DOC: Paris; 2004 ; pp. 151-177.
- **Dupont G et Plantefève H.** Infections sévères à entérocoque en réanimation. Conférences d'actualisation. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, et Sfar 2002, p. 541-554.
- **Eaton T et Gasson MJ.** Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.*, 2001; **67**:1628-1635.

- **Edwards PJB, Jameson GB, Palmano KP, et Creamer LK.** Heat-resistant structural features of bovine [beta]-lactoglobulin A revealed by NMR H/D exchange observations. *Int Dairy J.*, 2002; **12**: 331-344.
- **EFSA.** Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the safety of product Oralin for dogs. *The EFSA Journal*, 2004; **51**: 1-6.
- **EFSA.** EFSA delivers advice on further 808 health claims. European Food Safety Authority (EFSA) 2010. Accessed (15.03.2011) at: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/nda101019.htm>.
- **EFSA, European Food Safety Authority.** Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA Journal.*, 2008; **732**:1–15.
- **Eggesbo M, Botten G, Stigum H, Nafstard P et Magnus P.** Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy? *J Allergy Clin Immunol*, 2003; **112**:420–6.
- **Eijsink VGH, Skeie M, Middelhoven PH, Brurberg MB et NES IF.** Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998; **64** (9): 3275-3281.
- **El Mecherfi KE, Rouaud O, Curet S, Negaoui N, Chobert J-M, Kheroua O, Saidi D et Haertlé T.** Peptic hydrolysis of bovine beta-lactoglobulin under microwave treatment reduces its allergenicity in an ex vivo murine allergy model. *Int J Food Sci. Technol.*, 2014; doi:10.1111/ijfs.12653
- **El-Ghaish S, Dalgalarrrondo M, Choiset Y, Sitohy M, Ivanova I, Haertlé T et Chobert J-M.** Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. *Eur. Food Res. Technol.*, 2010b; **230**: 635–643.
- **El-Ghaish S, Dalgalarrrondo M, Choiset Y, Sitohy M, Ivanova I, Haertlé T et Chobert J-M.** Screening of strains of lactococci isolated from Egyptian dairy products for their proteolytic activity. *Food Chem*, 2010a; **120**: 758-764
- **El-Ghaish S, Hadji-Sfaxi I, Ahmadova A, Choiset Y, Rabesona H, Sitohy M, Haertlé T et Chobert J-M.** Characterization of two safe Enterococcus strains producing enterocins isolated from Egyptian dairy products. *Benef Microbes*, 2011; **2** (3): 15-27
- **Elsilk SE, Azab EA et Tahwash A.** Bacteriocins-Like Substances Produced by Enterococcus sanguinicola Isolated from Traditional Egyptian Food Sires (*Chichorium pumilum*). *JSM Microbiol*, 2015; **3**(1): 10-18.

- **Enan G, Al-Mohammadi AR, El-Didamony G, Abdel-Haliem MEF et Zakaria A.** Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* NM2 isolated from urine : purification, characterization and bactericidal action of enterocin NM2. *Asian J Appl Sci*, 2014; **7**(7): 621-634.
- **Facklam RR, Sahn DF et Teixeira LM.** *Enterococcus*. Dans Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of clinical microbiology, *Am Soc Microbiol*, 1999; 297-305.
- **Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T et Gordon JI.** Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998; **62**: 1157-1170.
- **FAO (Food and Agricultural Organization.** Major food and agricultural commodities and producers. Country by commodity. 2006; Available from :<http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html>.
- **FAO/OMS.** Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Organización Mundial de la Salud, 2004.
- **FAO/WHO.** Guidelines for the evaluation of probiotics in food in Report of a Joint FAO/WHO. C. Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture. Organization of the United Nations and World Health Organization: Ontario, Canada., 2002.
- **FAO/WHO.** Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. . In: FAO Food and Nutrition Paper 85 Roma 2006.
- **Feliachi K.** Rapport national sur les ressources génétiques animales : Algérie. Commission Nationale, Point focal Algérien pour les ressources génétiques, Octobre, 2003; 1-46.
- **Fernandez EM, Valenti V, Rockel C, Hermann C, Pot B, Boneca IG et Grangette C.** Antiinflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut*, 2011; **60**(8):1050-1059.
- **Fernandez-Espla MD, Garault P, Monnet V et Rul F.** *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol.*, 2000; **66** (11): 4772-4778.
- **Fimland G, Johnsen L, Axelsson L, Brurberg MB, Nes IF, Eijsink VGH et Nissen-Meyer J.** A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.*, 2000; **182**: 2643–2648.

- **Fiocchi A, Pawankar R, Cuello-Garcia C, Ahn K, Al-Hammadi S, Agarwal A, Beyer K, Burks W, Canonica GW, Ebisawa M, Gandhi S, Kamenwa R, Lee BW, Li H, Prescott S, Riva JJ, Rosenwasser L, Sampson H, Spigler M, Terracciano L, Vereda-Ortiz A, Wasserman S, Yepes-Nuñez JJ, Brożek JL et Schünemann HJ.** World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Probiotics. *World Allergy Organization Journal*, 2015; 8:4.
- **Fira D, Kojic M, Banina A, Spasojevic I, Strahinic I et Topisirovic L.** Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *J.Appl.Microbiol.*, 2001; **90**: 123-130
- **Foster JW et Hall HK.** Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 1991; **173**: 5129-5135.
- Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J et Holzapfel WH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol.*, 2001;**67**:4385-4389.
- **Franz CMAP, van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H et Galvez A.** Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev*, 2007; **31**: 293–310.
- **Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J et Holzapfel W.** 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol*, 2001; **67**: 4385 – 4389.
- **Fukusawa T, Murashima K, Matsumoto I, Hosono A, Ohara H, Nojiri C, Koga J, Kubota H, Kanegae M, Kaminogawa S, Abe K et Kono T.** Identification of marker genes for intestinal immunomodulating effect of fructo-oligosaccharide by DNA microarray analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 2007; **55**(8): 3174-3179.
- **Gálvez, A., Lopez, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E., and Omar, N. B.** Application of bacteriocins in the control of food borne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit Rev Biotechnol.*, 2008; **28**: 125-152.
- **Garneau S, Martin NI et Vederas JC.** Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochem.*, 2002; **84**: 577-592.
- **Gelsomino R, Vancanneyt M, Condon S, Swings J et Cogan TM.** Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *Int J Food Microbiol*, 2001; **71**: 177-188.
- **Ghoddusi HB et Robinson RK.** Enumeration of starter cultures in fermented milks. *J Dairy Res*, 1996; **63**: 151-158.

- **Gilbert C, Atlan D, Blanc B et Portalier R.** Proline iminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397: purification and characterization. *Microbiol*, 1994; **140** (3): 537-542.
- **Gilbert C, Atlan D, Blanc B, Portailier R, Germond JE, Lapierre L et Mollet B.** A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the prtB gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J Bacteriol.*, 1996; **178** (11): 3059-3065.
- **Gobbetti M, Smacchi E et Corsetti A.** The proteolytic system of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1: purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase. *Appl Environ Microbiol*, 1996; **62** (9): 3220-3226.
- **Gourbeyre P, Denery S et Bodinier M.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J Leukoc Biol*, 2011; **89**: 685-695.
- **Grangette C.** Probiotiques et régulation de la réponse immune allergique et inflammatoire. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 2007; **42**: 76-85.
- **Grangette C.** Probiotiques et régulation de la réponse immunitaire: impact sur les maladies allergiques et les maladies inflammatoires intestinales. *Phytothérapie*, 2011; **9** (2): 93-99.
- **Hadji Sfaxi I, El-Ghaish S, Ahmadova A, Rabesona H, Haertlé T et Chobert JM.** Characterization of new strain *Lactobacillus paracasei* I-N-10 with proteolytic activity: Potential role in decrease in b-casein immuno-reactivity. *Eur. Food Res. Technol.*, 2012; **235**: 447-455.
- **Haenlein GFW.** Goat milk in human nutrition. *Small Rum. Res.*, 2004; **51**(2): 155-163.
- **Hall AE, Gorovits EL, Syribeys PJ, Domanski PJ, Ames BR, Chang CY, Vernachio JH, Patti JM et Hutchins JT.** Monoclonal antibodies recognizing the *Enterococcus faecalis* collagen-binding MSCRAMM Ace: conditional expression and binding analysis. *Microb Pathog*, 2007; **43**(2-3): 55-66.
- **Hancock LE et Gilmore MS.** Pathogenicity of enterococci. In Fischetti VA, Novick RP, Ferritti JJ, Portnoy DA, Rood JI Gram positive pathogens. *Am. Soc. Microbiol.*, 2000; 251-258.
- **Heinzmann A, Blattmann S, Spuergin P, Forster J et Deichmann KA.** The recognition pattern of sequential B cell epitopes of beta-lactoglobulin does not vary with the clinical manifestations of cow's milk allergy. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999; **120**: 280-6.
- **Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW et Tagg JR.** The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: Riley MA, Chavan M, editors. *Bacteriocins: ecology and evolution*. Springer; Berlin: 2007; 45-92.
- **Heng, NC et Tagg JR.** What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2006; **4**: 1-2.

- **Heyman M, Ducro R, Desjeux JF et Morgat JL.** Horseradish peroxydase transport across adult rabbit jejunum in vitro. *Am J Physiol*, 1982; **242**: 558-948.
- **H-Kittikun A, Biscola V, El-Ghaish S, Jaffres E, Dousset X, Pillot G, Haertlé T, Chobert J-M et Hwanhlem N.** Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* K T2W2 G isolated from mangrove forests in southern Thailand: Purification, characterization and safety evaluation. *Food Control*, 2015; **54**: 126 – 134.
- **Hols P, Hancy F, Fontaine L, Grossiord B, Prozzi D, Leblond-Bourget N, Decaris B, Bolotin A, Delorme C et Dusko Ehrlich S.** New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev.*, 2005; **29** (3): 435-463.
- **Holzappel WH, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J et Schillinger U.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition, *Am J Clin Nutr*, 2001; **73**: 365-373.
- **Hörmannsperger G et Haller D.** Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol*, 2010; **300** (1): 63–73.
- **Hosseini, S.V, Arlindo, S, Bohme, K, Fernandez-NO, C., Calo-Mata, P., et Barros-Velázquez** molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing enterococcus faecium isolated from nonfermented animal foods. *J. Appl. Microbiol.*, 2009; ISSN.1364-5072.
- **Høst A.** Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 2002; **89**: 33-7.
- **Hould R.** Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Paris Montréal, Maloine-Décarie, 1984; Chap II, 147-156.
- **Hughes MC, Kerry JP, Arendt EK, Kenneally PM, Mcsweeney PLH et O'neill EE.** Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Sci.*, 2002; **62**: 205-216.
- **Huys G, Vancanneyt M, D'haene K, Vankerckhoven V, Goossens H et Swings J.** Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res Microbiol*, 2006; **157**: 803-810.
- **Hwanhlem N, Jaffrès E, Dousset X, Pillot G, Choiset Y, Haertlé T, H-Kittikun A et Chobert J-M.** Application of a nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L isolated from brackish water for biopreservation in cooked, peeled and ionized tropical shrimps during storage at 8 °C under modified atmosphere packaging. *Eur Food Res Technol*, 2015. DOI 10.1007/s00217-015-2428-8

- **Ibsaine O, Djenouhat K, Lemdjadani N, Berrah H.** Incidence de l'allergie aux protéines du lait de vache IgE-médiée au cours de la première année de vie. *Nutr. Santé*, 2013; **02** (01) : 9-16
- **Jack RW, Tagg JR et Ray B.** Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*, 1995; **59**: 171–200.
- **Jay JM.** Fermentation and fermented dairy products. In *Modern Food Microbiology*, 6th edition. An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, USA 2000 113-130
- **John LJ, Fromm M et Schulzke JD.** Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxid Redox Sign.*, 2011;**15**(5):1255-70.
- **Jouan P.** Lactoprotéines et lactopeptides, propriétés biologiques. Paris: INRA, 2002. 127 p.
- **Jurkovic D, Krizkova L, Sojka M, Belicova A, Dusinsky R, Krajcovic J, Snauwaert C, Naser S, Vandamme P et Vancanneyt M.** Molecular identification and diversity of enterococci isolated from Slovak Bryndza cheese. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2006; **52**: 329-337.
- **Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P et Isolauri E.** Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebocontrolled trial. *Lancet*, 2001; **357**(9262): 1076-9.
- **Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H et Isolauri E.** Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2003; **361**(9372):1869-71.
- **Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T et Isolauri E.** Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*, 2007; **119**(4):1019-21.
- **Kamiya T, Wang L , Forsythe P, Goettsche G, Mao Y, Wang Y, Tougas G et Bienenstock J.** Inhibitory effects of *Lactobacillus reuteri* on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats. *Gut*, 2006; **55** (2): 191– 196.
- **Kandler O et Weiss N.** Regular non sporing Gram positif rods. Genus *Lactobacillus*. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Vol. 2 Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.G. Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1986; 1209-1234.
- **Karmarkar MG, Gershon ET et Mehta PR.** Enterococcal infections with special reference to phenotypic characterization and drug resistance. *Indian J. Med. Res.*, 2004; **119**: 22-25.

- **Katla A, Kruse H, Johnsen G et Herikstad H.** Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int.J.Food Microbiol.*, 2001; **67**: 147– 152
- **Kaur N, Chen C-C, Luther J et Kao JY.** Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut microbes*, 2011; **2** : 211–6.
- **Ke D, Picard F, Martineau F, Menard C, Roy PH, Oulette M et Bergeron MG.** Development of PCR assay for rapid detection of Enterococci. *J.Clin.Microbiol.*, 1999; **37**: 3497-3503
- **Kim S-H, Lee K-Y et Jang, Y-S.** Mucosal Immune System and M Cell-targeting Strategies for Oral Mucosal Vaccination. *Immune network*, 2012; **12**: 165–75.
- **Klaenhammer TR.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 1988; **70**: 337-349.
- **Klaenhammer TR.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1993; **12**(1-3): 39-85.
- **Klein G, Pack A et Reuter G.** Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998; **64**: 1825-1830.
- **Klibi N, Jouini A, Rojo-Bezares B, Masmoudi A, Ruiz-Larrea, Boudabous A et Torres C.** Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in clinical enterococcal isolates of Tunisia. *World J Microbiol. Biotechnol.*, 2008; **24**: 653-657.
- **Konings WN, Lolkema JS, Bolhuis H, van Veen HW, Poolman B et Driessen AJM.** Mécanismes du transport des nutriments dans les bactéries lactiques. Bactéries lactiques. 1 (De Roissart, H. Luquet, F.M.), 1994; 209-238.
- **Kowalski WJ, Kasper EL, Hatton JF, Murray BE, Nallapareddy SR et Gillespie MJ.** *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin. *J Endod*, 2006; **32**(7): p. 634-7.
- **Kramer MS et Kakuma R.** Maternal dietary antigen avoidance during pregnancy or lactation, or both, for preventing or treating atopic disease in the child. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2006; **19** (3) : CD000133
- **Kravtsov EG, Yermolayev AV, Anokhina IV, Yashina NV, Chesnokova VL et Dalin MV.** Adhesion characteristics of Lactobacillus is a criterion of the probiotic choice. *Bull. Exp. Biol. Med*, 2008; **145**: 232-234.
- **Kumar S, Kumar B, Kumar R, Kumar S, Khatkar S et Kanawjia SK.** Nutritional Features of Goat Milk. A Review. *Indian. J. Dairy Sci.*, 2012; **65**(4): 266-273.

- **Laan MP, Tibbe GJ, Oranje AP, Bosmans EP, Neijens HJ et Savelkoul HF.** CD4+ cells proliferate after peanut-extract-specific and CD8+ cells proliferate after polyclonal stimulation of PBMC of children with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*, 1998; **28**: 35–44.
- **Laemmli U.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; **227**: 680-685
- **Lam EK, Yu L, Wong HP, Wu WK, Shin VY, Tai EK, So WH, Woo PC et Cho CH.** Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances gastric ulcer healing in rats. *Eur J Pharmacol*, 2007; **565**: 171-179.
- **Laubereau B, Filipiak-Pittroff B, von Berg A, Grübl A, Reinhardt D, Wichmann HE et Koletzko S.** GINI Study Group. Caesarean section and gastrointestinal symptoms, atopic dermatitis, and sensitisation during the first year of life. *Arch Dis Child*, 2004; **89**(11):993–997.
- **Lauková A, Stropfová V, Kandričáková A, Ščerbová J, Semedo-Lemsaddek T, Miltko R et Belzecki G.** Virulence factors genes in enterococci isolated from beavers (*Castor fiber*). *Folia Microbiol.*, 2015; **60**(2):151-4.
- **Lee J. W., Shin J. G., Kim E. H., Kang H. E., Yim I. B., Kim J. Y., Joo H. G. & Woo H. J.,** Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *J Vet Sci*, 2004; **5**: 41-48.
- **Lee J, Mo J-H, Shen C, Rucker AN, Raz E.** Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells contributes to colonic homeostasis. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2007; **23**: 27–31.
- **Lehmann I, Rehwagen M, Diez U, Seiffart A, Rolle-Kampczyk U, Richter M, Wetzig H, Borte M et Herbarth O.** Enhanced in vivo IgE production and T cell polarization toward the type 2 phenotype in association with indoor exposure to VOC : results of the LARS study. *Int J Hyg Environ Health*, 2001; **204**: 211-21.
- **Lehmann I, Thielke A, Weiss M, Schlink U, Schulz R, Diez U, Sierig G, Emmrich F, Jacob B, Belcredi P, Bolte G, Heinrich J et Herbarth O, Wichmann HE, Borte M.** T cell reactivity in neonates from an East and a West German city - results of the LISA study. *Allergy*, 2002; **57**:129-136.
- **Lemerdy P, Moneret-Vautrin DA, Rancé F, Kanny G et Parisot L.** Prevalence of food allergies in pediatric and adult populations. *CICBAA Databank Alim Inter*, 2003; **8**: 5-7.
- **Leroy FMR, Foulquié Moreno L et DeVuyst L.** *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003; **88**: 235-240.

- **Li XM, Srivastava K, Grishin A, Huang CK, Schofield B, Burks W et Sampson HA.** Persistent protective effect of heat-killed *Escherichia coli* producing "engineered," recombinant peanut proteins in a murine model of peanut allergy. *J Allergy Clin.Immunol.*, 2003; **112**(1):159-67.
- **Lifrani A, Dubarry M, Rautureau M, Aattouri N, Boyaka PN et Tome D.** Peanut-lupine antibody cross-reactivity is not associated to cross-allergenicity in peanut-sensitized mouse strains. *Int Immunopharmacol*, 2005; **5**: 1427 – 1435.
- **Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L et Hollingsworth MA.** Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J Physiol.*, 1999; **276**: 941-50.
- **Mahé MF, Manfredi E, Ricordeau G, Piacere A et Grosclaude F.** Effet du polymorphisme de la caséine α S1 caprine sur les performances laitière : Analyse intradescendance de boucs de race Alpine. *Gen. Sci. Evol.*, 1993; **26**: 151-157.
- **Maqueda M, Gálvez A, Bueno MM, Sanchez-Barrena MJ, González C, Albert A, Rico M et Valdivia E.** Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr Protein Pept Sci.*, 2004; **5**: 399-416.
- **Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S et Yokokura T.** The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J. Dairy Sci.*, 1998; **81**: 48-53.
- **Mc Loughlin RM et Mills KHG.** Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma. *J Allergy Clin.Immunol.*, 2011; **127** (5):1097-1107
- **McAuliffe O, Ross RP et Hill C.** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev.*, 2001; **25**: 285–308.
- **Medzhitov R.** Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 2007; **449**: 819–26.
- **Mehedi N, Kaddouri H, Saidi D et Kheroua O.** Effect of oral and parenteral sensitization to bovine β -lactoglobulin on intestinal structure in rats. *Dirasat, Pure Sci.*, 2007; **34**: 58-66.
- **Mereado SS.** Goat milk industry in Mexico. Proc. 3ed Intr. Conf. on Goat Production and Diseases. Scottsdale, A₂. *Dairy Goat J. Publication*, 1982.
- **Metchnikoff.** Prolongation of life: Optimistic studies,. William Heinemann, London 1908, 161-183

- **Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, et al.** The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut*, 2010 ; **59**: 325–32.
- **Monnet V, Latrille E, Béal C et Corrieu G.** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 2008, 512- 592.
- **Morel F, Frot-Coutaz J, Aubel D, Portalier R et Atlan D.** Characterization of a prolidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397 with an unusual regulation of biosynthesis. *Microbiol*, 1999;**145**: 437-446.
- **Morishita T, Deguchi Y, Yajima M, Sakurai T et Yura T.** Multiple Nutritional Requirements of Lactobacilli: Genetic Lesions Affecting Amino Acid Biosynthetic Pathways. *J. Bacteriol.*, 1981; **148**: 64-71.
- **Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M et Cheroutre H.** Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 2007; **317**: 256–60.
- **Murosaki S, Yamamoto Y, Ito K, Inokuchi T, Kusaka H, Ikeda H et Yoshikai Y.** Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1998, **102**: 57-64.
- **Negaoui H, Kaddouri H, Kheroua O et Saidi D.** A Model of Intestinal Anaphylaxis in Whey Sensitized Balb/c Mice. *Am J Immunol*, 2009; **5**(2): 56-60.
- **Nes IF.** History, current knowledge and future directions on bacteriocin research in lactic acid bacteria. In: Prokaryotic antimicrobial peptides: From genes to application, Edited by Drider D, Rebuffat S. Springer, New Yor; 2011, pp. 3-12.
- **Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC.** Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2009; **15** (2): 300–310.
- **Nigatu A.** Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. *J Appl. Microbiol*, 2000; **89**: 969 – 978.
- **Nigutova K, Morovsky M, Pristas P, Teather RM, Holo H et Javorsky P.** (2007). Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram⁺ cocci. *J. Appl. Microbiol.*, **102**(2): 563-569.
- **Nilsen T, Nes IF et Holo H.** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003; **69**(5): 2975-2984.

- **Nzelof N.** Technique microscopique. Ed Flammarion Medecine Sciences, 1972; p: 1-3-35-70.
- **Oelschlaeger TA.** Mechanisms of probiotic actions—a review. *Int J Med Microbiol*, 2010; **300** (1): 57–62.
- **Ogier JC, Serror P.** Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus. *Int J Food Microbiol*, 2008; **126**: 291-301.
- **Ogunbanwo ST, Sanni AI et Onilude AA.** Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *Afr J Biotechnol*, 2003; **2** (8): 219-227.
- **O'Sullivan L, O'Connor EB, Ross RP et Hill C.** Evaluation of live-culture-producing lacticin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *J Appl Microbiol.*, 2006; **100**: 135-143.
- **Ouwehand AC, Tuomola EM, Tölkö S et Salminen S.** Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *Int J Food Microbiol.*, 2001; **64**: 119-126.
- **Özdemir Ö.** Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data. Istanbul: *Clin Exp Immunol*, 2010; **160**(3): 295–304.
- **Pailin T, Kang D, Schmidt K et Fung D.** Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Lett.Appl.Microbiol.*, 2001; **33**: 45-49.
- **Papagianni M.** Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv.*, 2003; **21**(6), 465-499.
- **Papamanoli EN, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E et Kotzekidou P.** Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.*, 2003; **65**: 859-867.
- **Parente E, Ricciardi A et Addario G.** Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl.Microbiol. Biotechnol.*, 1994; **41**(4): 388-394.
- **Payne JF, Morris AEJ, Peers P.** Evolution of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium sp* in milk. *J appl Microbiol*, 1999; **86**: 353-358.

- **Pereira CI, Barreto Crespo MT et San Romao MV.** Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *Int J Food Microbiol*, 2001; **8**: 211–216.
- **Pereira de Souza AH, Nobre Costa GA, da Silva Miglioranza LH, Furlaneto-Maia L et Flavia de Oliveira A.** Microbiological, physical, chemical and sensory characteristics of milk fermented with *Lactobacillus plantarum*. *Acta Scientiarum. Health Sci.*, 2013; **35**(1):125–131.
- **Pérez-Machado MA, Ashwood P, Thomson MA, Latcham F, Sim R, Walker-Smith JA et Murch SH.** Reduced transforming growth factor-beta1-producing T cells in the duodenal mucosa of children with food allergy. *Eur J Immunol*, 2003; **33**: 2307–15.
- **Pinto AL, Fernandes M, Pinto C, Albano H, Castilho F, Teixeira P et Gibbs PA.** Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *Int J Food Microbiol*, 2009; **129** (1): 50-58.
- **Plé C, Breton J, Daniel C et Foligné B.** Maintaining gut ecosystems for health: Are transitory food bugs stowaways or part of the crew?. *Int J Food Microbiol.*, 2015; 21. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.015.
- **Qin BY, Bewley MC, Creamer LK, Baker EN et Jameson GB.** Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine β -lactoglobulin. *Protein Sci.*, 1999; **8**: 75-83.
- **Quigley EM.** The efficacy of probiotics in IBS. *J Clin Gastroenterol*, 2008; **42** (2): S85-90.
- **Rancé F et Bidat E.** Allergie alimentaire chez l'enfant. Paris/Genève : Médecine & Enfance/Médecine & Hygiène, 2000. 210 p.
- **Randazzo CL, Caggia C et Neviani E** Application of molecular approaches of study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J Microbiol Methods*, 2009; **78**: 1-9.
- **Rantanen T et Palva A.** Lactobacilli carry cryptic genes encoding peptidase-related proteins: characterization of a prolidase gene (pepQ) and a related cryptic gene (orfZ) from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *Microbiol.*, 1997; **143** (12) : 3899-3905.
- **Rao AV, Bested AC, Beaulne TM, Katzman MA, Iorio C, Berardi JM, Logan AC.** A randomized, double blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathol*, 2009; **19**: 1–6.

- **Rautava S, Kirjavainen P et Salminen S.** Role of probiotics in food hypersensitivity. *Curr. Opin. Allergy Clin Immunol*, 2002; **2**: 263-271.
- **Reddy IM, Kella NKD et Kinsella JE.** Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *J Agric. Food Chem.*, 1988; **36**: 737-741.
- **Rich RL, Kreikemeyer B, Owens RT, LaBrenz S, Narayana SVL, Weinstocki GM, Murray BE, Höök M.** Ace Is a Collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.*, 1999; **274** (38): 26939–26945.
- **Richard C1, Cañon R, Naghmouchi K, Bertrand D, Prévost H et Drider D.** Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.*, 2006; **23**(2): 175-183.
- **Roberfroid MB.** Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. Université Catholique de Louvain, Department of Pharmaceutical Sciences, Brussels, Belgium. *British J. Nutr*, 1998; **80** (4): S197–S202.
- **Rosenfeldt V, Benfeldt E, Valerius NH, Paerregaard A et Michaelsen KF.** Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *J Pediatr*, 2004; **145** (5):612-6.
- **Roudj S, Bessadat A et Karam NE.** Caractérisations physicochimiques et analyse électrophorétique des protéines de lait de chèvre et de lait de vache de l'Ouest algérien. *Renc. Rech. Rum.*, 2005 ; 12.
- **Rouissat L et Bensoltane A.** Physico-chemical, microbiological a biotechnological studies of lactic a flora isolated from ewe's milk of Algerian two breeds (Ouled djellal and El hamra). *J Appl Sci*, 2006; **21** (2B): 557-582.
- **Rul F et Monnet, V.** Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *J Appl Microbiol.*, 1997; **82** (6): 695-704.
- **Rul F, Monnet V et Gripon JC.** Purification and characterization of a general aminopeptidase (St-PepN) from *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* CNRZ 302. *J Dairy Sci.*, 1994; **77** (10): 2880-2889.
- **Saïdi D, Heyman M, Kheroua O, Boudraa G, Bylsma P, Kerroucha R, Chekroun A, Maragi JA, Touhami M et Desjeux JF.** Jejunal response to beta-lactoglobulin in infants with cow's milk allergy. *CR Acad Sci III*, 1995; **318**: 683-690.

- **Saïdi D, Khéroua O, Boudraa G, Touhami M, Kerroucha R, Chekroun A, Heyman M et Desjeux J-F.** L'intolérance aux protéines du lait de vache chez le nourrisson: Etude de la fonction intestinale. In: Alimentation, génétique et santé de l'enfant. Mahmoud Touhami et Jehan-François Desjeux éditeurs. L'Harmattan, Paris; 1994: pp. 149-154.
- **Sartor RB.** Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract.*, 2006; **3**: 390-407.
- **Savijoki K, Ingmer H et Varmanen P.** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006; **71**: 394-406.
- **Sawa N, Koga S, Okamura K, Ishibashi N, Zendo T, Sonomoto K.** Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* D98. *J Appl. Microbiol.*, 2013; doi:10.1111/jam.12226.
- **Sawyer L et Kontopidis G.** The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2000; **1482**: 136-148.
- **Saxelin M, Pessi T et Salminen S.** Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatin capsules to healthy volunteers. *Int J Food Microbiol.*, 1995; **25**: 199-203.
- **Schade RP, Van Ieperen-Van Dijk AG, Van Reijssen FC.** Differences in specific T-cell responses between infants with atopic dermatitis with and without cow's milk allergy: relevance of TH2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, 2000; **106**:1155–62.
- **Schillinger U et Lucke F.** Antimicrobial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, **55** : 1901-1906.
- **Schmidt DG, Meijer RJGM, Slangen CJ et van Beresteijn ECH.** Raising the pH of the pepsin-catalysed hydrolysis of bovine whey proteins increases the antigenicity of the hydrolysates. *Clin Exp Allergy*, 1995; **25**: 1007-1017.
- **Schrezenmeir J et de Vrese M.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001; **73**: 361S-364S.
- **Schriffin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM et Donnet-Hugues A.** Immunomodulation of human blood cells following ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*, 1995; **78**: 491-497.
- **Servin AL.** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*, 2004; **28**: 405-440.

- **Shida K, Makino K, Morishita A, Takamizawa K, Hachimura S, Ametani A, Sato T, Kumagai Y, Habu S et Kaminogawa S.** *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1998; **115**: 278-87.
- **Shu Q, Lin H, Rutherford KJ, Fenwick SG, Prasad J, Gopal PK et Gill HS.** Dietary Bifidobacterium lactis (HN019) enhances resistance to oral Salmonella typhimurium infection in mice. *Microbiol. Immunol*, 2000; **44**: 213-222.
- **Silva LF, Casella T, Gomes ES, Nogueira MC, De Dea Lindner J et Penna AL.** Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *J Food Sci.*, 2015; **80**(2): M411-7.
- **Singh KV, Coque TM, Weinstock GM et Murray BE.** In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* efaA mutant and use of efaA homologs for species identification. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1998; **21**: 323-331.
- **Stadhouders J.** The control of cheese starter activity. *Neth Milk Dairy J*, 1986; **40**: 155-173.
- **Strid J, Hourihane J, Kimber I, Callard R et Strobel S.** Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. *Clin Exp Allergy*, 2005; **35**: 757-66.
- **Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR et Belkaid Y.** Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med*, 2007; **204**(8):1775-85.
- **Temmerman R, Pot B, Huys G et Swings J.** Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol.*, 2003; **81**: 1-10.
- **Thang CL, Baurhoo B, Boye JI, Simpson BK, Zhao X.** Effects of Lactobacillus rhamnosus GG supplementation on cow's milk allergy in a mouse model. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2011; **7**:20.
- **Thomas T.** Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the other bacteria. *J Dairy Sci Technol*, 1973; **8**: 70-71.
- **Tomita H, Fujimoto S, Tanimoto K et Ike Y.** Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *J Bacteriol.*, 1997; **179** (24): 7843-55.

- **Torgerson TR, Linane A, Moes N, Anover S, Mateo V, Rieux-Laucat F, Hermine O, Vijay S, Gambineri E, Cerf-Bensussan N, Fischer A, Ochs HD, Goul et O, Ruemmele FM.** Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the FOXP3 gene. *Gastroenterol*, 2007; **132**:1705–17.
- **Tredez MLH.** Méta-analyse des effets protecteurs des probiotiques sur la cancérogenèse colorectale chez les rongeurs. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 2008, p38-39.
- **Troncone R, Caputo N, Florio G et Finelli E.** Increased intestinal sugar permeability after challenge in children. with cow's milk allergy or intolerance. *Allergy*, 1994; **49**:142-6.
- **Tsakalidou E, Anastasiou R, Papadimitriou K, Manolopoulou E et Kalantzopoulos G.** Purification and characterisation of an intracellular X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4. *J Biotechnol.*, 1997; **59** (3) : 203-211.
- **Turck D.** Allaitement maternel : les bénéfices pour la santé de l'enfant et de sa mère. *Arch. pédiatrie*, 2005; **12**: S145–S165.
- **Turpin W, Humblot C, Thomas M et Guyot JP.** Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *Int J Food Microbiol*, 2010; **143**: 87-102.
- **Twomey D, Ryan M, Meaney B et Hill C.** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002; **82**, 165-185.
- **Ussing HH, Zerahn K.** Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuit isolated frog skin. *Acta Physiol Scand*, 1951; **25**:110-127.
- **Van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD et Maguin E** Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002; **82**: 187-216.
- **Van de Guchte M, Penaud S, Grimaldi C, Barbe V, Bryson K, Nicolas P, Robert C, Oztas S, Mangenot S, Couloux A, Loux V, Dervyn R, Bossy R, Bolotin A, Batto J-M, Walunas T, Gibrat J-F, Bessières P, Weissenbach J, Ehrlich SD et Maguin E.** The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006; **103** (24): 9274-9279.

- **Vankerckhoven, V., van Outgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D. and Goossens, H.** Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*, 2004; **42**: 4473-4479.
- **Verdú EF, Bercík P, Bergonzelli GE, Huang XX, Blennerhasset P, Rochat F, Fiaux M, Mansourian R, Corthésy-Theulaz I, Collins SM.** Lactobacillus paracasei normalizes muscle hypercontractility in a murine model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterol*, 2004; **127**: 826-837
- **Verdú EF, Bercik P, Verma-Gandhu M, Huang XX, Blennerhasset P, Jackson W, Mao Y, Wang L, Rochat F et Collins SM.** Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut*, 2006; **55**: 182-190.
- **Verheul M, Pedersen JS, Roefs SPF et de Kruif KG.** Association Behavior of Native β -Lactoglobulin. *Biopolymers*, 1999; **49**: 11-20.
- **Vernazza CL, Gibson GR et Rastall RA.** Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of Bifidobacterium. *J Appl. Microbiol*, 2006; **100**(4): 846-853.
- **Von Berg A, Koletzko S, Grübl A, Filipiak-Pittroff B, Wichmann H, Bauer CP, Reinhardt D et Berdel D.** German Infant Nutritional-Intervention Study Group. The effect of hydrolyzed cow's milk formula for allergy prevention in the first year of life: The German Infant Nutritional Intervention Study, a randomized double-blind trial. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; **111**:533-40.
- **Wal JM.** Allergénicité des protéines laitières. *Innovations Agronomiques*, 2011; **13**: 25-43 .
- **Wal JM.** Structure and function of milk allergens. *Allergy*, 2001; **56**: 35-8.
- **Weisburg W, Barns S, Pelletier D et Lane D.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J.Bacteriol.*, 1991; **173**: 697-703.
- **West CE, Jenmalm MC et Prescott SL.** The gut microbiota and its role in the development of allergic disease: a wider perspective. *Clin Exp Allergy*, 2015; **45** (1):43-53.
- **WHO.** Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*, 1998; **351**: 1225-1232.

- **Wilhelm H Holzapfel, Petra Haberer, Rolf Geisen, Johanna Björkroth et Ulrich Schillinger.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr*, 2001;**73**: 365S–73S.
- **Witt- Deguillaume C.** Le mécanisme de l'allergie alimentaire vraie. *Le moniteur des pharmacies*, 2008; **2** (2722): p. 4.
- **Wohlrab Y et Bockelmann W.** Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Int Dairy J.*, 1992; **2**: 345-361.
- **Wohlrab Y et Bockelmann W.** Purification and characterization of a new aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B.14. *Int Dairy J.*, 1994; **4**: 409- 427.
- **Yamamoto Y, Togawa Y, Shimoska M et Okazaki M.** Purification and characterization of novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**: 5746-5753
- **Yamashita H, Tomita H, Inoue T et Ike Y** Genetic organization and mode of action of a novel bacteriocin, bacteriocin 51: determinant of VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011; **55**(9): 4352-60.
- **Yu Z, Huang Z, Shao C, Huang Y, Zhang F, Yang J, Deng L, Zeng Z, Deng Q et Zeng W.** Oral administration of interferon- γ -transformed *Bifidobacterium longum* protects BALB/c mice against coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Virology*, 2011; **8**: 525.
- **Vandenplas Y, Brueton M, Dupont C, Hill D, Isolauri E, Koletzko S, Oranje AP et Staiano A.** Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child.*, 2007; **92**(10): 902-8.
- **Zarour K, Benmechernene Z, Hadadji M, Moussa-Boudjemaa B, Henni JE et Kihal M.** Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. *Nat Technol*, 2013; 39 – 47.
- **Zatorski H et Fichna J** What is the future of the gut microbiota-related treatment? Toward modulation of microbiota in preventive and therapeutic medicine. *Front. Med.*, 2014; **1**:19. doi: 10.3389/fmed.2014.00019.
- **Zsila F.** A new ligand for an old lipocalin: Induced circular dichroism spectra reveal binding of bilirubin to bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 2003; **539**: 85-90.
- **Zsila F, Bikadi Z et Simonyi M.** Retinoic acid binding properties of the lipocalin member β -lactoglobulin studied by circular dichroism, electronic absorption

spectroscopy and molecular modeling methods. *Biochem. Pharmacol.*, 2002; **64** : 1651-1660.

Publications
Et
Communications

Publications internationales

1. H. Gourine, **W. Dib**, H. Grar, B. Benakriche, D. Saidi, O. Kheroua. Gut mucosa and reduces overgrowth of bacteria in experimental protein malnutrition. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 2015; 7(5): 96- 100.
2. **W. Dib**, A. Chekroun, S. El-Ghaish, Y. Choiset, J-M Chobert, T. Haertlé, D. Saidi, O. Kheroua. Effects of orally administered *Enterococcus faecium* on the immune systemic response and intestinal epithelial structure in balb/c mice immunized by bovine β -lactoglobulin *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 2014; 6(7): 587 -590.
3. **W.Dib**, V. Biscola, Y. Choiset, J-M. Chobert, T. Haertlé, A. Chekroun, D. Saidi, O. Kheroua. Characterization of a new isolate of *Lactobacillus brevis* WD19 from Algerian goat milk with proteolytic activity. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*;2014, 3(12): 423-432
4. **W. Dib**, V. Biscola, H. Gourine, H. Grar, Y. Choiset, J-M. Chobert, T. Haertlé, A. Chekroun, D. Saidi, O. Kheroua. Protecting effect of *Enterococcus faecium* on intestinal epithelial structure in Balb/c mice immunized via intra-peritoneal way by β -lactoglobulin. *Front. Immunol.* 2014.

Proceeding

1. **W. Dib**, V. Biscola, H. Grar, S. Zouaoui, H. Gourine, Y. Choiset, J-M Chobert, T. Haertlé, D. Saidi, O. Kheroua. Effet protecteur de bactérie lactique sur la structure épithéliale intestinale de la souris Balb/c immunisée par voie intra-péritonéale à la β -lactoglobuline. *Revue Française d'Allergologie*; 2013, 53: 383-386.
2. **W. Dib**, M. Rouane, H. Gourine, H. Grar, V. Biscola, S.F. Zouaoui, Y. Choiset, J-M Chobert, T. Haertlé, A. Chekroun, D. Saidi, O. Kheroua Effet immunomodulateur d'*Enterococcus* sur la réponse allergénique à la beta-lactoglobuline chez la souris Balb/c. *Revue Française d'Allergologie*; 2014, 54 : 276-277.
3. S.F. Zouaoui, **W. Dib**, M. Guendouz, A. Chekroun, O. Kheroua, D. Saidi. Effet protecteur de *Streptococcus thermophilus* et *Bifidobacterium longum* sur la muqueuse intestinale de souris Balb/c sensibilisées au lait de vache. *Revue Française d'Allergologie*; 2014, 54 : 276-277
4. H.Grar, B.H.F. Taleb, I. Senouci, H.Gourine, **W. Dib**, O. Kheroua, D.Saidi. Impact de la supplémentation en β -carotène sur la réponse systémique des souris Balb/c. *Revue Française d'Allergologie*; 2014, 54 : 249-251.
5. **W. Dib**, H. Grar, H. Gourine, V. Biscola, S.F. Zouaoui, Y. Choiset, J.M. Chobert, T. Haertlé, A. Chekroun, D. Saidi, O. Kheroua. *Lactobacillus plantarum* et modulation de la réponse immunitaire. *Revue Française d'Allergologie*, 2015 ; 55 : 265
6. H. Grar, **W. Dib**, H. Gourine, S. Bekkaddour Benattia, O. Kheroua, D. Saidi. Effet d'une supplémentation en β -carotène sur la réponse immune intestinale des souris

Balb/c sensibilisées à la β -lactoglobuline. Revue Française d'Allergologie, 2015; 55: 229

7. H. Grar, S. Bekkaddour Benattia, H. Gourine, **W. Dib**, O. Kheroua, D. Saidi. Impact de la supplémentation en vitamine E sur la réponse immune des souris Balb/c. Revue Française d'Allergologie, 2015; 55 :239.

Communication internationale

1. **W. Dib**, A. Chekroun, D. Saïdi, O. Kheroua. Caractérisation de l'activité protéolytique des bactéries lactiques et des bifidobactéries dans le lait de vache. Colloque International sur « Bio tech World » novembre 2007, Oran, Algérie.
2. **W. Dib**, A. Chekroun, D. Saïdi, O. Kheroua. Effet immunomodulateur de *Lactobacillus plantarum* chez la souris Balb/c immunisée par voie parentérale à la β -lactoglobuline. 2^{ème} Congrès International de Nutrition de Tunisie (CINTUN, 2008), 17-18 octobre 2008.
3. **W. Dib**, S. El-Gaish, H. Gourine, H. Grar, K.E. El Mecherfi, H. Negaoui, S. Belalia, Y. Choiset, H. Rabesona, J-M. Chobert, T. Haertlé, A. Chekroun, D. Saidi, O. Kheroua. Etude de l'activité protéolytique des bactéries sur les protéines du lait de vache. Congrès International de Nutrition, 22-23 mai 2011, Oran, Algérie.
4. H. Gourine, S. Boudali, B. Benakriche, **W. Dib**, H. Grar, D. Saidi, O. Kheroua. Effet du symbiotique sur la croissance pondérale et la muqueuse intestinale. Congrès International de Nutrition, 22-23 mai 2011, Oran, Algérie.
5. H. Grar, H. Kaddouri, H. Gourine, D. Redouane, **W. Dib**, O. Kheroua, D. Saidi. L'irradiation aux microondes a différents pH diminue l'antigénicité de β - lactoglobuline. Congrès International de Nutrition, 22-23 mai 2011, Oran, Algérie.
6. **W. Dib**, S. El-Ghaish, Y. Choiset, H. Rabesona, J-M Chobert, T. Haertlé, A. Chekroun, D. Saidi, O. Kheroua. Recherche de l'activité protéolytique chez des bactéries isolées du lait de chèvre. 3^{ème} Colloque International de Biotechnologies Microbiennes, 15-17 Mars 2012, Tanger, Maroc
7. H.F. Tbahriti, **W. Dib**, S. Boudali, A. Chekroun, D. Saidi, O. Kheroua. Caractérisation microbiologique, biochimique et antigénique du lait de vache fermenté à 45°C par *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. 3^{ème} Colloque International de Biotechnologies Microbiennes, 15-17 Mars 2012, Tanger, Maroc.
8. **W. Dib**, A. Chekroun, D. Saidi, O. Kheroua. Etude des propriétés biotechnologiques de deux laits fermentés par des bactéries lactiques. 18^{ème} Colloque du Club des Bactéries Lactiques, 22-24 Mai 2012, Clermond Ferrand, France
9. **W. Dib**, V. Biscola, S.F. Zouaoui, H. Grar, H. Gourine, Y. Choiset, J-M. Chobert, T. Haertlé, A. Chekroun, D. Saidi, O. Kheroua. Protection effect of lactic acid bacteria

on intestinal epithelial structure in Balb/c mice immunized via intra-peritoneal way by the β -lactoglobulin. First International Conference "Microbial Diversity: Challenges and Applications" November 1st-3rd, 2013, Tej Soltane Hotel, Hammamet, Tunisia

10. **W. Dib**, V. Biscola, H. Gourine, H. Grar, S.F. Zouaoui, Y. Choiset, J-M. Chobert, Haertlé, A. Chekroun, D. Saïdi, O. Kheroua. Etude du profilé protéolytique et analyse physico-chimique du lait de vache fermenté par *Lactobacillus brevis* WD19 Séminaire International sur les Sciences Alimentaires, 14-16 octobre 2014 Université Constantine1, Constantine, Algérie
11. S.F. Zouaoui, **W. Dib**, M. Guendouz, A. Mehidi, A. Chekroun, O. Kheroua, D. Saïdi. Etude de l'activité protéolytique *Streptococcus thermophilus* et *Bifidobacterium longum* sur les protéines du lait de vache. Séminaire International sur les Sciences Alimentaires, 14-16 octobre 2014, Université Constantine1, Constantine, Algérie
12. S.F. Zouaoui, **W. Dib**, A. Mehidi, A. Chekroun, O. Kheroua, D. Saïdi. Protective effect of *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium longum* on the intestinal mucosa of mice (BALB/c) sensitized to cow's milk. The first international congress of immunology and molecular immunopathology, 17-20 octobre 2014 University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria.
13. H. Grar, H. Makkeb, H. Gourine, **W. Dib**, W. Rached, O. Kheroua, D. Saïdi . Impact of gastric intubation with β -carotene on immunoglobulin IgG titers in sensitized BALB/c mice .The first international congress of immunology and molecular immunopathology, 17-20 octobre 2014 University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria.

Communication nationale :

1. A. Chekroun, A. Bensoltane, **W. Dib**, D. Saïdi, O. Kheroua. Valorisation diététique de lait de vache fermenté à 45°C par *Lactobacillus acidophilus* associé à des bifidobactéries. Journées Scientifiques de Nutrition et Technologie Alimentaire, Constantine le 12 et 13 décembre 2006.
2. **W. Dib**, A. Chekroun, D. Saïdi, O. Kheroua. Effet probiotique de bactéries lactiques sur la réponse immune systémique et sur la structure épithéliale intestinale de souris Balb/c immunisées par voie parentérale à la β -lactoglobuline. Séminaire « filière lait en Algérie : Production, Technologie et commercialisation » 11 - 12 Décembre 2007, Université Hassiba Benbouali, Chlef.