

## EFFET ANTI-LISTERIA DE *BIFIDOBACTERIUM INFANTIS* ISOLÉ A PARTIR DE SELLES DE NOURRISSON ALLAITÉ AU SEIN

Reçu le 02/10/2007 – Accepté le 04/05/2010

### Résumé

Une souche de *Bifidobacterium infantis* a été isolée à partir de selles de nourrisson âgé de deux mois allaité exclusivement au sein de l'hôpital Ben Boulaid de Blida. Cette souche est douée d'une activité antimicrobienne à l'égard de *Listeria monocytogenes*. Une purification partielle de la bactériocine a été effectuée d'abord par précipitation des protéines au sulfate d'ammonium puis par un passage du surnageant brut actif en chromatographie à échangeur de cations avec une élution de la bactériocine par paliers à 0,1, 0,3 et 1M en NaCl. À ce stade de purification l'activité antimicrobienne a été observée dans la fraction éluée à 0,1M en NaCl. Puis par un passage de la fraction active précédente en chromatographie en phase inversée. La bactériocine a été soumise à l'action de plusieurs enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine, pronase et protéinase K). Ces dernières altèrent complètement l'activité antagoniste de la bactériocine. L'effet du traitement thermique a montré que cette substance reste stable pendant 30 min de 70°C. jusqu'à 90°C. L'activité inhibitrice de la bactériocine reste stable dans des variations du pH acide et neutre. Par contre elle décroît dans des conditions de pH basique. L'effet anti-*Listeria* de *Bifidobacterium infantis* a montré après 6 jours de conservation que le taux de décroissance de la souche cible est de 97,05 % à 15°C. Ce taux est plus important (99,50 %) lorsque l'espèce cible est conservée à 4°C.

**Mots clés:** Bactériocine, *Bifidobacterium infantis*, Effet anti-*Listeria*.

### Abstract

Effect against-*Listeria* of *Bifidobacterium infantis* isolated from the saddles from infant nursed in sein

A strain of *Bifidobacterium infantis* was isolated starting from the saddles from infant nursed exclusively with the two months old centre from the hospital from Ben Boulaid (Blida). It produces a bacteriocin, which is active against *Listeria monocytogenes*. A purification partial of the bacteriocine was carried out initially by precipitation of proteins with the sulphate of ammonia then by a passage of the supernatant active in cation exchange chromatography with an elution of the bacteriocin by stages with 0.1, 0.3 and 1M of NaCl. The bacteriocin activity is found in the fractions eluted with 0.1 M NaCl after chromatography of the active fraction on reversed phase column. It is sensitive to proteolytic enzymes (pepsin, trypsin, pronase and proteinase K). The effect of proteolytic enzymes on the inhibitory activity indicates that the active component secreted is of proteinaceous nature. It is stable to heat treatments (70°C and 90°C., 30 min). The inhibiting activity of the bacteriocin remains stable in variations of the acid and neutral pH. On the other hand it decreases under conditions of basic pH. The anti-*Listeria* effect of *Bifidobacterium infantis* showed after 6 days of conservation that the rate of decrease of the target stock is 97.05 % with 15°C. This rate is more important (99.50 %) when the target species is preserved at 4°C.

**Keywords:** Bacteriocin, *Bifidobacterium infantis*, Effect anti-*Listeria*.

A. DOUMANDJI<sup>1</sup>  
N. BOUSBIA<sup>1</sup>  
A. HELLAL<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Université Saâd DAHLAB, Faculté des sciences Agro-vétérinaires, Département des sciences agronomiques, route de Soumaâ, BP 270 - 9000 Blida. Algérie.

<sup>2</sup> Ecole Nationale Polytechnique, laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement, 16 rue des frères Ouadek, Hassen Badi 16200 Alger. Algérie

ملخص

*Bifidobacterium infantis*

*Bifidobacterium infantis*

*Listeria monocytogenes*

NaCl / 1 0,3 0,1  
NaCl / 0,1

( )

*Bifidobacterium*

°15 % 97,5

6

(pH)  
*infantis*

°4

% 99,5

*Listeria*

*Bifidobacterium infantis*

: \_\_\_\_\_

La fabrication d'un fromage tient d'une alchimie très particulière et très complexe qui, à partir d'un matériau de base, le lait, assure la transformation des produits que nous goûtons tant. Cette transformation ne peut se faire qu'à l'aide d'enzymes dont un certain nombre provient de bactéries qui modifient les composants du lait. Ces bactéries, souvent, disparaissent au cours des différentes phases de l'élaboration d'un fromage mais peuvent, dans certains cas particuliers, persister et entraîner des risques sanitaires. Ceci est par exemple le cas de *Listeria monocytogene* qui est une bactérie que l'on retrouve dans le sol, l'eau, les végétaux et l'environnement des ateliers de production alimentaire. Elle peut également être présente dans le tractus intestinal des animaux et de l'homme. *Listeria monocytogenes* est recherchée dans le cadre des analyses obligatoires pour l'autocontrôle car elle peut être à l'origine d'intoxications alimentaires graves. Les cas sporadiques et les épidémies sont associés à une large gamme de produits peu ou très élaborés. Les produits transformés prêts à être consommés parmi lesquels se retrouvent les fromages au lait cru sont particulièrement concernés. La listériose, infection grave d'origine alimentaire liée à la consommation d'aliments contaminés, représente un réel risque sanitaire étant donné le taux élevé de mortalité (30 %) parmi les personnes infectées [1; 2; 3].

C'est ainsi que les industriels, qui fabriquent des fromages au lait cru, maîtrisent de mieux en mieux la qualité bactériologique de leur production. Ceci par des actions auprès des producteurs de lait (sélection des producteurs, formation, assistance, incitation financière).

On peut être rassuré sur la qualité sanitaire des fromages au lait cru. Les cas de contaminations dues à des surinfections ultérieures sont rares ou peuvent survenir dans des ateliers qui se soustraient aux règles de contrôle.

Les bifidobactéries, à l'opposé des cultures lactiques traditionnelles, sont reconnues pour être des organismes difficiles à cultiver dans le lait. Ces bactéries ont des exigences nutritionnelles particulières. Certains composés ont la particularité d'atteindre le gros intestin sans être assimilés par l'organisme-hôte, pour être de préférence métabolisés par les bifidobactéries. Ce sont les facteurs bifidogènes [4]. Les bifidobactéries représentent un effet antagoniste vis-à-vis des germes pathogènes tel que *Listeria monocytogenes*. L'effet anti-*Listeria* de *Bifidobacterium infantis* est très intéressant à exploiter dans le domaine des industries agro-alimentaires telles que la fabrication de fromage à partir d'un lait cru. L'utilisation de bactériocines est un moyen pour préserver les produits alimentaires à l'égard de cette contamination. La première étape de notre étude consiste à purifier une bactériocine issu d'une souche de *Bifidobacterium infantis* isolé localement à partir des selles d'un nourrisson allaité exclusivement au sein. La deuxième partie concerne la caractérisation du composé actif. La dernière partie porte sur l'étude de l'activité antimicrobienne du composé actif issue de *Bf. infantis*

envers *Listeria monocytogenes* dans des conditions de stockage à 15°C. et à 4°C pendant 21 jours.

## MATERIELS ET METHODES

### Mise au point de l'activité antimicrobienne

400 mL de MRS cystéiné sont inoculées à raison de 10% avec *Bifidobacterium infantis* puis étuvées à 37°C. pendant 18 h avec une agitation de 150 rpm. Une centrifugation est réalisée à 10000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant et le culot sont récupérés stérilement pour la recherche de la substance inhibitrice. Le pH du surnageant est ajusté à une valeur de 6,5 puis filtré à travers des membranes de 0,45 µm, tandis que le culot est lavé deux fois avec de l'eau distillée, séché puis additionné au méthanol avec un rapport de volume <sup>2</sup>/<sub>3</sub>. Le mélange est centrifugé à 10000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant obtenu est appelé extrait cellulaire.

L'activité antimicrobienne du surnageant brut actif ainsi que celle de l'extrait cellulaire sont testées selon la méthode de diffusion des puits [5]. La souche cible utilisée est *Listeria monocytogenes*. La gélose Trypticase soya broth enrichie avec de l'extrait de levure à raison de 0,6 % (TSBYE) estensemencée à raison de 1 % avec la souche cible. 20 mL de cette gélose sont coulés dans des boîtes de Pétri. Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement sur cette surface et seront remplis avec 100 µL du surnageant de culture ou d'extrait cellulaire. Ces boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C./4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne. Les cultures seront mises dans des conditions optimales de croissance. La lecture se fait par la mesure du diamètre en mm des zones d'inhibition formées autour des puits. On dit qu'une inhibition est positive si le diamètre est supérieur à 2 mm [6].

### Action des protéases, du pH et du traitement thermique sur la bactériocine

L'activité de la bactériocine a été étudiée après traitement du surnageant brut actif par la catalase, par différentes protéases, à différentes valeurs de pH (de 3 à 10) ou après un traitement thermique. Les effets de quatre enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine, pronase et protéinase K) et la catalase (Sigma®, Etats-Unis) ont été examinés sur l'activité inhibitrice.

Toutes les enzymes ont été dissoutes dans la solution tampon de phosphate du potassium 3 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,5), excepté la pepsine (pH 3). Elles ont été ajoutées au surnageant à une concentration finale de 0,5 mg. mL<sup>-1</sup>. Après incubation à 37°C pendant 1h 30 min, l'activité inhibitrice a été testée. L'effet de la catalase a été mesuré en ajoutant de la catalase à une concentration finale 5 mg. mL<sup>-1</sup>, la catalase a été dissoute dans une solution tampon phosphate de potassium 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7) puis incubée à 25°C pendant 2 heures. L'effet du traitement thermique a été examiné en chauffant le surnageant brut actif durant 30 minutes à 70°C., 80°C et 90°C, ainsi que pendant 15, 30 et 45 minutes à 100°C et durant 30 minutes à 121°C.

Des aliquotes du surnageant ont été ajustées aux différentes valeurs du pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10) avec HCl 1N ou 1 NaOH 1N avant d'examiner l'activité inhibitrice.

## Purification partielle de la bactériocine

### Préparation de la culture

Une colonie de *Bifidobacterium infantis* est reprise dans 1 mL de bouillon MRS cystéiné puis étuvé à 37°C /24h. Un deuxième repiquage est réalisé. 1 mL de la précédente culture est repris dans 10 mL de bouillon MRS cystéiné et étuvé à 37°C pendant 24h. Une grande culture est ensuite lancée. 400 mL de bouillon MRS cystéiné sont repiqués à raison de 10 % avec la culture précédente puis étuvés à 37°C pendant 18h. Une centrifugation réfrigérée est réalisée à 10000 g pendant 30 min. Les surnageant récupérés sont filtrés sur de l'acétate de cellulose à 0,45 µm [7].

### Précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium

La précipitation des protéines du filtrat obtenu se fait en présence de 400g /L de sulfate d'ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pendant une nuit. Le précipité est récupéré par centrifugation à 10000 g pendant 1 h, puis solubilisé dans 250 mL d'un tampon de sulfate d'ammonium à 40 %, 60 % et 80 %.

### Purification par passage sur un échangeur de cations

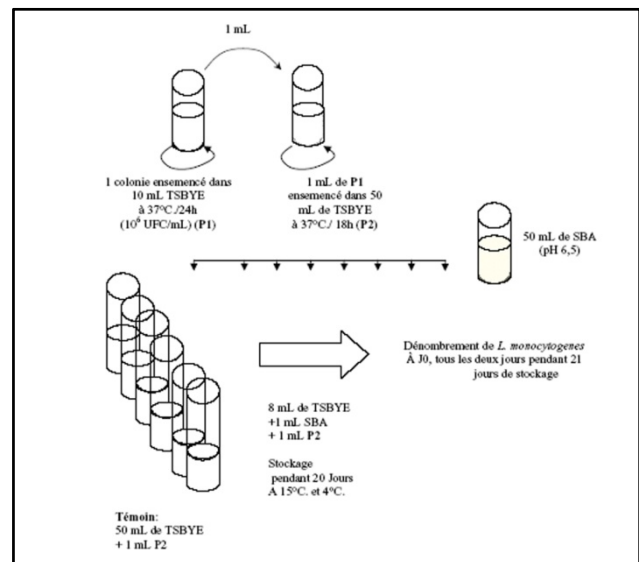
Le surnageant brut actif est passé avec un débit rapide (5 mL/min) sur une colonne à échangeur de cations (S-Sépharose, Sigma®), type de gel: Stream Line sulfopropyl (SF), dont les dimensions de la colonne (L x D) sont 20 x 2,5 cm avec un volume de 20 mL. Deux tampons sont utilisés, tampon A (acétate de sodium 50 mM, pH 4) et le tampon B (acétate de sodium 50 mM + NaCl 1M, pH 4). La colonne est d'abord équilibrée avec le tampon A. Le SBA est passé avec un débit de 10 mL/min à travers cette colonne. Les fractions douées d'une activité inhibitrice seront éluées par une solution de chlorure de sodium à 0,1 M, 0,3 M et 1 M. L'éluât obtenu est appelé fraction I.

### Purification par passage sur une phase stationnaire inversée

La fraction I est purifiée par un passage avec un débit de 4 mL /min sur une colonne en phase inversée. Le type de gel utilisé est de type poros R1 dont les dimensions de la colonne (L x D) sont 20 x 1,5 cm, avec un volume de 12 mL. Deux tampons sont utilisés, le tampon A (0,1 % d'acide trifluoroacétique TFA) et le tampon B (80 % d'acétonitrile + 0,09 % TFA). La colonne est d'abord équilibrée avec du tampon A. Les molécules de bactériocine sont éluées avec un gradient du tampon B pendant 30 min.

## Effet anti-*Listeria* du composé actif issu de *Bifidobacterium infantis* TCM03

La préparation de la souche cible est réalisée de la manière suivante. Une colonie bien isolée et bien distincte de *L. monocytogenes* est ensemencée dans 10 mL de trypticase soya broth additionné de 0,6 % d'extrait de levure (TSBYE) puis incubée à 37°C./24h (culture P1). Un mL de cette dernière culture servira à ensemencer 50 mL de bouillon TSBYE. La culture est soumise à un agitateur tournant à 190 rpm /min et étuvée à 37°C. /24h (culture P2). 50 mL du surnageant brut actif (SBA, pH 6,5) contenant le composé actif est filtré à travers une membrane de 0,22 µm. Le suivi de l'effet antagoniste du composé actif issu de *Bf. infantis* envers *L. monocytogenes* est réalisé à 15°C. et à 4°C. avant sa conservation (j0), tous les deux jours pendant 20 jours de stockage. La mise au point de l'effet anti-*Listeria* est réalisée en additionnant dans 8 mL de TSBYE, 1 mL de la culture P2 et 1mL de surnageant brut actif stérile. Un témoin est représenté par une culture de *L. monocytogenes* en l'absence du composé actif (1 mL de la culture P2 est ensemencé dans 9 mL de TSBYE (Fig. 1).

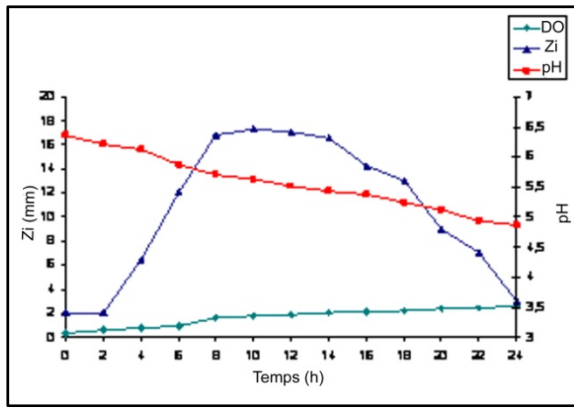


**Figure 1:** Mise au point de l'effet anti-*Listeria* de *Bifidobacterium infantis*

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Effet des enzymes protéolytiques, de la température et du pH sur l'activité antimicrobienne

La figure 2 représente la production de la bactériocine en fonction du temps à pH libre. D'après nos résultats, une optimisation de la croissance et de la production de la bactériocine est obtenue entre 10 h et 14 h de fermentation.



**Figure 2 :** Evolution de la croissance, du pH et de la production de bactériocine par *B. infantis* en fonction du temps. Zi: diamètre de la zone d'inhibition en mm.

Le composé actif a subi plusieurs traitements (tableau 1):

**Tableau 1:** Effet de la catalase, des enzymes protéolytiques, du traitement thermique et du pH sur l'activité de la bactériocine

Traitement	Activité de la bactériocine (UA . mL <sup>-1</sup> )
Sans traitement	6400
Catalase	6400
Enzymes protéolytiques	
Pepsine	0
Trypsine	0
Pronase	0
Proteinase K	0
Traitement thermique	
70°C., 30 min	6400
80°C., 30 min	6400
90°C., 30 min	6400
100°C., 15 min	3200
100°C., 30 min	1600
100°C., 45 min	800
121°C., 30 min	800
pH	
3	6400
4	6400
5	6400
6	6400
7	6400
8	3200
9	1600
10	800

- L'activité antimicrobienne est de 32000 UA.mL<sup>-1</sup> lorsque le composé actif ne subit aucun traitement (témoin). Le composé actif a été soumis à l'action de plusieurs enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine, pronase et

proteinase K). Ces dernières altèrent complètement l'activité antimicrobienne de la bactériocine.

- L'effet du traitement thermique a été examiné en traitant la bactériocine pendant 30 min aux différentes températures : 70°C., 80°C., 90°C., 100°C. et 121°C., à 100°C. pendant 15, 30 et 45 minutes. On constate que cette substance reste stable pendant 30 min de 70°C. jusqu'à 90°C. Elle est stable aussi pendant 15 min à 100°C. En effet l'activité antimicrobienne décroît rapidement lors d'un traitement de 30 min ou de 45 min à 100°C. et lors d'un traitement à 121°C. pendant 30 min.

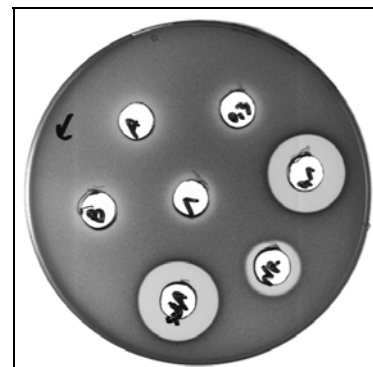
- La stabilité de la bactériocine a été étudiée à différentes valeurs de pH variant de 3 à 10. Ce traitement est effectué à température ambiante pendant 1h 30 min. Le pH du surnageant brut actif est ajusté à 6,5 afin d'effectuer le test de l'activité antimicrobienne avec la méthode de la diffusion des puits. Selon nos résultats, l'activité inhibitrice de la bactériocine n'est pas affectée par les variations du pH acide et neutre. Par contre, elle décroît dans des conditions de pH basique.

**Purification de la bactériocine**

Le surnageant brut actif ainsi obtenu subit plusieurs étapes de purification. La bactériocine produite par *Bf. infantis* a été purifiée de la manière suivante:

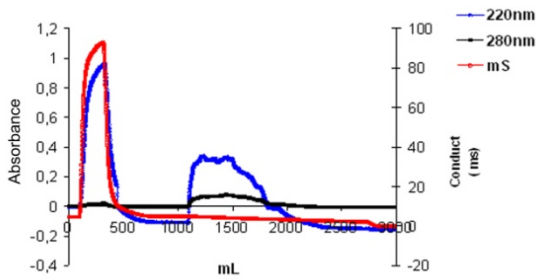
- Précipitation des protéines du surnageant brut actif avec du sulfate d'ammonium à 40 %, 60 % et 80 %. L'activité antimicrobienne a été observée après précipitation des protéines avec du sulfate d'ammonium à 80 %.

- Passage du surnageant brut actif en chromatographie échangeuse de cations avec une élution de la bactériocine par palier (0,1, 0,3 et 1 M en NaCl). À ce stade de purification l'activité antimicrobienne est observée dans la fraction éluée à 0,1 M en NaCl (Fig. 3).



**Figure 3:** Activité antimicrobienne de la fraction active issue de chromatographie à échangeurs de cations

- Passage de la fraction active précédente en chromatographie en phase inversée. A ce stade de purification la fraction active a été éluée entre 50 et 68 % d'acétonitrile (Fig.4).



**Figure 4 :** Chromatographie en phase réverse de la fraction 1M du SBA de *B. infantis*

La purification des bactériocines produites par les bactéries lactiques représente un vrai défi. Les problèmes rencontrés durant leur purification sont liés à la tendance de ces molécules à s'associer à d'autres molécules, à leur hydrophobicité et à leur instabilité à la variation de pH. Les bactériocines forment un groupe de substances très hétérogènes. De ce fait il est difficile d'établir un protocole de purification standard efficace pour tous les types de bactériocines [8].

Plusieurs auteurs utilisaient une combinaison de traitements acides et d'extractions aux solvants organiques suivies de précipitations en vue de purifier des bactériocines [9]. La précipitation au sulfate d'ammonium a été un moyen souvent utilisé lors de la purification des bactériocines. Cependant, ces dernières ne sont pas récupérées totalement par cette méthode [10; 11]. Il a été démontré que le sulfate d'ammonium dissocie les bactériocines en sous-unités actives et modifie la conformation de la molécule ce qui peut provoquer parfois une amplification anormale de l'activité biologique [12].

L'utilisation des colonnes échangeuses d'ions a servi avec succès à isoler la nisine [13], la diplococcine [10], la leucocine A-UAL [14] et la pédiocine PA-1 [15]. La filtration sur gel a été préférée pour le cas de la lactacine [16] et la lacticine 11088 [17]. Les stratégies de purification des bactériocines se rapportaient exclusivement à la fraction sécrétée dans le milieu de culture par les souches productrices et ne tenaient pas compte de la partie adsorbée à la surface des cellules. La fraction adsorbée représente environ 80 % de la totalité de la bactériocine produite [18]. La propriété d'adsorption et de désorption des bactériocines sur les cellules en fonction du pH a permis d'améliorer les procédés d'extraction [19] et a abouti à des rendements plus élevés en bactériocines. Des auteurs ont rapporté que les interactions électrostatiques assurent l'adsorption aux surfaces hydrophiles alors que la désorption est influencée par l'ajout du tween 80 [20].

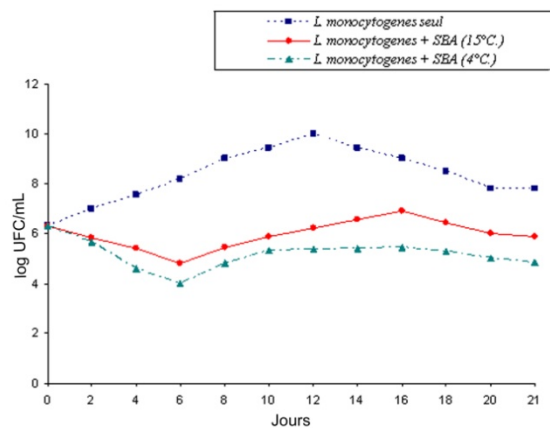
Un protocole général a été proposé pour la purification des bactériocines issues de bactéries lactiques de faibles poids moléculaires. Le protocole comprend quatre étapes soit une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie sur colonne échangeuse d'ions, une chromatographie d'interactions

hydrophobes et finalement un passage sur chromatographie liquide de haute performance en phase inverse (RP-HPLC). La méthode HPLC a été une méthode de choix pour séparer les molécules hydrophobes. Employée comme étape finale, elle permet une bonne purification de diverses bactériocines incluant la nisine [21], la leucocine A-UXL [14], la lactocine [22] et la sakacine A [23]. La méthode de purification de la nisine Z était basée sur l'effet du pH sur la propriété d'adsorption et de désorption de la bactériocine à la paroi bactérienne [24].

Dans cette étude, la méthode RP-HPLC utilisant une colonne semi-préparative a été aussi utilisée pour la purification. Le séquençage de la molécule par dégradation d'Edman a confirmé l'identité de la nisine Z et le degré de pureté a été confirmé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Récemment des auteurs ont développé une méthode de chromatographie d'immuno-affinité pour la purification de la nisine A [25].

### Effet anti-*Listeria* de *Bifidobacterium infantis*

Lorsque la souche cible *Listeria monocytogenes* est cultivée seule à 4°C. sur le bouillon Trypticase soya broth enrichi en extrait de levure, le taux d'accroissement est de 98,74 %. L'effet anti-*Listeria* de *Bifidobacterium infantis* TCM03 a montré après 6 jours de conservation que le taux de décroissance est de 97,05 % lorsque *L. monocytogenes* est stocké à 15°C. et de 99,50 % lorsque cette espèce est conservée à 4°C. (Fig. 5). L'activité antimicrobienne de *Bf. infantis* est plus importante à 4°C. Ceci suggère que la substance active n'a pas été altérée par les protéases pendant une durée de 6 jours (Phénomène de Rebond). Ce dernier a été décrit à plusieurs reprises dans la littérature [26; 27; 28; 29; 30]. Il a été expliqué par plusieurs phénomènes. Cependant, la dégradation enzymatique de la bactériocine semble être le facteur majeur de la diminution de son activité dans le milieu de culture, et donc de la reprise de croissance de *L. monocytogenes*.



**Figure 5 :** Evolution de *L. monocytogenes* seule et en présence de bactériocine de *B. infantis* au cours du stockage à 4°C et à 15°C pendant 21 jours.

Des études cliniques ont démontré que des infections gastro-intestinales peuvent être contrecarrées avec succès par l'utilisation de probiotiques [31; 32; 33; 34]. La consommation régulière de yogourt additionné de *Lactobacillus acidophilus* La5 ou de *Bifidobacterium lactis* Bb12 induit une suppression effective de l'infection due à *H. pylori* [35]. Par contre plusieurs auteurs ont mentionné que des souches de *L. rhamnosus* et de *L. reuteri* ont permis de traiter des gastro-entérites à *rotavirus* chez des enfants hospitalisés [36].

Les spectres d'action antimicrobienne de la nisine et de la pédiocine sont larges. Elles agissent à de très faibles concentrations sur des bactéries pathogènes ou d'altération alimentaire [8]. Cependant la nisine est la plus connue et la seule bactériocine des bactéries lactiques acceptée comme bio-ingrédient dans les aliments par FDA (Food and Drug Administration) [37]. La nisine est surtout réputée pour son efficacité contre les spores de *Clostridium* et de *Bacillus*, fréquemment responsables de la détérioration des conserves alimentaires [38].

Plusieurs auteurs ont signalé que dans un lait écrémé, l'activité de la nisine contre *L. monocytogenes* était plus élevée que dans un lait riche en matières grasses. Cette observation a été interprétée par le fait que la nisine s'adsorbe sur les globules gras du lait ce qui la rendrait non disponible pour détruire des cellules bactériennes [39]. D'autre part, il a été observé que l'activité de la nisine contre *L. monocytogenes* a été augmentée après addition de Tween 80 dans le lait. Le tween 80 déplacerait la nisine adsorbée sur les globules de gras [40]. L'activité biologique de 13 nisine dans le fromage dépend de la température du stockage [38].

## CONCLUSION

Une souche de *Bifidobacterium infantis* a été isolée à partir de selles de nourrisson âgé de deux mois. Cette souche est douée d'une activité antimicrobienne à l'égard de *Listeria monocytogenes*. La purification du composé antimicrobien a été effectué d'abord par passage du surnageant brut actif en chromatographie à échangeur de cations puis par passage en chromatographie en phase inversée. La bactériocine a été soumise à l'action de plusieurs enzymes protéolytiques. Ces dernières altèrent complètement l'activité antagoniste de la bactériocine. L'effet du traitement thermique a montré que cette substance reste stable pendant 30 min de 70°C. jusqu'à 90°C. L'activité inhibitrice de la bactériocine reste stable lorsque le pH est acide ou neutre. Par contre, elle a été affectée dans des conditions de pH basique. L'effet anti-*Listeria* de *Bifidobacterium infantis* TCM03 a montré qu'après 6 jours de conservation, le taux d'inhibition est très important dans des conditions réfrigérées (soit 99,50 %) ainsi que lorsque la température est de 15°C. (97,05%).

## REFERENCES

- [1]- Pope C., Kim S. K., Marzo A., Williams K., Jiang J., Shen H. and Lefranc L. "Organ-Specific Regulation of the CD8 T Cell Response to *Listeria monocytogenes*". *Infection J. Immunol.* 166, (2001), p. 3402 - 3409.
- [2]- Servin A. L. "Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens". *FEMS Microbiol. Rev.* (2004), 28, 4, p. 405 - 409.
- [3]- Naghmouchi K., Drider D., Kheadr E., Lacroix C., Prévost H. and Fliss I. "Multiple characterizations of *Listeria monocytogenes* sensitive and insensitive variants to divergicin M35, a new pediocin-like bacteriocin". *J. Appl. Microbiol.* (2006), 100, p. 29 - 34.
- [4]- Modler H. W. "Bifidogenic factors – sources, metabolism and applications". *Int. Dairy J.* (1994), p. 383 – 407.
- [5]- Tagg J. R., Dajani A. S. and Wannamaker L. W. "Bacteriocins of Gram positive bacteria". *Bacteriol. Rev.* (1976), 40, 3, p. 722 – 756.
- [6]- Thompson J.K., Collins M.A. and Mercer W.D. "Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450". *J. Appl. Bacteriol.* (1996), 80, 3, p. 338 - 348.
- [7]- Nissen-Meyer J., Holo H., Havarstein L. S., Sletten K. and Nes I. F. "A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides". *J. bacterial.* 174, 17, (1992), p. 5686 - 5692.
- [8]- De Vuyst L. and Vandamme E.J. "Nisin a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications". In: Bacteriocin of acid lactic bacteria: microbiology, genetics and applications. Blackie Academic and Professional, (1994), London.
- [9]- Mattick A.T.R. and Hirsch .A. "Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic *Streptococci*". *Lancet.*, 2, (1947), p. 5 - 7.
- [10]- Davey G.P. and Richardson B.C. "Purification and some properties of diplococin from *Streptococcus cremoris* 346". *Appl. Environ. Microbiol.* 41, (1981), p. 84 - 89.
- [11]- Holo A., Silson O. and Nes I.F. "Lactococcin A, A new bacteriocin from *Lactococcus Lacti* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene". *J. Bacteriol.* 173, (1991), p. 3879 - 3887.
- [12]- Kashket E.R. "Bioenergetics of lactic and bacreria cytoplasmic pH and osmotolerance". *FEMS Microbiol. Rev.* 46, (1987), p. 233 - 244.
- [13]- Bailey F.J. and Hurst A. "Preparation of highly active from of nisin from *Sreptococcus lactis*". *Can. J. Microbiol.* 17, (1971), p. 61 - 67.

- [14]- Hastings J.W., Sailer M., Johnson K., Roy K.L., Vederas J.C. and Stiles M.E. "Characterization of leucocin A-CAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconosroc gelidum*". *J. Bacteriol.* 173, (1991), p. 7491 - 7500.
- [15]- Nieto Lozano J.C., Nissen Mayer J., Sletten K., Pelaz C. and Nes I.F. "Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*". *J. Gen. Microbiol.* 138, (1992), p. 1985 - 1990.
- [16]- Muriana P.H. and Klaenhammer T.R. "Purification and partial characterization of lactacin F. a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088". *Appl. Environ. Microbiol.* 53, (1991), p. 553 - 560.
- [17]- Piard J.C. and Desmazeaud M. "Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances". *Le lait*, 72, (1992), p. 113 - 142.
- [18]- Daba H. Lacroix C., Huang J., Simard R.E. and Lemieux L. "Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL 5". *J. Appl. Bacteriol.* 77, (1994), p. 682 - 688.
- [19]- Yang R., Johnson M.C. and Ray B. "Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria". *Appl. Environ. Microbiol.* 58, (1992), p. 3355 - 3359.
- [20]- Bower C.K. and Daeschel M.A. "Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surfaces". *Appl. Environ. Microbiol.* 61, (1995), p. 992 - 997.
- [21]- Mulders J.W.M., Boerriqter U., Rollema H.S., Siezen R.I. and Vos V.M. "Identification and characterization of the lantibiotic nisin. a natural nisin variant". *Eur. J. Biochem.* 201, (1991), p. 581 - 584.
- [22]- Mortvedt C.I., Nissen-Meyer J., Sletten K. and Nes I. "Purification and amino acid sequence of lactocin S. a bacteriocin produced by *Loctobacillus sake* L45". *Appl. Environ. Microbiol.* 57, (1991), p. 1829 - 1834.
- [23]- Holck A., Axelsson L., Birkeland S.E., Aukmst T. and Blom H. "Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb 706". *J. Gen. Microbiol.* 138, (1992), p. 2715 - 2720.
- [24]- Meghrou J., Lacroix C., Bouksaim M., Lapointe G. and Sirnad R.E. "Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719". *J. Appl. Microbiol.* 83, (1997), p. 133 - 138.
- [25]- Suarez A.M., Azcona J.I., Rodriguez J.M., Sanz B. and Hernandez P.E. "One step purification of nisin A by immunoaffinity. Chromatography". *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 12, (1997), p. 4990 - 4992.
- [26]- Motlagh A.M., Bhunia A.K., Szostek F., Hansen T.R., Johnson M.C. and Ray B. "Nucleotide and amino acid sequence of pap-gene (pediocin AcH production) in *Pediococcus acidilactici* H". *Lett. Appl. Microbiol.* 15, 2, (1992), p. 45 - 48.
- [27]- Benkerroum N., Oubel H., Zahar M., Dlia S. and Filali-Maltouf A. "Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben". *J. Appl. Microbiol.* 89, (2000), p. 960 - 968.
- [28]- Davidson M.P. and Harrison M.A. "Resistance and adaptation to food antimicrobials, Sanitizers, and other process controls". *Food technol.* 56, 11, (2002), p. 69 - 78.
- [29]- Dicks L.M.T., Mellett F.D. and Hoffman L.C. "Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami". *Meat Science*, 66, (2004), p. 703 - 708.
- [30]- Martinez R.C.R. and De Martinis E.C.P. "Antilisterial activity of a crude preparation of *Lactobacillus sakei* 1 bacteriocin and its lack of influence on *Listeria monocytogenes* haemolytic activity". *Food Control.* 16, (2005), p. 429 - 433.
- [31]- Mercenier A., Pavan S. and Pot B. "Probiotics as Biotherapeutic Agents: Present Knowledge and Future Prospects". *Current Pharmaceutical Design.* 9, 2, (2003), p. 175 - 191.
- [32]- Turchet P., Laurenzano M., Auboiron S. and Antoine J.M. "Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study". *J. Nutr. Health Aging.* 7, 2, (2003), p. 75 - 77.
- [33]- Plummer S., Weaver M.A., Harris J. C., Dee P. and Hunter J. "Clostridium difficile pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea". *Int. Microbiol.* 7, 1, (2004), p. 59 - 62.
- [34]- Tursi A., Brandimarte G., Giorgetti G. M. and Elisei W. "Mesalazine and/or *Lactobacillus casei* in Preventing Recurrence of Symptomatic Uncomplicated Diverticular Disease of the Colon: A Prospective, Randomized, Open-label Study". *J. Clinical Gastroenterol.* 40, 4, (2006), p. 312 - 316.
- [35]- Wang Y.C., Yu R.C. and Chou C.C. "Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage". *Int. J. Food Microbiol.* 93, 2, (2004), p. 209 - 217.

- [36]- Rosenfeldt V, Michaelsen K. F., Jakobsen M., Larsen C. N., Moller P.L., Pedersen P., Tvede M., Weyrehter H., Valerius N. H. and Paerregaard A. "Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea, *Pediatr*". *Infect. Dis. J.* 21, 5, (2002), p. 411 - 416.
- [37]- Food and Drug Administration (FDA) "Nisin preparation: Affirmations of GRAS status as direct human food ingredient". *Food Drug Admin. Fed. Reg.* (1988), 53, 11247.
- [38]- Delves-Broughton J. "Nisin and its uses as a food preservative". *Food Technol.* 44, 11, (1990), p. 100 - 117.
- [39]- Jung D.S., Bodyfelt F.W. and Daeschel M.A. "Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk". *J. Dairy Sci.* 75, (1992), p. 387 - 393.
- [40]- Mulder H. and Walstra P. "The milk fat globule". *Ctr. Agric. Publ. Doc.* (1974), Wageningen, The Netherlands.