

Étude de bactéries lactiques à potentiel probiotique et de leurs métabolites

**Thèse présentée à l'INRS-Institut Armand-Frappier pour l'obtention
du grade de *Philosophiae Doctor (Ph. D.)* en Biologie**

Par

Mathieu Millette

*À ma femme, Andrea Villegas, pour son amour inconditionnel, sa tendresse
et sa passion.*

Remerciements

L'achèvement de cette thèse n'aurait pas pu être possible sans une incroyable dose de persévérance. Je tiens à remercier quelques personnes qui m'ont particulièrement aidé au cours de mes études.

Je pense immédiatement à mes parents, ma famille et mon amoureuse. Merci pour les sacrifices que vous avez fait pour moi. Vous me rendez heureux.

Merci à ma directrice de recherche, professeur Monique Lacroix, pour ses encouragements et ses conseils. Je vous remercie aussi de m'avoir laissé beaucoup de liberté dans mes démarches scientifiques. Cette thèse est le fruit de la bonne relation que nous avons su développer au fil des années.

Merci à mes co-directeurs, les professeurs Denis Archambault et Mircea-Alexandru Mateescu, pour leurs précieux conseils scientifiques.

Merci aux chercheurs du groupe de microbiologie de l'INRS-Institut Armand-Frappier, mais particulièrement aux professeurs Claude Dupont, François Shareck et Richard Villemur qui ont directement collaboré et contribué significativement à la réussite de mes études. Je vous remercie de m'avoir ouvert vos laboratoires et de m'avoir instruit de vos connaissances. En plus, vous avez toujours eu le temps pour un « petit cinq minutes » lorsque j'arrivais à l'improviste avec un problème à régler.

Merci à Roger Dubuc d'avoir su répondre à mes innombrables requêtes. Merci Roger pour ta patience.

Merci à Stéphane Salmiéri pour m'avoir encouragé durant ces longues années de doctorat. Stéphane, tu es devenu un ami qu'il est bon de côtoyer. Je te remercie pour toutes les corrections de dernières minutes que je t'ai imposées ainsi que pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble.

Merci à tous les membres du laboratoire que j'ai eu la chance de connaître durant ces années, particulièrement Canh, Simon, Rocco, Mélanie et Dominic, pour votre humour, nos longues discussions, vos conseils et vos encouragements.

Je remercie la Fondation Armand-Frappier, le CRSNG et la compagnie Bio-K+ International Inc. qui, grâce à leur support financier, ont permis l'achèvement de ces travaux de doctorat.

Table des matières

Remerciements.....	iii
Tables des matières.....	v
Résumé.....	ix
Abréviations.....	xi
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiv
Introduction.....	1
Chapitre 1 Revue de littérature.....	3
1.1. La résistance aux antibiotiques.....	4
1.1.1. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	5
1.1.2. <i>Enterococcus</i> résistant à la vancomycine (ERV).....	7
1.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (SARM).....	8
1.2. Que sont les probiotiques ?.....	11
1.2.1. Historique des probiotiques.....	11
1.2.2. Définition du terme probiotique.....	13
1.2.3. Caractéristiques d'un probiotique.....	14
1.2.4. Les bactéries lactiques.....	17
1.2.4.1. Les lactocoques.....	19
1.2.4.2. Les pédioques.....	20
1.3. Le microbiote intestinal et le tissu lymphoïde associé à l'intestin.....	21
1.3.1. Facteurs affectant le microbiote intestinal.....	21
1.3.2. Importance du microbiote intestinal.....	24
1.3.3. Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (GALT).....	26
1.3.3.1. Les plaques de Peyer.....	27
1.3.3.2. Les cellules épithéliales intestinales et les lymphocytes intra-épithéliaux.....	29
1.3.3.3. La lamina propria.....	30
1.4. Bénéfices et applications des probiotiques.....	34
1.4.1. Bénéfices des probiotiques pour l'hôte.....	32
1.4.2. Risques et effets secondaires associés à la consommation de probiotiques.....	33
1.4.3. Marché des produits probiotiques.....	34
1.4.4. Interférence, exclusion et antagonisme contre les micro-organismes pathogènes.....	34
1.4.5. Les bactériocines des bactéries Gram +.....	35
1.4.5.1. La nisine.....	40
1.4.5.2. La pédiochine.....	44
1.4.6. Modulation du microbiote intestinal et des infections gastro-intestinales par les probiotiques.....	47
1.4.7. Modulation du microbiote intestinal par les BAL productrices de bactériocines.....	53
1.4.8. Diminution de l'incidence et de la durée des diarrhées.....	55

1.4.8.1. Causes les plus fréquentes des diarrhées.....	55
1.4.9. Soulagement des symptômes associés aux maladies inflammatoires de l'intestin.....	61
1.4.10. Immunomodulation.....	61
1.4.10.1. Effets des probiotiques sur la réponse immunitaire.....	62
1.4.10.1.1. Immunité non-spécifique.....	62
1.4.10.1.2. Immunité humorale ou spécifique.....	64
1.4.10.1.3. Immunité cellulaire	65
1.4.11. Activité anti-cancérogène et anti-mutagène.....	65
1.4.12. Soulagement des symptômes associés à l'intolérance au lactose.....	67
1.4.13. Prévention des infections uro-génitales.....	68
1.4.14. Amélioration de l'équilibre lipidique.....	71
1.5. But, hypothèses et objectifs du projet.....	74
1.5.1. But.....	74
1.5.2. Hypothèses.....	74
1.5.3. Objectifs spécifiques.....	74
1.5.4. Moyens pour atteindre les objectifs	76
Chapitre 2 Publication 1: Characterization of <i>Lactobacillus</i> strains with high probiotic potential	78
2.1. Contributions des auteurs.....	80
2.2. Résumé en français.....	81
2.3. Abstract.....	82
2.4. Introduction.....	83
2.5. Material and methods.....	86
2.5.1. Bacterial strains.....	86
2.5.2. Fermentation of mixed cultures.....	86
2.5.3. Microbial analysis.....	87
2.5.4. Calculation of the generation time.....	87
2.5.5. Acid tolerance of LAB.....	88
2.5.6. Viable cell determination.....	88
2.5.7. Bile salt tolerance of LAB.....	88
2.5.8. Animals.....	89
2.5.9. Oral feeding of mice.....	89
2.5.10. Quantification of stool organisms.....	89
2.5.11. Statistical analyses.....	90
2.6. Results.....	91
2.6.1. Antimicrobial activity of <i>L. acidophilus</i> and <i>L. casei</i> probiotic strains	91
2.6.2. Survival of gastrointestinal transit.....	92
2.6.3. Modulation of the fecal microbiota.....	92
2.7. Discussion.....	94
2.8. Conclusion.....	98
Chapitre 3 Publication 2: <i>In vitro</i> growth control of selected pathogens by a <i>Lactobacillus acidophilus</i> and <i>L. casei</i>-fermented milk.....	109

3.1. Contributions des auteurs.....	111
3.2. Résumé en français.....	112
3.3. Abstract.....	113
3.4. Introduction.....	114
3.5. Material and methods.....	115
3.5.1. Bacterial strains and growth conditions.....	115
3.5.2. Antipathogenic activity of lactobacilli.....	115
3.5.3. Microbial analysis.....	116
3.5.4. Calculation of the generation time.....	116
3.5.5. Antimicrobial capacity of the soluble fraction of <i>Lactobacillus acidophilus</i> and <i>L. casei</i> -fermented milk.....	116
3.5.6. Calculation of % of growth inhibition of the pathogens by the whey....	117
3.5.7. Statistical analysis.....	118
3.6. Results.....	119
3.6.1. Delay of generation time by mixed culture.....	119
3.6.2. Antimicrobial activity of the soluble fraction extracted from the milk fermented by probiotic preparation.....	119
3.7. Discussion.....	120
Addenda.....	125
Chapitre 4 Publication 3 : Partial characterization of bacteriocins produced by human <i>Lactococcus lactis</i> and <i>Pediococcus acidilactici</i> isolates.....	129
4.1. Contributions des auteurs.....	131
4.2. Résumé en français.....	132
4.3. Abstract.....	133
4.4. Introduction.....	134
4.5. Material and methods.....	136
4.5.1. Micro-organisms and growth conditions.....	136
4.5.2. Isolation of bacteriocin-producing bacteria.....	136
4.5.3. Identification of LAB.....	136
4.5.4. Preparation of culture supernatants.....	137
4.5.5. Determination of antimicrobial spectrum and bacteriocin activity assay.....	137
4.5.6. Sensitivity of CFS antimicrobial activity to temperature, pH, proteolytic enzymes and gamma-irradiation treatments.....	138
4.5.7. Production studies.....	138
4.5.8. Size determination.....	138
4.6. Results.....	140
4.6.1. Isolation and identification of bacteriocin-producing strains.....	140
4.6.2. Characterization of the bacteriocins.....	140
4.7. Discussion.....	143
Chapitre 5 Publication 4 : Purification and identification of the pediocin produced by <i>Pediococcus acidilactici</i> MM33, a new human intestinal strain.....	156

5.1. Contributions des auteurs.....	158
5.2. Résumé en français.....	159
5.3. Abstract.....	160
5.4. Introduction.....	161
5.5. Material and methods.....	163
5.5.1. Bacterial strains and growth conditions	163
5.5.2. Pediocin purification procedures.....	163
5.5.3. Bacteriocin activity assay.....	164
5.5.4. Size determination.....	164
5.5.5. Protein concentration determination.....	165
5.5.6. Tryptic digestion of bacteriocin.....	165
5.5.7. Mass determination by mass spectrometry	165
5.5.8. Polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing.....	166
5.5.9. Plasmid curing.....	166
5.5.10. Plasmid DNA purification	167
5.5.11. Time-kill studies of pediocin from <i>P. acidilactici</i> MM33	167
5.6. Results.....	168
5.7. Discussion.....	170
Chapitre 6 Publication 5: Capacity of human nisin and pediocin-producing bacteria to reduce vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i> intestinal colonization.....	178
6.1. Contributions des auteurs	180
6.2. Résumé en français.....	181
6.3. Abstract.....	182
6.4. Introduction.....	183
6.5. Material and methods.....	185
6.5.1. Bacterial strains and growth conditions.....	185
6.5.2. <i>In vitro</i> VRE inhibition.....	185
6.5.3. Polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing.....	186
6.5.4. Acid tolerance of LAB.....	186
6.5.5. Bile salt tolerance.....	187
6.5.6. Animals.....	187
6.5.7. Fecal microbial population modulation following ingestion of LAB...	188
6.5.8. VRE intestinal colonization experimental model.....	188
6.5.9. Quantification of stool organisms.....	189
6.5.10. Statistical analysis.....	189
6.6. Results and discussion.....	191
Chapitre 7 Conclusions générales.....	205
Bibliographie.....	215
Annexe I Biographie.....	256

Résumé

Les probiotiques sont définis comme étant des suppléments nutritionnels composés de micro-organismes précis, vivants, en quantité suffisante et capable d'altérer le microbiote intestinal de l'hôte (par implantation ou colonisation) pour exercer des effets bénéfiques. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques (BAL) sont des peptides antimicrobiens bactéricides qui inhibent la croissance d'autres bactéries sans affecter le développement de la souche productrice. L'influence des BAL productrices de bactériocines sur le microbiote intestinal est très peu documentée. Ce projet de doctorat avait pour objectif de caractériser le potentiel antimicrobien de diverses BAL probiotiques.

Dans un premier temps, les modes d'action antimicrobiens d'un lait fermenté par le probiotique Bio-K+CL1285 ont été évalués. Les résultats démontrent l'implication importante des acides organiques, mais aussi d'un autre composé non identifié. Ensuite, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM19 et *Pediococcus acidilactici* MM33, isolées à partir de fèces humaines, ont montré la capacité de sécréter deux bactériocines distinctes. Ces bactériocines ont ensuite été purifiées par chromatographie en phase liquide et identifiées par dégradation d'Edman et spectrométrie de masse. L'hybridation de l'ADN total de chaque bactérie avec les gènes de la nisine et de la pédiocine PA-1 a permis de confirmer que *Lc. lactis* MM19 produit la nisine Z tandis que *P. acidilactici* MM33 sécrète la pédiocine PA-1. C'est la première fois que des souches de BAL provenant d'un intestin humain et possédant la capacité de produire ces deux bactériocines sont isolées. De plus, une souche mutante ayant perdu la capacité de sécréter la pédiocine a été développée. En parallèle, la production de bactériocines a été testée chez d'autres probiotiques.

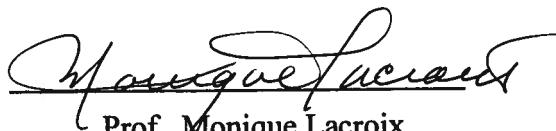
Les probiotiques à l'étude ont été testés pour vérifier leur résistance à l'acidité gastrique et aux sels biliaires. Parmi les souches à l'étude, *P. acidilactici* MM33 semble la bactérie la plus résistante aux sels biliaires tandis que *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M, une souche mutante qui surproduit des exopolysaccharides, résiste le moins.

Toutes les souches probiotiques survivent très bien à un traitement gastrique de 30 minutes à pH ≥ 2,5.

L'influence du gavage quotidien de diverses souches probiotiques a été testée sur des souris C57Bl/6 saines. La prise de probiotiques a augmenté la concentration de bactéries lactiques totales dans les fèces de ces souris. De plus, le ferment CL1285, *L. kefiranofaciens* R2C2, *L. rhamnosus* ATCC 9595 et *L. rhamnosus* RW-9595M ont diminué significativement la concentration de staphylocoques et de coliformes totaux après 9 jours de gavages tandis que les deux bactéries productrices de bactériocines ont augmenté temporairement la concentration de staphylocoques. Dans un modèle murin d'infection intestinale par *Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV), le gavage des souris infectées avec les BAL productrices de bactériocines a permis de diminuer la concentration fécale d'ERV contrairement à la souche non-bactériocinogène qui n'a pas eu d'effet. Ce projet de doctorat aura permis d'isoler deux souches humaines productrices de nisine et de pédiocine. Ces bactéries, à fort potentiel probiotique, pourraient être utilisées dans la fabrication d'un produit nutraceutique dédié à la prévention des infections gastro-intestinales causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques.



Mathieu Millette, candidat PhD



Prof. Monique Lacroix,
Directrice de recherche

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ATP	adénosine triphosphate
BAL	bactéries lactiques
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CCR	cancer colo-rectal
CFS	<i>Cell-free supernatant</i>
CMI	concentration minimale inhibitrice
DAA	diarrhée associée à la prise d'antibiotiques
DGGE	denatured gradient gel electrophoresis
EPS	exopolysaccharide
ERV	<i>Enterococcus</i> résistant à la vancomycine
FAP	polypose adénomateuse familiale (familial adenomatous polyposis)
FDA	food and drug administration
FOS	fructo-oligosaccharide
GALT	Tissu lymphoïde associé à l'intestin (<i>gut associated lymphoid tissue</i>)
GM-CSF	facteur de croissance de colonies granulocytaires-macrophagiques
GOS	galacto-oligosaccharide
GRAS	<i>generally recognized as safe</i>
HDL	Lipoprotéine de haute densité (<i>high density lipoprotein</i>)
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
INF-γ	interféron-γ
LDL	Lipoprotéine de faible densité (<i>low desity lipoprotein</i>)
Mφ	macrophage
NAG	<i>N</i> -acétylglucosamine
NAM	acide <i>N</i> -acétylmuramique
NK	Cellules tueuses naturelles (<i>natural killer</i>)
NO	oxyde nitrique
OMS	organisation mondiale de la santé
PCSin	programme canadien de surveillance des infections nosocomiales
pH	potentiel hydrogène
pI	point isoélectrique
PMNs	polymorphonucléaires
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SI	système immunitaire
SPRP	<i>Streptococcus pneumoniae</i> résistant à la pénicilline
TGF-β	Facteur de croissance et de transformation (<i>transforming growth factor</i>)
TLR	Récepteur du type Toll (<i>toll-like receptor</i>)
TNF-α	facteur de nécrose des tumeurs (<i>tumor necrosis factor α</i>)
TSB	<i>tryptic soy broth</i>
UFC	unité formatrice de colonie

Liste des tableaux

Tableau 1.1.	Principaux micro-organismes utilisés comme agents probiotiques	17
Tableau 1.2.	Classification des bactériocines produites par les BAL	39
Tableau 1.3.	Masse moléculaire (M. mol.), point isoélectrique (pI) et structure primaire des bactériocines produites par des souches de <i>Lactococcus</i> sp. et de <i>Pediococcus</i> sp.	46
Tableau 1.4.	Études cliniques montrant l'implication de la consommation de probiotiques dans le traitement ou la prévention des pathologies causées par <i>Helicobacter pylori</i> ou <i>Clostridium difficile</i>	51
Tableau 1.5.	Études cliniques impliquant la consommation de probiotiques dans la prévention des diarrhées du voyageur	56
Tableau 1.6.	Études cliniques impliquant la consommation de probiotiques dans la prévention ou le traitement des diarrhées associées au Rotavirus ou des gastro-entérites	58
Tableau 1.7.	Études cliniques randomisées montrant l'effet thérapeutique de la consommation de probiotiques dans la prévention des diarrhées associées à la prise de divers antibiotiques	60
Tableau 1.8.	Études cliniques impliquant la consommation de probiotiques dans la prévention des vaginoses bactériennes	70
Tableau 1.9.	Études cliniques montrant l'influence de la consommation de probiotiques sur les lipides sanguins	72
Tableau 2.1.	Generation time of the bacterial pathogens after 8 hours of fermentation in skimmed milk at 37°C in mono-culture or co-culture with probiotic CL1285	102
Tableau 2.2.	Survival of lactic acid bacteria strains after an incubation of 30 min at 37 °C in simulated gastric fluid (pH 1.5 to 3.0)	103
Tableau 3.1.	Generation time of pathogenic bacteria after 8 hours of fermentation in mono-culture or co-culture in presence of probiotic <i>Lactobacillus acidophilus</i> and <i>L. casei</i> in 10% reconstituted non-fat dry milk at 37°C under pH controlled conditions (pH 6.5)	123

Tableau 3.2.	Inhibition percentages of selected bacteria after 12 hours of incubation in Brain Heart Infusion containing soluble fractions obtained from the <i>Lactobacillus acidophilus</i> and <i>L. casei</i> -fermented milk	124
Tableau 3.3.	Pourcentage d'inhibition de bactéries sélectionnées après 12 heures d'incubation dans une infusion cœur-cervelle contenant la fraction soluble extraite d'un lait fermenté commercial avec ou sans agitation des plaques à 37 °C	127
Tableau 3.4.	Pourcentage d'inhibition de bactéries sélectionnées après 12 heures d'incubation dans une infusion cœur-cervelle contenant la fraction soluble extraite d'un lait fermenté commercial, du placebo ou de diverses concentrations de glucono-delta-lactone avec agitation des plaques à 37 °C	128
Tableau 4.1.	Inhibitory activities against lactic acid bacteria and other indicator microorganisms of neutralized, cell-free supernatants from cultures of <i>Lactococcus lactis</i> MM19 and <i>Pediococcus acidilactici</i> MM33	147
Tableau 4.2.	Effects of various enzymes, detergents and urea on the antimicrobial activities of neutralized cell-free supernatants from cultures of <i>Lactococcus lactis</i> MM19 and <i>Pediococcus acidilactici</i> MM33 against <i>Lactobacillus sakei</i> used as indicator strain	148
Tableau 4.3.	Effects of gamma irradiation on the antimicrobial activities of neutralized cell-free supernatants from cultures of <i>Lactococcus lactis</i> MM19 and <i>Pediococcus acidilactici</i> MM33 against <i>Lactobacillus sakei</i> used as indicator strain	149
Tableau 5.1.	Purification of bacteriocin produced by <i>Pediococcus acidilactici</i> MM33 ($n = 2$)	174
Tableau 6.1.	Maximal concentration tolerated (%) of bile salt by LAB.	199
Tableau 6.2.	Survival of LAB after an incubation of 30 min at 37°C in simulated gastric fluid (pH 1.5 to 3.0).	200

Liste des figures

Figure 1.1.	Agents antimicrobiens et leurs cibles moléculaires dans les bactéries	7
Figure 1.2.	Principales espèces bactériennes du tractus gastro-intestinal humain	23
Figure 1.3.	Vue d'ensemble des bactéries intestinales bénéfiques ou non pour la santé	25
Figure 1.4.	Schéma représentant le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale	27
Figure 1.5.	Circulation des lymphocytes dans le système lymphoïde des muqueuses	28
Figure 1.6.	Structure de la nisine A	41
Figure 1.7.	Structure primaire du lipide II	42
Figure 2.1.	Inhibition of pathogenic bacteria in associative culture with probiotic CL1285 in skimmed milk at 37°C	100
Figure 2.2.	Lactic acid bacteria population in feces of C57Bl/6 mice during feeding with probiotic bacteria.	104
Figure 2.3.	<i>Lactobacillus</i> spp. population in feces of C57Bl/6 mice during feeding with probiotic bacteria	105
Figure 2.4.	<i>Enterobacteriaceae</i> population in feces of C57Bl/6 mice during feeding with probiotic bacteria	106
Figure 2.5.	<i>Staphylococcus</i> spp. population in feces of C57Bl/6 mice during feeding with probiotic bacteria.	107
Figure 2.6.	Content of the total mesophilic anaerobes population in feces of C57Bl/6 mice during feeding with probiotic bacteria	108
Figure 4.1.	Effects of exposure to various temperature for times of 15 min (◆), 30 min (□) or 60 min (▲) on the antimicrobial activity of cell free supernatants from cultures of (A) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MM19 or (B) <i>Pediococcus acidilactici</i> MM33.	150
Figure 4.2.	Effects of pH on the relative antimicrobial activities of cell free supernatants from cultures of <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	

MM19 (□) or <i>Pediococcus acidilactici</i> MM33 (▲)	152
Figure 4.3. Number of bacteria (○), amounts of bacteriocin (■) and pH values (▲) in cultures of (A) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MM19 or (B) <i>Pediococcus acidilactici</i> MM33 in Lactobacilli MRS broth during growth at 35 °C under aerobic conditions	153
Figure 4.4. SDS-PAGE profiles of the bacteriocins formed in the supernatants of cultures of <i>Lactococcus lactis</i> MM19 and <i>Pediococcus acidilactici</i> MM33	155
Figure 5.1. Cation-exchange chromatogram of the antimicrobial peptide produced by <i>Pediococcus acidilactici</i> MM33.	173
Figure 5.2. SDS-PAGE profile of the fractions recovered along the purification steps of the pediocin secreted by <i>Pediococcus acidilactici</i> MM33	175
Figure 5.3. Antimicrobial activity of the cell free supernatant produced by <i>Pediococcus acidilactici</i> MM33 (box A), <i>P. acidilactici</i> MM33A, a <i>ped</i> ⁻ mutant (box B), <i>P. acidilactici</i> MM33 in presence of proteases (box C) and <i>P. acidilactici</i> MM33A in presence of proteases (box D)	176
Figure 5.4. <i>Listeria monocytogenes</i> HPB 2812 serotype 1/2a growth in tryptic soya broth in presence of: 0 (◆); 100 (□); 200 (▲); 400 (●) and 800 (×) AU ml ⁻¹ of purified pediocin produced by <i>Pediococcus acidilactici</i> MM33.	177
Figure 6.1. Well diffusion assay of purified nisin from <i>Lc. lactis</i> MM19 (N) or purified pediocin from <i>P. acidilactici</i> MM33 (P) against a clinical isolate of vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i> in BHI agar without proteases (A) or in the presence of 15 U/ml of proteases type XIV from <i>Streptomyces griseus</i> (B).	198
Figure 6.2. Total culturable LAB concentration in feces of C57Bl/6 mice following a daily ingestion of <i>Lc. lactis</i> MM19, <i>P. acidilactici</i> MM33 or <i>P. acidilactici</i> MM33A.	201

- Figure 6.3.** Total culturable *Enterobacteriaceae* concentration in feces of C57Bl/6 mice following a daily ingestion of *Lc. lactis* MM19, *P. acidilactici* MM33 or *P. acidilactici* MM33A. 202
- Figure 6.4.** Total culturable mesophilic anaerobes concentration in feces of C57Bl/6 mice following a daily ingestion of *Lc. lactis* MM19, *P. acidilactici* MM33 or *P. acidilactici* MM33A. 203
- Figure 6.5.** Changes in density of total vancomycin-resistant *Enterococcus* in VRE colonized CF-1 mice treated with PBS (---●---), bacitracin (◊), *Lc. lactis* MM19 (▲), *P. acidilactici* MM33 (■) and *P. acidilactici* MM33A (×). 204

Introduction

Des percées scientifiques majeures ont été effectuées dans tous les domaines des sciences de la santé depuis la fin du 19^{ème} siècle, principalement dans le développement d'agents antimicrobiens. Cependant, les décès dus aux infections respiratoires aiguës, aux maladies diarrhéiques, à la rougeole, au syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), au paludisme et à la tuberculose représentent plus de 85% de la mortalité attribuée aux maladies infectieuses dans le monde (OMS, 2001). Le phénomène de résistance aux antibiotiques connaît une accélération exponentielle depuis les années 1980 ce qui remet en cause les traitements développés pour éradiquer ces infections. Les bactéries acquièrent leur résistance aux antibiotiques si rapidement que l'industrie pharmaceutique est incapable de développer de nouvelles drogues pour compétitionner contre les souches mutantes (Rolfe, 2000). Les exemples de bactéries résistantes aux antibiotiques sont multiples: *Enterococcus* résistants à la vancomycine (ERV), *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline (SPRP) (Conly, 2002). En effet, les données recueillies par le programme canadien de surveillance des infections nosocomiales (PCSN) montrent que la proportion d'isolats de SARM par rapport aux isolats cliniques de *S. aureus* sensibles à la méthicilline était en augmentation passant de 1 à 8% entre 1995 et 2000 (Conly, 2002). Dans la seule année 2003 au Québec, il a coûté plus de 16 millions de dollars pour le traitement de 579 bactériémies causées par le SARM (INSPQ, 2003). Aux États-Unis, l'incidence des infections nosocomiales provoquées par des ERV est passée de 0,3% en 1989 à 23% en 1999 (Martone, 1998). Bien que beaucoup moins fréquentes, des épidémies d'ERV ont été recensées dans toutes les provinces canadiennes au cours des dernières années. L'ERV n'est pas très pathogène, à moins d'infecter des individus immunodéprimés tels que des malades traités dans l'unité de soins intensifs d'un centre hospitalier. Par contre, cette bactérie agit comme un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques. L'ERV a une grande facilité à développer, acquérir et transmettre ses gènes de résistance à des pathogènes beaucoup plus virulents tels que le SARM ou le SPRP (Koch *et al.*, 2004). Pour cette raison, il est primordial de contrôler et d'éliminer ce pathogène nosocomial.

En plus des mesures préventives renforcées, il devient urgent de trouver des méthodes de remplacement aux antibiotiques. À cet effet, les habiletés antimicrobiennes des probiotiques deviennent une solution alternative de choix à l'antibiothérapie traditionnelle contre les infections gastro-intestinales. Les vertus préventives et thérapeutiques des bactéries probiotiques sont de plus en plus reconnues par la communauté scientifique. En effet, il est désormais admis que les probiotiques augmentent la qualité nutritive des aliments, stimulent la synthèse des vitamines et la production d'enzymes, stabilisent la microflore entérique par exclusion compétitive des bactéries pathogènes, améliorent les systèmes de défense de l'hôte par la production d'agents antimicrobiens, réduisent le taux de cholestérol sérique, diminuent les risques de cancer du colon par la détoxification des carcinogènes et suppriment les tumeurs par la modulation de l'immunité à médiation cellulaire (Brady *et al.*, 2000; De Roos et Katan, 2000; Naidu et Clemens, 2000; Gänzle *et al.*, 1999; Hirayama et Rafter 1999; Holzapfel *et al.*, 1998; Netherwood *et al.*, 1999; Ouwehand *et al.*, 1999; Tahri *et al.*, 1995; Taylor et Williams 1998; Wagner *et al.*, 2000).

D'une part, de nombreux produits alimentaires possédant des vertus probiotiques sont en vente libre dans le marché nord-américain (yogourt, lait fermenté, kéfir, capsules de bactéries lyophilisées). Afin d'exercer leurs actions bénéfiques, les bactéries acido-lactiques (BAL) doivent survivre aux conditions particulières retrouvées dans l'estomac et l'intestin. Le niveau d'acidité de l'estomac, la présence d'enzymes digestifs et les sels biliaires au niveau du duodénum et du petit intestin sont les principaux éléments pouvant compromettre la survie des BAL lors du transit gastro-intestinal. D'autre part, la manipulation de l'écologie intestinale par la consommation de souches microbiennes spécifiques est relativement bien documentée. Par contre, l'impact de l'ingestion de BAL sur le microbiote intestinal ou la capacité de ces bactéries bactériocinogènes à prévenir des infections provoquées par des pathogènes résistants aux antibiotiques n'est pas connu. Par conséquent, cette étude a démontré l'implication réelle de la production de bactériocines lors de l'ingestion de souches productrices sur le microbiote intestinal de souris saines ou dans un modèle d'infection à ERV.

CHAPITRE 1

Revue de littérature

1.1. LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

À la suite de la découverte de la pénicilline, la recherche de nouvelles molécules antibiotiques a été fructueuse pour les compagnies pharmaceutiques. En fait, le rythme des nouveautés était tel qu'en 1969 le chirurgien général des États-unis (US General Surgeon), William H. Stewart, a déclaré que le temps était venu de fermer le grand livre des maladies infectieuses!! (Nelson, 2003). Cependant, des maladies autrefois facilement prises en charge et soignées sont maintenant de retour et plus virulentes que jamais. La syphilis (*Treponema pallidum*), la gonorrhée (*Neisseria gonorrhoeae*), le choléra (*Vibrio cholerae*) et la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) sont quelques exemples de dangereux pathogènes qui étaient autrefois facilement éliminés par les antibiotiques.

“...But I would like to sound one note of warning. Penicillin is to all intents and purposes non-poisonous so there is no need to worry about giving an overdose and poisoning the patient. There may be a danger, though, in underdosage. It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing has occasionally happened in the body....”

Alexander Flemming, (1945)

Flemming lui-même avait prédit le phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques durant sa présentation lors de la remise du prix Nobel de Médecine en 1945. Depuis la découverte de la pénicilline en 1928, les antibiotiques sont extrêmement utilisés dans les hôpitaux et autres centres de soins de santé partout dans le monde, afin de combattre les maladies causées par les infections bactériennes. Cent soixante millions de prescriptions d'antibiotiques seraient rédigées annuellement aux États-Unis contre 25 millions de doses d'antibiotiques oraux au Canada en 1999 (Conly, 2002). Un volume de 22,7 millions de kilogrammes d'antibiotiques sont vendus aux États-unis dont la moitié est destinée aux humains et l'autre moitié pour l'agriculture et l'aquaculture. Cette utilisation massive en médecine humaine et vétérinaire et son usage comme promoteur de croissance dans l'élevage des animaux a permis aux bactéries de développer une résistance accrue à ces substances antibiotiques. Ce phénomène de résistance est

maintenant considéré comme l'un des problèmes majeurs de santé publique dans le traitement des maladies infectieuses. Une augmentation dramatique de la résistance a été observée au cours des 3 dernières décennies et de plus en plus d'études ont établi une corrélation directe entre le manque de contrôles et de lignes directrices lors de la prescription des antibiotiques par les médecins dans les centres hospitaliers et la fréquence d'apparition de la résistance aux antibiotiques (Murray, 1997).

1.1.1. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

L'immense majorité des microorganismes a la capacité de développer des résistances aux divers antibiotiques. Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), l'*Enterococcus* sp. résistant à la vancomycine (ERV), les *Shigella* sp. et *Salmonella* résistantes à plusieurs antibiotiques, les bacilles entériques Gram- tels *Klebsiella* sp. et *Enterobacter* sp. résistants à tous les antibiotiques de la classe de β -lactamines ou encore le *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline (SPRP) sont autant d'exemples de problèmes cliniques fréquemment rapportés dans la littérature médicale (Conly, 2002). Les bactéries pathogènes Gram + sont des agents infectieux très présents en milieu hospitalier, principalement le SARM et l'ERV.

Étant donné que les modes d'action et les récepteurs moléculaires des antibiotiques sont très variés (Figure 1.1), les mécanismes de résistance développés par les microbes le sont tout aussi. En fait, les gènes de résistance aux antibiotiques qui sont aujourd'hui portés par les bactéries n'ont pas toujours été présents chez les espèces devenues insensibles. Il semblerait que ces gènes proviennent de la cohabitation depuis des millénaires avec les microbes producteurs de ces antibiotiques, mais que la pression sélective imposée par les antibiotiques aurait accéléré ce processus de transfert. Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques en produisant des enzymes qui ont la capacité de modifier les antibiotiques telles les β -lactamases qui hydrolysent l'anneau lactamine de la pénicilline (Livermore et Wood ford, 2006). Certaines bactéries vont modifier la cible moléculaire de l'antibiotique l'empêchant ainsi d'adhérer à la bactérie. Ce phénomène a été observé chez certaines souches de *Pneumococcus* sp. qui altèrent la

protéine liant la pénicilline à la surface membranaire (**Figure 1.1**) (Coffey *et al.*, 1995). Le principal mécanisme de résistance à la tétracycline de nombreuses bactéries autant Gram + que Gram – consiste en l'expulsion de l'antibiotique vers l'extérieur de la bactérie à l'aide de pompes membranaires. Finalement, des mutations ponctuelles spécifiques peuvent survenir sur les gènes de résistance déjà existants en présence de concentrations sous-létales d'antibiotiques ce qui mènera à l'apparition de nouveaux gènes de résistance contre de nouveaux antibiotiques (Roy, 1997). Quel que soit le mécanisme de résistance observé, un gène est toujours impliqué. Ces gènes peuvent être transmis d'une espèce à l'autre par des plasmides, des transposons ou des intégrons. Les deux dernières sont des éléments génétiques mobiles qui assurent la dissémination plus ou moins rapide des gènes de résistance chez les micro-organismes (Grundmann *et al.*, 2006).

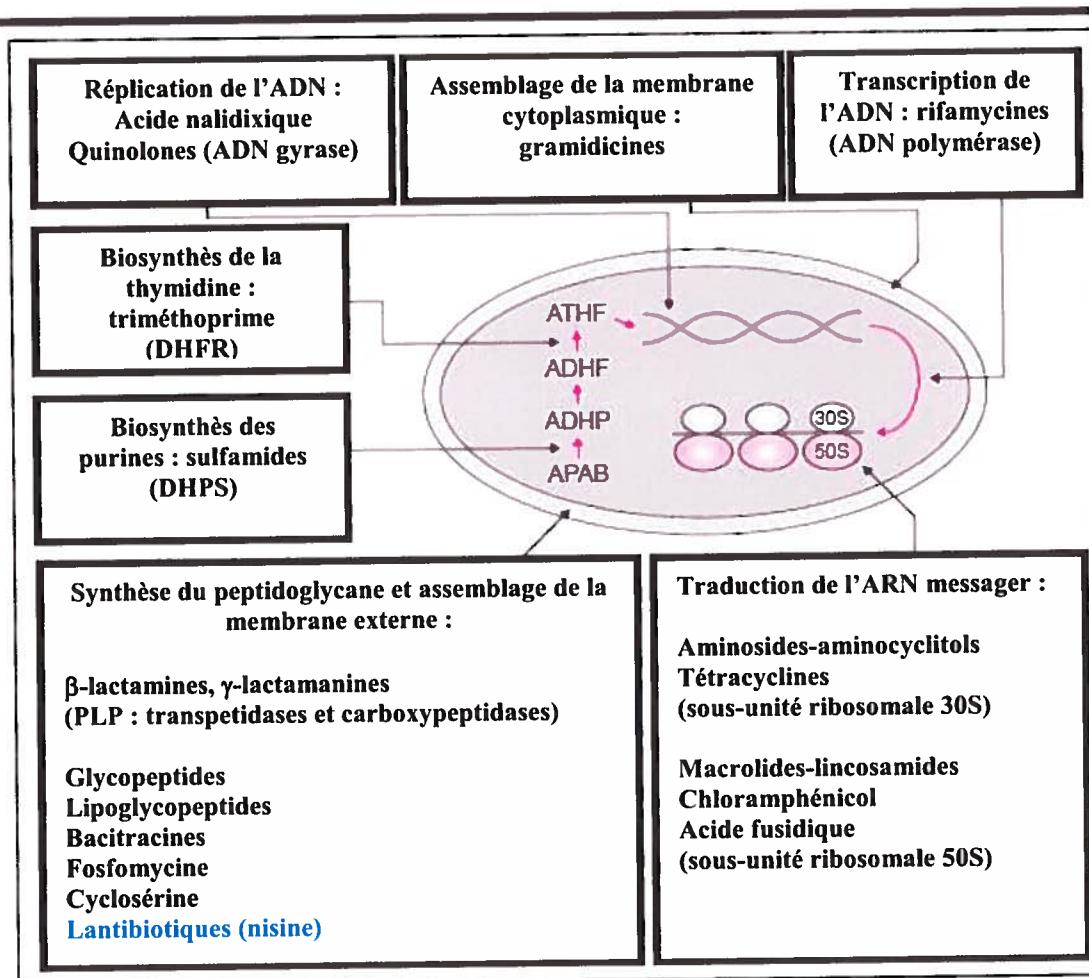


Figure 1.1. Agents antimicrobiens et leurs cibles moléculaires dans les bactéries. ADHF: acide dihydrofolique; ADHP: acide dihydroptéroïque; ATFH: acide tétrahydrofolique; APAB: acide para-aminobenzoïque; DHFR: dihydrofolate réductase; DHPS: dihydroptéroate synthase; PLP: protéines liant la pénicilline (adapté de Roy, 1997).

1.1.2. *Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV)

Les *Enterococcus* sp. font partie du microbiote gastro-intestinal (de la bouche à l'anus) et vaginal des humains et des animaux. Ils sont devenus des pathogènes importants durant les deux dernières décennies à cause de leur résistance intrinsèque ou acquise face aux antibiotiques. Le risque de colonisation ou d'infection par les ERV a été associé à l'utilisation de plusieurs antibiotiques, notamment les glycopeptides oraux ou intraveineux, les céphalosporines de troisième génération et les antibiotiques avec activité

anti-anaérobie. Les entérocoques sont intrinsèquement résistants à l'aztreoname, aux céphalosporines, à la clindamycine, aux pénicillines résistantes aux pénicillases, au triméthoprim-sulfamethoxal et aux amino-glycosides. De plus, ils ont acquis des résistances à la pénicilline, à l'érythromycine, la gentamicine, la streptomycine, la tétracycline et la vancomycine (Donskey *et al.*, 1999). Par contre, il a été démontré que la ramoplanine et la bacitracine orale sont capables de supprimer la colonisation intestinale par les ERV. Toutefois, à la suite de l'antibiothérapie, des récurrences ont été observées dans tous les cas (Stiefel *et al.*, 2004). La colonisation par les entérocoques peut persister plusieurs mois et les patients qui en sont colonisés sont des réservoirs de propagation de l'infection qui peut devenir rapidement une épidémie si aucune mesure n'est prise pour enrayer la transmission (Donskey *et al.*, 2001). Bien que la vancomycine soit utilisée en médecine humaine depuis 1958 (Levine, 2006), ce n'est qu'en 1986 que la première souche d'ERV a été isolée en Europe (Uttley *et al.*, 1988) et en 1987 pour le premier ERV américain (Sahm *et al.*, 1989). Aux États-Unis, la fréquence de résistance à la vancomycine chez les isolats cliniques d'entérocoques a augmenté de 0,3% en 1989 à 7,9% en 1993 (CDC, 1993). La fréquence de résistance était de 30% en 2004 (NNIS, 2004). Conly (2002) rapporte qu'il en coûte 6 732\$ pour soigner un individu colonisé par l'ERV et que la facture totale au Canada varierait entre 5 et 16\$ millions. La propagation d'ERV peut mener à l'augmentation des isolats cliniques multi-résistants puisque, malgré que les entérocoques ne soient pas reconnus comme étant des pathogènes sévères, ils représentent un réservoir impressionnant de gènes de résistance. En effet, la dissémination horizontale de la résistance aux glycopeptides à des bactéries beaucoup plus dangereuses, comme les staphylocoques ou les streptocoques, a été observée parce qu'il n'y a pas de barrière à l'expression hétérologue ou au transfert de gènes parmi les cocci Gram + (Courvalin, 2006; Rice, 2006). Les souches d'ERV ont d'innombrables gènes de résistance à plusieurs antibiotiques. Cependant, la résistance à la vancomycine est contrôlée par sept gènes *vanA* à *vanG* qui conduisent à des niveaux de tolérance variés. Tous ces gènes modifient le récepteur de la vancomycine dans la membrane bactérienne ce qui a pour effet de diminuer la liaison du glycopeptide avec leur cible. Les gènes *vanA*, *vanB* et *vanD* modifient lalanine terminale du pentapeptide précurseur de la

muréine par le D-lactate tandis que les gènes *vanC₁*, *vanC_{2/3}*, *vanE* et *vanG* le changent en D-sérine (Klare *et al.*, 2003).

1.1.3. *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM)

La méthicilline a été utilisée pour la première fois en Europe en 1959 et aux États-Unis en 1961. Les premières souches de SARM ont été isolées au Royaume-Uni en 1961, suivi de près par les autres pays européens, Japon et Australie. Le premier SARM américain a été observé en 1968 (Rice, 2006) et au Canada en 1981 (Conly, 2002). Les isolats cliniques *S. aureus* résistants à la méthicilline étaient de 35% en 1996 (Conly, 2002) et de 57% en 2002 (Rice, 2006). En 2004, 59,4% des infections dans les unités de soins intensifs étaient causées par le SARM, une augmentation de 11% par rapport aux chiffres de 2002. De plus, l'incidence des souches résistantes à la méthicilline au Canada est passée de 1 à 6% entre 1995 et 1999 (Rice, 2006). Conly (2002) rapporte qu'il en coûte 14 360\$ pour traiter une personne infectée par le SARM et estime de 42 à 59\$ millions le coût des traitements associés à cette bactérie pour l'ensemble du Canada. Des souches de SARM sont maintenant isolées dans la communauté. En général, le SARM est résistant à plusieurs antibiotiques dont les β-lactamines. Par exemple, une souche nommée EMRSA-17 a été isolée durant une rude épidémie dans le sud de l'Angleterre. Cette souche était résistante à la méthicilline, aux fluoroquinolones (ciprofloxacin), aux macrolides (érythromycine), aux aminoglycosides (gentamicine, kanamycine, néomycine, streptomycine), à la tétracycline, à la rifampicine et à l'acide fusidique (Aucken *et al.*, 2002). Plusieurs mécanismes de résistance à la méthicilline ont été observés chez les SARM incluant l'inactivation de l'antibiotique par une β-lactamase, la réduction de la capacité de la protéine liant la pénicilline (PLP) et l'acquisition du gène *mecA* qui code pour une affinité réduite des β-lactamines. Ce dernier mécanisme semble prédominant chez les SARM.

Malgré cela, les multinationales pharmaceutiques coupent les budgets alloués à la recherche et développement de nouveaux antibiotiques du fait que ces médicaments, de plus en plus dispendieux à développer, ne sont pas rentables économiquement. Il est évidemment beaucoup plus bénéfique sur le plan financier de développer des molécules

qui diminuent le niveau de cholestérol et qui doivent être prises chaque jour pour le restant de la vie que de tenter de créer de nouveaux agents antimicrobiens qui ne seront prescrits que durant une dizaine de jours. De nombreux scientifiques et spécialistes du domaine de la santé restent très pessimistes et critiques quant à l'avenir de l'antibiothérapie conventionnelle et surtout à l'utilisation excessive des quelques molécules antimicrobiennes encore efficaces mais très coûteuses (Nelson, 2003). De plus, aucune nouvelle classe d'antibiotiques n'a été découverte depuis les années 1970. De nouvelles cibles moléculaires sont recherchées afin de contourner le problème de la résistance, mais très peu de réelles percées sont annoncées. Beaucoup d'efforts sont maintenant déployés afin de développer et d'étudier de nouvelles façons de mener la lutte aux infections (Martinez et Baquero, 2002). Par exemple, la découverte de nouveaux composés organiques (Bogdanovich *et al.*, 2005), de peptides antimicrobiens isolés des vertébrés (ex: défensines) (Klautman et Chang, 2006), la redécouverte du miel (Cooper *et al.*, 2002), d'huiles essentielles extraites des plantes (Oussalah *et al.*, 2006), de nouvelles souches probiotiques ou des métabolites antimicrobiens produits par ces probiotiques (Reid *et al.*, 2003) sont de approches alternatives qui serviront à compléter ou à remplacer l'utilisation des antibiotiques conventionnels.

1.2. QUE SONT LES PROBIOTIQUES ?

Le microbiote intestinal humain est constitué de milliards de bactéries dont l'environnement naturel est l'intestin. Ces bactéries assurent la protection du tractus gastro-intestinal et le maintien de la santé. Les micro-organismes ont un contact privilégié avec les aliments ingérés et les cellules de l'intestin. En fait, les bactéries intestinales signalent à l'hôte toute intrusion d'agents envahisseurs et participent au développement du système immunitaire intestinal ("Gut Associated Lymphoid Tissue"). Ces bactéries résidentes produisent des nutriments en dégradant les aliments ingérés, synthétisent des molécules antimicrobiennes qui éliminent les pathogènes humains et contribuent à maintenir le système immunitaire en alerte. Le résultat de ces interactions est en général bénéfique. Le déséquilibre de l'homéostasie entre les bactéries et les cellules eucaryotes de l'hôte peut par contre entraîner différents problèmes comme les allergies, une sensibilité accrue aux infections ou encore des maladies inflammatoires intestinales. Il est donc important de s'intéresser à l'étude du microbiote intestinal d'individus sains, mais il est tout aussi primordial de le comparer avec l'écosystème d'individus atteints de diverses pathologies qui peuvent découler de son dérèglement ainsi qu'aux apports bénéfiques potentiels de différentes bactéries inoffensives.

1.2.1. Historique des probiotiques

La possibilité que la consommation de bactéries inoffensives exerce des effets bénéfiques pour l'être humain a été postulée d'abord en 1906, puis en 1907, respectivement par le pédiatre français **Henry Tissier** et par le récipiendaire d'un prix Nobel de physiologie et médecine, **Elie Metchnikoff** (1845-1916). Tissier a d'abord observé un nombre réduit de bactéries caractérisées par une forme de Y (plus tard identifiées comme étant des bifidobactéries) dans les fèces d'enfants souffrant de diarrhées. Il a alors suggéré que l'administration de ce type de bactéries aux patients souffrant de diarrhées pourrait rétablir une flore intestinale saine et enrayer leurs symptômes. Au même moment, Metchnikoff suggérait que l'ingestion quotidienne de yogourt, un produit laitier fermenté par une espèce de lactobacilles (aujourd'hui connue

sous le nom de *Lactobacillus bulgaricus*) par les paysans bulgares, était la raison de leur grande longévité. Selon lui, la principale cause du vieillissement était les substances putréfiantes produites par certaines bactéries de l'intestin. La consommation de produits fermentés pouvait alors aider à remplacer ces bactéries nocives de l'intestin par les bactéries ingérées et ainsi diminuer la génération de ces toxines et ralentir le processus de vieillissement.

Plus tard, dans les années 1930, un microbiologiste japonais du nom de **Minoru Shirota** (1899-1982) a émis l'hypothèse selon laquelle il était possible de prévenir l'apparition de plusieurs maladies simplement en maintenant une flore microbienne entérique optimale. Le Dr Shirota est le fondateur de Yakult, une multinationale japonaise de fabrication et de distribution de probiotiques, mais aussi un centre de recherche reconnu mondialement pour ses percées majeures dans la compréhension des mécanismes des probiotiques. Une souche de probiotique porte d'ailleurs son nom, *Lactobacillus casei* souche Shirota. Cette souche est maintenant reconnue pour ses vertus anti-cancer de la vessie et du colon (Takahashi *et al.*, 2001; Yamazaki *et al.*, 2000), sa capacité à stimuler l'immunité à médiation cellulaire (Yasui *et al.*, 1999) et son fort potentiel à prévenir et soulager diverses infections bactériennes et virales (De Waard *et al.*, 2003).

Malgré les efforts de ces pionniers et l'intérêt porté à leurs travaux, la recherche sur les effets bénéfiques des bactéries lactiques a été latente durant la majeure partie du 20^{ème} siècle. Les résultats obtenus dans les premières études étaient inconstants et les effets bénéfiques associés à la consommation de bactéries inoffensives demeuraient anecdotiques. Ce n'est qu'en 1985 que l'intérêt de la communauté scientifique s'est manifesté de nouveau et que les recherches ont repris plus activement que jamais lorsque les Drs **Sherwood L. Gorbach** et **Barry Goldin** isolèrent le *Lactobacillus rhamnosus* GG dans des fèces humaines et démontrèrent ses capacités comme probiotique (Gorbach *et al.*, 1987). Plusieurs études ont démontré que cette souche probiotique est capable de résister au pH gastrique et aux sels biliaires, de coloniser l'intestin humain et produirait une substance antimicrobienne encore inconnue à ce jour. Cependant, cette dernière

caractéristique est fortement remise en doute puisqu'une seule publication a mis en évidence l'implication d'une molécule antimicrobienne autre que l'acide lactique (Silva *et al.*, 1987). De nombreuses autres publications scientifiques de qualité ont démontré les vertus probiotiques de cette souche bien particulière.

1.2.2. Définition du terme probiotique

Le terme « probiotique » est composé des racines grecques *pro* et *bios* qui signifient *pour la vie*. Le terme est contraire à « antibiotique », qui signifie *contre la vie*, plus spécifiquement contre la croissance et le développement de bactéries pathogènes. La consommation de bactéries probiotiques procure des effets positifs sur la santé.

L'historique du terme **probiotique** a été retracé par Schrezenmeir et de Vrese (2001). En fait, l'appellation probiotique a été utilisée pour la première fois par Lilly et Stilwell en 1965. Ce mot était alors défini comme "une substance sécrétée par un organisme qui stimule la croissance d'un autre". Cette définition ne mettait donc pas en évidence les bactéries comme agents permettant la régulation ou le maintien d'une flore bactérienne saine. En 1971, Sperti et Parker ont été les premiers à introduire le terme probiotique tel qu'il est défini aujourd'hui. La définition faisait référence à "des organismes et des substances qui contribuent à la balance microbienne intestinale". Dans ces deux définitions, le mot substance pouvait donc inclure les antibiotiques, qui ne sont évidemment pas des probiotiques. Ce n'est qu'en 1989 que Roy Fuller énonça une définition du mot probiotique ciblant précisément les bactéries consommées comme supplément: "un supplément alimentaire constitué de micro-organismes vivants qui affectent bénéfiquement l'hôte animal par l'amélioration de son microbiote intestinal". En 1992, Havengaer et Huis In't Held élargirent la définition en incluant l'hôte et l'habitat du microbiote: "une culture simple ou mixte de micro-organismes qui, lorsque appliquée à un animal ou à l'humain, affecte de façon bénéfique le microbiote intestinal indigène". La définition la plus largement acceptée par la communauté scientifique est la suivante:

PROBIOTIQUE (FAO, 2001): Micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte. Cette définition ne se limite pas aux seules bactéries comme agent probiotique, mais inclue tous les microorganismes, dont les levures. De plus, elle spécifie que les microorganismes contenus dans les suppléments alimentaires doivent être viables, de façon à pouvoir exercer leurs effets bénéfiques.

Les **probiotiques** sont différenciés des **prébiotiques** et des **synbiotiques**.

PRÉBIOTIQUE (Schrezenmeir et de Vrese, 2001): Substances alimentaires qui modifient favorablement le microbiote intestinal. Il s'agit en général d'aliments non-digestibles qui affectent l'hôte positivement en favorisant la croissance ou l'activité de certaines bactéries présentes dans le côlon, particulièrement les Bifidobactéries. Les prébiotiques sont des oligosaccharides non-digestibles, tels les fructo-oligosaccharides (FOS), le lactulose et les trans-galacto-oligosaccharides (GOS).

SYNBIOTIQUE (Schrezenmeir et de Vrese, 2001): Combinaison d'un probiotique avec des prébiotiques. La viabilité des probiotiques est augmentée lorsque mélangé avec un prébiotique spécifique. Ce dernier apporterait une protection durant le transit gastro-intestinal, faciliterait la colonisation et la croissance du probiotique dans l'intestin.

1.2.3. Caractéristiques d'un probiotique

Comme exposé précédemment, la définition du terme probiotique a grandement évolué au cours des dernières années. La plupart des articles scientifiques les décrivent comme un supplément nutritionnel composé de microorganismes vivants exerçant des effets bénéfiques pour le maintien de la santé. Cependant, certains auteurs ont modifié cette définition et c'est pour cette raison qu'un regroupement de chercheurs spécialisés dans le domaine des probiotiques a tenté d'établir un consensus sur des critères de sélection plus précis (Tuomola *et al.*, 2001; FAO/WHO, 2001; FAO/WHO, 2002). Afin

qu'un micro-organisme soit considéré comme probiotique, idéalement celui-ci doit remplir plusieurs conditions telles que :

Origine (composantes d'un microbiote intestinal sain de préférence d'origine humaine)

Biosécurité (sans effets négatifs pour les humains, transfert génétique, résistance aux antibiotiques)

Actif et viable (activité dans des conditions intestinales; survie aux conditions de fabrication et d'entreposage)

Résistance à pH acide, aux sucs gastriques et pancréatiques ainsi qu'à la bile

Adhérence à l'épithélium et au mucus intestinal

Effets bénéfiques pour l'hôte (Antagonisme microbien, modulation du système immunitaire, autre)

Plusieurs espèces de bactéries ou levures sont considérées comme étant probiotiques. Malgré cette grande diversité, ce sont les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* qui sont les plus étudiés. Ils font partie du groupe hétérogène des bactéries lactiques (BAL) dont la production d'acide lactique est le produit final principal de leur métabolisme (Prescott *et al.*, 2003). Ce sont des bactéries présentes naturellement dans plusieurs environnements, particulièrement dans les produits laitiers et les intestins animaux. Les bifidobactéries sont d'ailleurs très présentes dans le côlon chez l'humain, alors que les lactobacilles sont disposées tout au long du tractus gastro-intestinal. En général, les lactobacilles sont des bactéries en forme de bâtonnet, Gram+ et microaérophiles. Elles ont une température optimale de croissance entre 35 à 45°C. Elles sont souvent regroupées en chaîne, mais certaines souches peuvent aussi former d'importants agrégats, sans structure constante.

Lorsque certaines souches de BAL fermentent le lait dans des conditions précises, elles peuvent hydrolyser les nombreuses protéines de caséine et de lactosérum en

peptides possédant des propriétés sur la santé humaine. Par exemple, ces peptides bioactifs peuvent avoir une activité antithrombotique, immunomodulatrice, antimicrobienne, antihypertensive et ils soulageraient même la douleur (Shah, 2000; LeBlanc *et al.*, 2004). De plus, certaines souches peuvent produire des polysaccharides extracellulaires, appelés exopolysaccharides, qui pourraient, dans certains cas, être responsables des effets bénéfiques des BAL (Sengul *et al.*, 2005; Vinderola *et al.*, 2006). En plus des composantes de la paroi bactérienne (peptidoglycane, lipopolysaccharide) qui auraient un impact certain sur le système immunitaire de l'hôte (Granette *et al.*, 2005), le contenu cytoplasmique de certains probiotiques tel que des oligodésoxynucléotides spécifiques ou des dinucléotides CpG peuvent aussi induire une réponse immune via l'activation des *Toll-like receptor* 9 à la surface des cellules intestinales (Hemmi *et al.*, 2000; Shimosato *et al.*, 2005). Les probiotiques peuvent aussi produire des enzymes (Splechtna *et al.*, 2006) qui assurent des bénéfices pour la santé de l'hôte. La lactase (EC 3.2.1.108) est une enzyme synthétisée par de nombreuses BAL et serait impliquée dans le soulagement des symptômes associés à l'intolérance au lactose (de Vrese *et al.*, 2001) (voir section 1.4.9 pour plus de détails). Certaines bactéries du microbiote intestinal humain ont la capacité de déconjuguer les sels biliaires par l'action d'hydrolases des sels biliaires [(HSB) cholylglycine hydrolase, EC 3.5.1.24] qui hydrolyse le lien amide libérant ainsi le résidu glycine ou taurine du noyau stéroïde (Begley *et al.*, 2006). Cette capacité permettrait de détoxifier les sels biliaires ce qui augmenterait la survie et la persistance intestinale des souches productrices les rendant ainsi plus robustes face aux conditions extrêmes régnant dans le tractus gastro-intestinal. De plus, quelques travaux de recherche ont permis de démontrer l'habileté de ces souches productrices de HSB à réduire les concentrations de cholestérol sérique chez des porcs (De Smet *et al.*, 1998) ou des rats hypercholestérolémiques (Usman et Hosono, 2001). Cependant, aucune étude clinique réalisée sur des humains n'a permis de démontrer l'effet hypocholestérolémiant de souches productrices de HSB. Finalement, les probiotiques peuvent produire de nombreuses substances antimicrobiennes (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, bactériocines) qui ont la capacité de prévenir des infections intestinales (Lee *et al.*, 2003) (voir sections 1.4.1 et 1.4.2 pour plus de détails). Le Tableau 1.1 résume les principales espèces de micro-organismes utilisées comme probiotique.

Tableau 1.1. Principaux micro-organismes utilisés comme agents probiotiques.

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	Autre
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Escherichia coli</i> souche Nissle
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. johnsonii</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. paracasei</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. plantarum</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. reuteri</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. rhamnosus</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
		<i>Sporolactobacillus inulinus</i>

Adapté de Lee *et al.* (1999) et de Ouwehand *et al.* (2002)

1.2.4. Les bactéries lactiques

Le terme bactérie lactique (BAL) désigne un ensemble de bactéries Gram + ayant en commun la production d'acide lactique comme métabolite final de la fermentation des sucres. Les BAL sont des microorganismes procaryotes, hétérotrophes et chimioorganotrophes. Elles sont généralement immobiles, asporulées et ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio *et al.*, 1994). Comme elles ne possèdent pas de cytochrome, ces bactéries ne tirent pas leur énergie de la respiration, mais plutôt par phosphorylation du substrat au cours de la fermentation des sucres. Leur croissance dépend donc de la fermentation de ces sucres et il est possible de classer les BAL suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides. En effet, les bactéries homolactiques strictes produisent uniquement de l'acide lactique en suivant la voie d'Embden-Meyerhof, alors que les

bactéries hétérolactiques peuvent produire de l'acide acétique, de l'éthanol et du dioxyde de carbone en plus de l'acide lactique suivant la voie des pentoses phosphates (Prescott *et al.*, 2003). Onze genres bactériens figurent dans la catégorie des BAL : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des BAL typiques, mais leur usage est de plus en plus répandu dans l'industrie laitière.

Les BAL jouent un rôle important dans la majorité des fermentations alimentaires (Nettles et Barefoot, 1993) et de nombreuses souches sont quotidiennement utilisées comme ferments autant dans l'industrie laitière, des produits carnés, du conditionnement des légumes et des produits de boulangeries. Seuls les cinq genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont communément propagés dans les salles à ferments des industries laitières ou employés dans la fermentation lactique des produits laitiers en Amérique du Nord (Champagne, 1998). Le rôle principal des BAL est la production d'acide lactique qui influence la texture, le goût et la qualité microbiologique des produits ainsi fermentés. L'abaissement du pH limite aussi la croissance des bactéries indésirables ce qui permet d'augmenter la durée de vie des aliments (Abee *et al.*, 1995). Outre les acides organiques, de nombreux autres métabolites sécrétés par les BAL ont une influence sur la qualité organoleptique des aliments. Ceux-ci incluent les bactériocines, les diacétyles et le peroxyde d'hydrogène (Nettles et Barefoot, 1993).

Les BAL tolèrent de petites quantités d'oxygène, mais de trop grandes teneurs peuvent leur être néfastes. Ceci est probablement relié au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est produit dans les cellules en présence d'air. Le H_2O_2 doit être éliminé car son accumulation devient toxique pour les microorganismes producteurs. Le système enzymatique le plus efficace d'élimination de H_2O_2 est la catalase dont les BAL sont déficientes. Les BAL possèdent plutôt une peroxydase, moins efficace que la catalase. Ainsi, comme les BAL n'éliminent pas facilement le H_2O_2 , elles sont considérées comme micro-aérophiles. Les BAL aromatisantes telle que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

biovar. *diacetylactis* produisent des composés aromatiques qui contribuent au goût des produits frais et à la production de CO₂ responsable des fissures dans certains types de fromage. Enfin, quelques BAL produisent des exopolysaccharides (EPS) qui influencent l'aspect et la texture des produits fermentés (Welman et Maddox, 2003).

Étant donné l'abondance et la variété des genres et espèces appartenant au groupe des BAL, seulement les deux genres bactériens (*Lactococcus* sp. et *Pediococcus* sp.) qui font l'objet d'une découverte aux chapitres 4, 5 et 6 de cette thèse seront présentés plus en détails dans cette revue de littérature.

1.2.4.1. Les lactocoques

Les lactocoques se retrouvent principalement dans les laits et crèmes fermentés ainsi que dans les fromages où ils sont majoritaires et dans lesquels ils jouent un rôle fondamental en contribuant à la structure et au goût et en assurant la conservation et la salubrité des produits. Le genre *Lactococcus* spp. fait partie de la classe des Bacilli, de l'ordre des Lactobacillales et de la famille VI des *Streptococaceae* (Prescott *et al.*, 2003). Les lactocoques se présentent sous forme de coques et forment des chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), anaérobies facultatives ou micro-aérophiles. Leur température de croissance optimale environne 30°C. Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6,5% de NaCl, ou lorsque le pH est supérieur à 9,6 (Dellaglio *et al.*, 1994). Le genre *Lactococcus* comporte trois espèces représentatives : *Lc. lactis*, *Lc. raffinolactis* et *Lc. plantarum* (Prescott *et al.*, 2003). Chacune des espèces comporte aussi des sous-espèces dont les trois types suivants sont utilisés en fabrication fromagère : *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* et *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Le type *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* possède un plasmide encodant la dégradation du citrate en diacétyle, molécule aromatique responsable de l'arôme du beurre. Les autres caractères biochimiques distinctifs sont leur capacité de croître jusqu'à 40°C, en présence de 4% de NaCl et jusqu'à un pH 9,2.

1.2.4.2. Les pédiocoques

Les pédiocoques sont, comme leur nom l'indique, des cocci. Ils sont acido-tolérants et disposés en tétrade et en paires lors de l'observation microscopique. Le genre *Pediococcus* spp. fait aussi partie de la classe des Bacilli, l'ordre des Lactobacillales mais de la famille I des *Lactobacillaceae* (Prescott *et al.*, 2003). Les *Pediococcus* sp. sont des microorganismes très utiles dans l'industrie alimentaire. *P. pentosaceus* et *P. acidilactici* sont utilisés comme ferment de départ pour les saucissons fermentés et dans l'ensilage destiné aux animaux de la ferme. Certaines souches peuvent aussi être impliquées dans l'acidification du lait entrant dans la fabrication du fromage. Cependant, les pédiocoques peuvent causer beaucoup de problèmes puisque *P. damnosus* est la principale bactérie responsable de la détérioration de la bière parce qu'elle produit du diacétyle et de l'acétoïne durant sa croissance ce qui donne un goût de beurre à la bière (Axelsson, 1993). Les pédiocoques sont anaérobies facultatifs, non mobiles et homofermentaires. La majorité des espèces peut croître entre 10 et 45°C et dans un milieu contenant 6,5% de NaCl.

1.3. LE MICROBIOTE INTESTINAL ET LE TISSU LYMPHOÏDE ASSOCIÉ À L'INTESTIN

Les rôles primaires du tractus gastrointestinal sont la digestion et l'absorption des nutriments afin de répondre aux besoins du métabolisme basal et de permettre la croissance et le développement corporel. De plus, la muqueuse intestinale procure une défense à l'hôte contre la présence constante d'antigènes alimentaires ou microbiens. Cette muqueuse intestinale représente l'organe ayant la plus grande superficie du corps humain, environ 400 m^2 (Elphick et Mahida, 2005), et elle est recouverte sur toute sa surface par des micro-organismes dont l'ensemble est nommé microbiote intestinal. Le microbiote intestinal fait référence à la population bactérienne diversifiée qui colonise l'intestin de l'hôte et qui n'a pas été modifié par des médicaments, une intervention chirurgicale ou une maladie. Le terme "coloniser" est utilisé pour décrire une population bactérienne bien établie dans le temps sans nécessité de réintroduire périodiquement les bactéries. L'absence de microbiote intestinal induit une diminution de l'activité digestive enzymatique, de la production locale de cytokines, de la vascularité, de l'épaisseur de la paroi musculaire, de la motilité en plus d'augmenter la demande calorique pour maintenir le poids corporel. De plus, en l'absence de ce microbiote, le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale reste rudimentaire et l'immunité cellulaire s'en retrouve diminuée (Bourlioux *et al.*, 2003). Un intestin adulte contient en moyenne entre 1-2 kg de bactéries et est recouvert d'environ 10^{14} bactéries dominé principalement par 2 ordres soit les Bacteroidetes et les Firmicutes (Ley *et al.*, 2006). Le tractus gastro-intestinal doit être considéré comme un écosystème très complexe puisqu'il n'implique pas seulement des tissus composés de cellules eucaryotes, mais il est l'arène d'interactions entre les bactéries et les nutriments apportés par la nourriture, les cellules humaines et une multitude de microbes résidents (Zoetendal *et al.*, 2006).

1.3.1. Facteurs affectant le microbiote intestinal

- **L'âge:** À la naissance, le tractus intestinal est stérile. Le tractus gastro-intestinal est par contre rapidement colonisé par des micro-organismes du col de l'utérus de la mère et de

l'environnement externe. La première espèce bactérienne à s'y implanter serait *Escherichia coli*, un anaérobe facultatif. Il a été émis que ce coliforme diminue le potentiel redox de l'intestin. Lorsque le potentiel d'oxydo-réduction est suffisamment faible, les bactéries anaérobiques, telles que les *Bifidobactéries*, commencent à s'installer dans les intestins. Les sucres N-acétylés retrouvés dans le lait maternel servent alors de nutriments pour ce genre bactérien. De fait, durant la jeune enfance, une forte concentration de *Bifidobacterium* sp. est dénombrée dans les fèces des nourrissons (Ouwehand *et al.*, 1999). Par la suite, ce nombre tend à diminuer progressivement. Une étude réalisée par He *et al.* (2001) a permis d'observer que la flore de *Bifidobacterium* chez des individus âgés possédait une plus faible capacité d'adhésion sur le mucus que la flore de sujets plus jeunes. Des études ont montré que les nouveaux-nés acquièrent leur microbiote intestinal initial par le contact avec les bactéries vaginales et fécales de la mère. Il a aussi été prouvé que les bébés nés par césarienne ont des populations bactériennes différentes (Ley *et al.*, 2006).

- **Localisation dans l'intestin:** La complexité et la quantité des bactéries présentes sur la surface mucosale de l'intestin augmentent tout au long du tractus gastro-intestinal (Shanahan, 2002). Les densités bactériennes retrouvées dans le duodénum et le jéjunum sont assez faibles (**Figure 1.2**). En fait, il n'y a pas plus de 10^4 bactéries/g dans l'estomac à cause de la forte acidité produite. Par contre, dans l'iléon, les lactobacilles dominent une flore totale d'environ 10^6 bactéries/g. Les mouvements péristaltiques lents et le long transit (jusqu'à 68 heures) pour traverser le colon classent ce dernier comme étant le plus gros réservoir bactérien de tout le corps humain. En effet, il est possible de retrouver plus de 400 espèces différentes de bactéries dans cette partie de l'intestin pour un dénombrement total d'environ 10^{11} - 10^{12} bactéries/g de contenu. Les espèces les plus abondantes du colon sont les *Bacteroides*, les *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium* et *Peptostreptococcus* (Sillanpaa, 2001).

- **Bactéries indigènes vs transitoires:** Le microbiote intestinal est à tout moment composé de bactéries résidentes ainsi que de plusieurs micro-organismes dits « de passage » qui peuvent occuper les espaces vacants de la muqueuse. L'altération du

microbiote, par exemple par la prise d'antibiotiques, peut provoquer des effets indésirables (absorption incomplète, croissance de bactéries pathogènes, développement de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques) et même conduire à des conséquences désastreuses [diarrhées, entérocolites pseudomembraneuses et infections systémiques ou septicémie chez des sujets immunodéprimés (Hooker et DiPiro, 1988)].

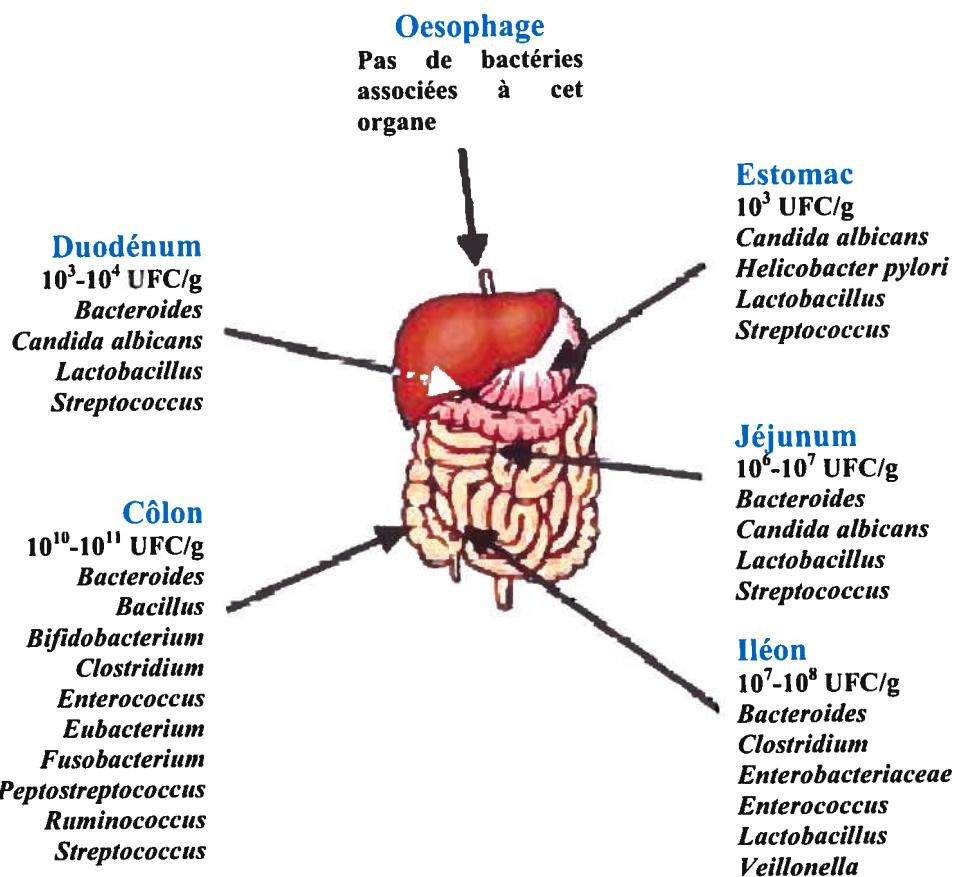


Figure 1.2. Principales espèces bactériennes du tractus gastro-intestinal humain (adapté de Isolauri *et al.* (2004)).

- La diète, l'environnement, la maladie et le stress sont d'autres facteurs ayant une influence sur la composition du microbiote intestinal.

1.3.2. Importance du microbiote intestinal

Les bactéries du microbiote intestinal sont responsables de plusieurs fonctions métaboliques importantes et bénéfiques. Elles sont responsables de la synthèse des vitamines B et K (Conly *et al.*, 1994; Limdi *et al.*, 2006), facilitent l'absorption de plusieurs nutriments et minéraux (Heyman *et al.*, 1986), améliorent le transit intestinal (Marteau *et al.*, 2002), produisent les acides gras à chaînes courtes (Wong *et al.*, 2006), participent au développement des cellules intestinales (Meslin et Sacquet, 1984), et peuvent aussi inactiver certaines substances cancérogènes et prévenir l'apparition de certaines tumeurs (Guarner et Malagelada, 2003). De plus, le microbiote intestinal fait partie de la barrière intestinale. Cette barrière est composée par plusieurs mécanismes susceptibles de diminuer l'absorption d'antigènes microbiens potentiellement pathogènes. Ces mécanismes impliquent la capacité des enzymes digestifs à dégrader les antigènes intestinaux, une barrière physique formée d'entérocytes fermement reliés par des jonctions serrées et enrobés d'une couche mucoïde parsemée d'IgA sécrétoires. La production de mucus par les cellules gobelet est un autre moyen de défense de la surface mucosale face aux agents pathogènes (Liévin-Le Moal et Servin, 2006). Le péristaltisme intestinal assure l'évacuation continue du mucus et le remplacement microbien.

D'un point de vue métabolique, le côlon représente l'organe le plus actif du corps avec le foie (Isolauri *et al.*, 2004), en plus d'être le site où la concentration de cellules immunitaires est la plus importante (Shi et Walker, 2004) et qui est entouré d'une grande quantité de cellules nerveuses (Furness *et al.*, 1999). Le microbiote intestinal doit donc se développer en véritable symbiose avec les réactions immunitaires de l'hôte, afin que l'ensemble demeure équilibré. La perte de cette homéostasie peut agir conjointement avec différents facteurs de risques environnementaux ou génétiques et entraîner des pathologies autoimmunes (Tannock, 2002). La manipulation du microbiote intestinal et de ses interactions avec les cellules de l'hôte par l'alimentation devient alors une avenue intéressante pour contribuer au bien-être des gens et possiblement pour prévenir ou aider à contrôler les symptômes associés aux maladies autoimmunes (Sougoultzis *et al.*,

2006). La **Figure 1.3** résume bien l’implication des différents genres bactériens indigènes du tractus gastro-intestinal dans la santé ou la maladie.

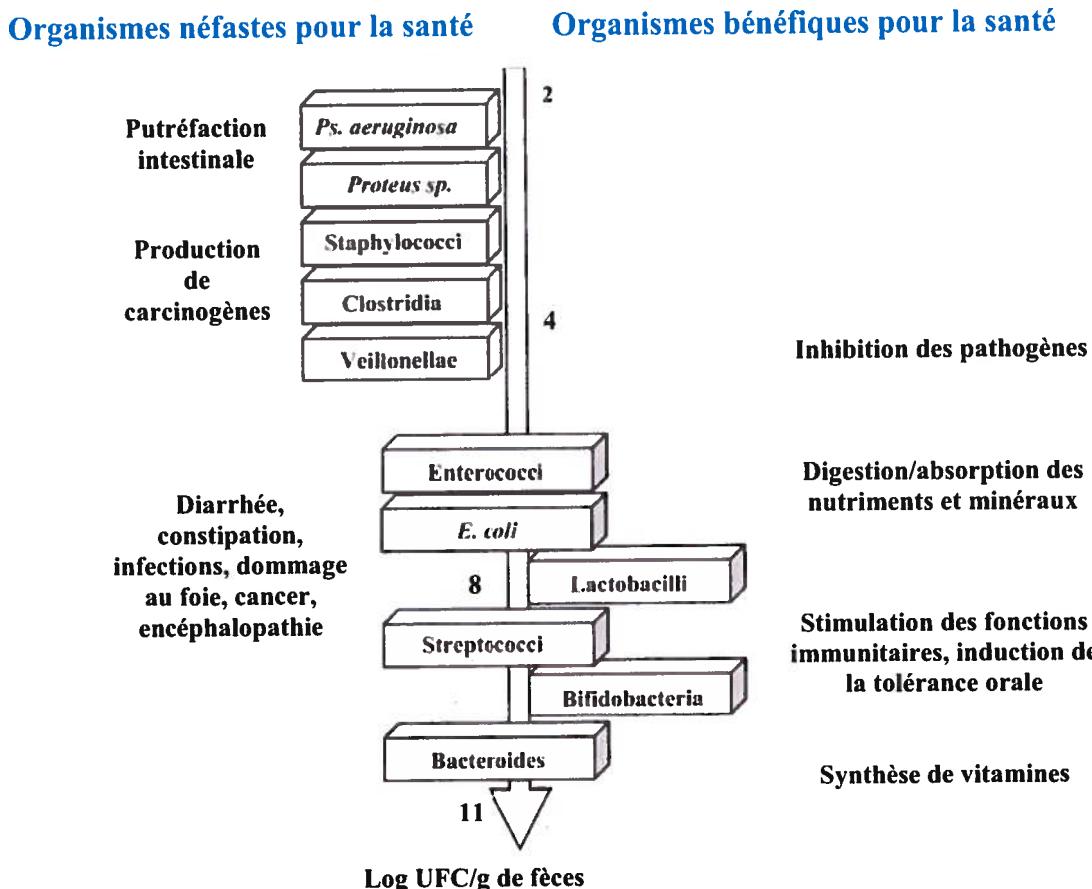


Figure 1.3. Vue d’ensemble des bactéries intestinales bénéfiques ou non pour la santé. (adapté de Rastall, 2004).

De nombreuses composantes bactériennes peuvent interagir avec les récepteurs présents sur les cellules immunitaires de l’intestin (voir section 1.4.7 pour plus de détails), et déclencher la production de marqueurs moléculaires importants dans le maintien de l’homéostasie intestinale et dans la protection des cellules épithéliales. Les cellules immunitaires de l’intestin et les bactéries sont en communication constante de manière à ce qu’il n’y ait pas de réaction inflammatoire dirigée contre des bactéries inoffensives, mais que les bactéries pathogènes soient prises en charge par le système immunitaire. Les aliments ingérés doivent aussi être tolérés par le système immunitaire;

ce phénomène est appelé tolérance orale. Ces réalités entraînent un état de constante inflammation au niveau de l'intestin, mais il s'agit d'un phénomène physiologique normal hautement contrôlé. Une réponse déréglée de l'homéostasie intestinale contre les bactéries résidentes ou une interaction inadéquate due à des facteurs génétiques ou environnementaux peut entraîner une inflammation incontrôlée au niveau du tractus gastro-intestinal, ce qui provoquera des maladies inflammatoires de l'intestin, des allergies (perte de tolérance orale) et d'autres maladies auto-immunes (Moreau et Corthier, 1988). En résumé, les bactéries du microbiote intestinal ont beaucoup plus de rôles à accomplir que de simples rôles métaboliques; elles s'avèrent en effet être protectrices et responsables de l'homéostasie intestinale.

1.3.3. Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (GALT)

La surface des muqueuses est protégée par un système immunitaire local adaptatif. Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale représente la plus imposante masse de tissu lymphoïde du corps humain; il représente donc un élément important de la capacité immunologique globale (Bauer *et al.*, 2006). Les événements de régulation de la réponse immunitaire intestinale surviennent dans des compartiments physiologiques spécifiques. Afin de parvenir à une réponse immunitaire efficace contre des agents pathogènes, la participation de toutes les cellules immunes associées à l'intestin est nécessaire. Ce processus est divisé en sites inductifs (plaques de Peyer et cellules épithéliales) où l'antigène est rencontré et dans lesquels des réponses initiales sont induites, et en sites effecteurs (lamina propria) où les plasmocytes sécréteurs d'IgA produisent des anticorps spécifiques responsables de la protection immune locale. Bien que physiquement séparés, ces sites sont fonctionnellement inter-connectés (Roitt *et al.*, 2002).

Lumière intestinale

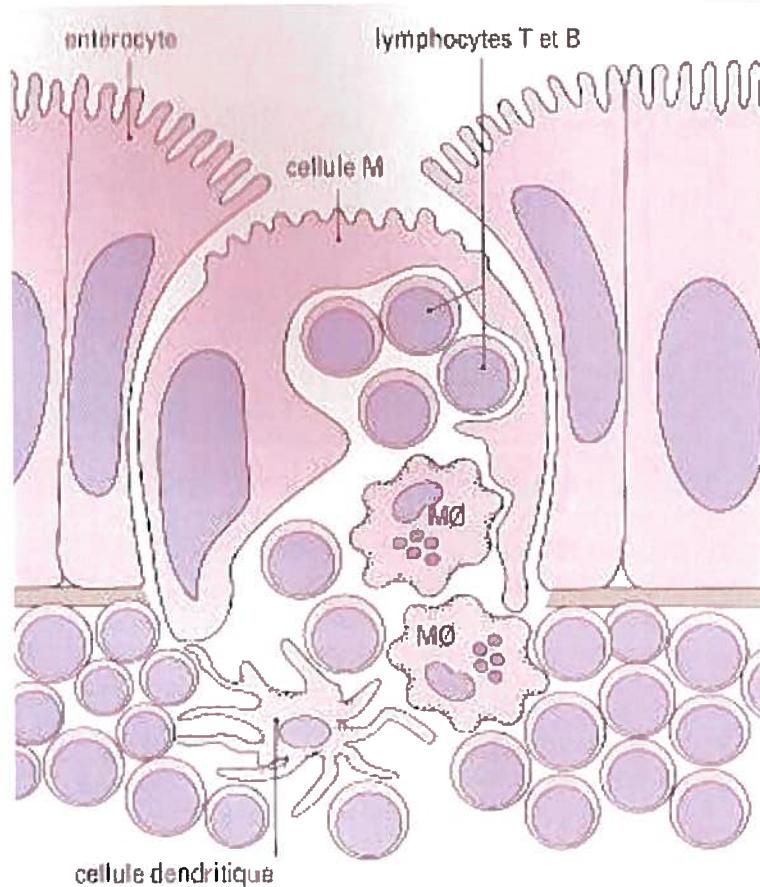


Figure 1.4. Schéma représentant le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (tiré de Roitt *et al.*, 2002). Mφ : macrophage

1.3.3.1. Les plaques de Peyer

Les **plaques de Peyer** sont situées dans la partie basse de l'iléon et sont le site d'initiation de la réponse immune mucosale s'effectue. Elles contiennent des lymphocytes B et T ainsi que des macrophages et des cellules dendritiques et sont recouvertes d'une couche épithéliale composée de cellules spécialisées dans la captation d'antigènes de toutes sortes, appelées **cellules M** (**Figure 1.4**). La fonction de ces cellules est de capter et de transférer les antigènes de la lumière intestinale vers les tissus lymphoïdes sous-jacents. Les lymphocytes B effectuent leur réarrangement génique, menant au changement isotypique des IgM en IgA, dans les plaques de Peyer. Ce

ce changement est induit par des lymphocytes CD4+ Th2. Les cellules accessoires, telles que les macrophages et les cellules dendritiques, présentes dans les plaques de Peyer sont les cellules présentatrices d'antigènes et sont impliquées dans la régulation des réponses immunes cellulaire et humorale (Perdigon *et al.*, 2001). Après la présentation des antigènes aux lymphocytes des plaques de Peyer, les lymphocytes B, CD4+ et CD8+ sont stimulés et migrent via les vaisseaux lymphatiques et les ganglions mésentériques pour atteindre la circulation systémique. Ces cellules retournent vers la lamina propria de l'intestin ainsi que vers d'autres sites tels que les muqueuses respiratoire, urogénitale et mammaire et les glandes salivaires. La conséquence de ce processus est que, suivant une stimulation antigénique du système gastro-intestinal par la voie orale, des sites distants peuvent être repeuplés en cellules productrices d'IgA et protéger les surfaces mucosales (Aldridge *et al.*, 2005). Ce phénomène est nommé le système mucosal commun (**Figure 1.5**).

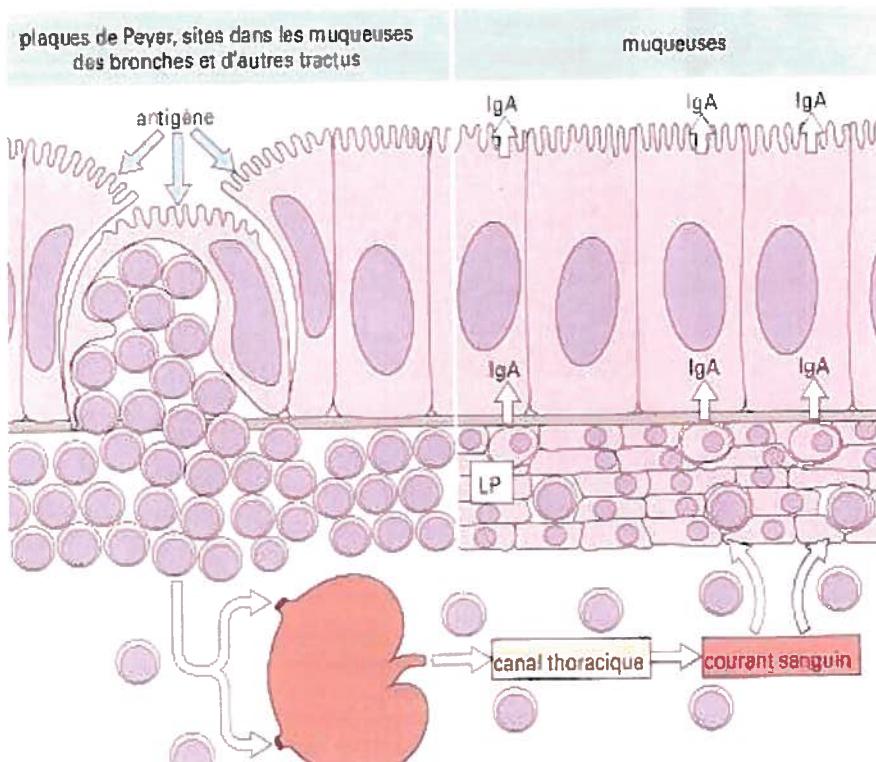


Figure 1.5. Circulation des lymphocytes dans le système lymphoïde des muqueuses (tiré de Roitt *et al.*, 2002). LP : lamina propria.

1.3.3.2. Les cellules épithéliales intestinales et les lymphocytes intra-épithéliaux

Des études récentes ont démontré que les **cellules épithéliales intestinales** sont très impliquées dans le système immunitaire mucosal puisqu'elles sont les premières à être en contact avec les antigènes et les bactéries. Leur rôle dans les processus d'absorption et d'excrétion est bien connu depuis longtemps (Bjarnason, 1994). Cependant, plusieurs travaux ont montré que les cellules épithéliales pouvaient être considérées comme des cellules présentatrices d'antigène. Ces cellules expriment les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II (Mayer *et al.*, 1991), le CD1d (Colgan *et al.*, 1999), des molécules d'adhésion (ICAM-1) et des récepteurs aux cytokines (Reinecker et Podolsky, 1995; Vainer *et al.*, 2006). Elles peuvent également sécréter plusieurs cytokines telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , l'interleukine(IL)-1 β , l'IL-6, l'IL-8, le facteur transformant de croissance (TGF)- β , l'oxyde nitrique (NO), le facteur de croissance de colonies granulocytaires-macrophagiques (GM-CSF) et les prostaglandines (PG) (Jung *et al.*, 1995; Eckmann *et al.*, 1997; Mayer, 2000). Lorsqu'un antigène interagit avec les cellules épithéliales, il est endocyté, partiellement dégradé et présenté aux cellules du système immunitaire du tissu épithelial associé à la muqueuse intestinale. À ce moment, il peut y avoir une réponse immunitaire humorale qui consiste principalement en la sécrétion d'IgA, qui retraverse alors l'épithélium pour prévenir l'entrée des microorganismes ciblés. De plus, les cellules épithéliales peuvent sécréter des substances antimicrobiennes telles les cathélécidines et les défensines qui induisent la formation de pores et interfèrent avec le métabolisme bactérien. Les défensines régulent aussi immunité antimicrobienne innée et adaptative. Ces molécules peuvent stimuler la phagocytose, promouvoir le recrutement des neutrophiles, augmenter la production de cytokines pro-inflammatoires et supprimer les médiateurs anti-inflammatoires tout en régulant l'activation du complément (Oswald, 2006). Ces substances expriment une activité chémotactique pour les lymphocytes T, servant ainsi de lien entre l'immunité innée et acquise. Bien que leur activité régulatrice, suite au contact avec des micro-organismes entéropathogènes, soit bien documentée, leur

rôle dans le maintien de l'homéostasie en présence du microbiote intestinal indigène demeure peu connu (Agerbeth et Gudmundsson, 2006).

La membrane plasmatische baso-latérale des cellules M comporte de profondes invaginations dans lesquelles sont logés les **lymphocytes B et T intra-épithéliaux**, les cellules dendritiques et des macrophages. Les lymphocytes intra-épithéliaux intestinaux serviraient à la surveillance des cellules mutées ou infectées par un virus (Roitt *et al.*, 2002). Ils peuvent aussi reconnaître certains antigènes. De plus, la migration des lymphocytes dans le compartiment épithelial semble être dépendante de l'expression de molécules dites d'écotaxie présentes sur les lymphocytes et qui les dirige sélectivement vers des organes particuliers. Dans l'intestin, les intégrines $\alpha_4\beta_7$ assurent l'adhérence aux veinules des plaques de Peyer des lymphocytes qui expriment MadCAM-1. Ensuite, les lymphocytes peuvent migrer dans la circulation systémique (Roitt *et al.*, 2002). Aussi, la fonction des cellules épithéliales intestinales peut être modifiée par les lymphocytes intra-épithéliaux stimulés.

1.3.3.3. La lamina propria

La lamina propria est un site effecteur contenant des lymphocytes B et T, provenant de la migration des lymphocytes stimulés dans les plaques de Peyer, ainsi que des macrophages, des neutrophiles, des éosinophiles et des mastocytes (Perdigon *et al.*, 2001). La population de lymphocytes T dans la lamina propria est représentée par une large proportion de cellules mémoires. Les cellules T CD4+ sont généralement de type Th2 produisant surtout les IL-4 et IL-5, favorisant ainsi la sécrétion d'IgA. La maturation finale des cellules B sécrétrices d'IgA en plasmocytes est complétée dans la lamina propria. De 2 à 5 g d'IgA seraient produits quotidiennement (Elphick et Mahida, 2005). Les IgA entrent dans les entérocytes par endocytose et sont transportés à travers l'épithélium grâce au composé sécrétoire, synthétisé par les cellules épithéliales, pour atteindre la lumière intestinale et protéger les surfaces mucosales. Le composé sécrétoire est notamment responsable de la résistance des IgA aux sécrétions gastriques, aux acides gras, aux acides biliaires et à la protéolyse (Brandtzaeg, 2003). Les IgA peuvent aussi

agir au niveau intra-épithélial pour neutraliser les virus infectant des cellules (Mazanec *et al.*, 1995). Niess *et al.* (2005) ont montré que les cellules dendritiques retrouvées dans la lamina propria forment des dendrites transépithéliales qui sont capables de capter directement les antigènes dans la lumière intestinale ce qui stimulera l'immunité innée et protégera la muqueuse.

Finalement, l'homéostasie immunitaire intestinale est régulée par les lymphocytes auxiliaires Th1 (immunité innée) et les Th2 (immunité acquise). La stimulation des cellules Th1 mène à un état inflammatoire, alors que les Th2 sont responsables de la production d'anticorps en réponse aux antigènes. L'équilibre Th1/Th2 doit être conservé afin que l'intestin demeure en état d'homéostasie. Les cellules Th3, cellules T régulatrices, sont impliquées dans la tolérance orale. Cependant, elles pourraient aussi moduler le développement de maladies autoimmunes (Shi et Walker, 2004). Une surproduction de cytokines par les lymphocytes Th1 tels IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ou TNF- α semble être associée à des pathologies comme les maladies inflammatoires de l'intestin. Tous ces messagers attirent les polymorphonucléaires (PMNs) et ensuite les macrophages, qui amplifient le processus. En contrepartie, les principales cytokines anti-inflammatoires sont l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- β , principalement produites par les cellules Th2 et les T régulatrices (Rogler et Andus, 1998). Une catégorie de récepteurs membranaires (situés à la surface des macrophages, des cellules dendritiques et les cellules épithéliales de diverses muqueuses) appelés « Toll-like receptor (TLR) » est impliquée dans la reconnaissance des composantes bactériennes (indigènes ou non). Par exemple, l'activation des TLR par un constituant microbien peut entraîner la production de peptides antimicrobiens, fortifier la barrière intestinale et augmenter la prolifération des cellules épithéliales. La signalisation des TLR est aussi essentielle pour le processus de régénération des tissus (Abreu *et al.*, 2005).

1.4. BÉNÉFICES ET APPLICATIONS DES PROBIOTIQUES

1.4.1. Bénéfices des probiotiques pour l'hôte

Voici une liste non exhaustive des effets bénéfiques procurés aux humains ou aux animaux ayant consommé des probiotiques (El-Nezami et Ahokas, 1998; Lee *et al.*, 1999; Ouwehand *et al.*, 2002; Ouwehand *et al.*, 2003; Drisko *et al.*, 2003) :

- Interférence, exclusion et antagonisme contre les micro-organismes pathogènes;
- Protection contre les ulcères gastriques par l'action anti-*Helicobacter pylori*;
- Détoxification des aflatoxines produites par *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*;
- Modulation du microbiote intestinal;
- Amélioration de la fonction de la muqueuse intestinale;
- Diminution de l'incidence et la durée des diarrhées;
- Soulagement des symptômes associés aux maladies inflammatoires de l'intestin;
- Immunomodulation (allergies/eczéma, inflammation/arthrite);
- Activité anti-cancérogène et anti-mutagène;
- Soulagement des symptômes associés à l'intolérance au lactose;
- Prévention des vaginoses, vaginites et des infections urinaires;
- Amélioration de l'équilibre lipidique;

Les effets bénéfiques allégués pour la santé de l'hôte et procurés par la consommation de probiotiques seront discutés en détail plus loin dans cette revue de littérature.

Afin de procurer des effets bénéfiques maximaux et des risques minimaux, des doses précises, le mode d'ingestion (culture fraîche ou lyophilisée) ainsi que la fréquence des «traitements», doivent être déterminées. Selon plusieurs chercheurs, les doses ingérées devraient se situer aux alentours de 10^9 bactéries par jour (Ouwehand *et al.*, 2002). Cependant, la concentration minimale de probiotiques requise, le meilleur moment de consommation et les réponses doses-effets sont des sujets très peu documentés et il existe beaucoup de disparités entourant ces points pourtant très importants. Par exemple,

le *Fermented Milks and Lactic Acid Bacteria Beverages Association* du Japon stipule qu'un produit doit contenir $\geq 1 \times 10^7$ UFC/g ou ml de Bifidobactéries pour être considéré comme probiotique (Stanton *et al.*, 2001), ce qui est en concordance avec les recommandations du *Food and Agriculture Organization of the United States* (FAO). Cependant, Lee *et al.* (1995) proposait plutôt une dose minimale de 1×10^5 UFC/g de bifidobactéries.

1.4.2. Risques et effets secondaires associés à la consommation de probiotiques

La majorité des BAL sont utilisées depuis très longtemps dans divers procédés alimentaires et possèdent une longue histoire de consommation humaine (Ishibashi et Yamazaki, 2001). Les BAL et les probiotiques ne sont donc pas considérés comme étant des organismes pathogènes (pas même opportunistes) ou dangereux et le statut « GRAS » (Generally Recognized As Safe) leur est conféré, ce qui signifie donc que les risques associés à leur consommation sont très faibles (Feord, 2002). Cependant, quelques souches de BAL ont été isolées d'endocardites, de bactériémies et d'infections locales (Aguirre et Collins, 1993; Ishibashi et Yamazaki, 2001). La possibilité de translocation bactérienne, processus par lequel les micro-organismes traversent le tractus gastro-intestinal vers d'autres parties du corps, comme les nodules lymphatiques, le sang, le foie, les reins ou la rate, semble entraîner des effets néfastes pour la santé. La translocation bactérienne peut entraîner une infection et une perte de fonction des organes atteints. S'il y a perte d'intégrité au niveau de l'épithélium cutané ou intestinal découlant d'une blessure, d'un cancer ou d'une anomalie provoquée par un agent toxique, n'importe quelle bactérie présente dans le l'intestin peut atteindre le sang ou certains organes et entraîner des effets néfastes (Ishibashi et Yamazaki, 2001). La crainte est qu'une consommation excessive de probiotiques accentue ce phénomène et en aggrave les conséquences. Cependant, malgré les milliards de doses de probiotiques consommés annuellement à travers le monde, les complications observées sont extrêmement rares et ne semblent se produire que dans des cas particuliers, surtout chez des patients âgés, les individus immunodéprimés ou les gens ayant de graves problèmes intestinaux. Cassone *et al.* (2003) rapportent une épidémie de *Saccharomyces boulardii* dans l'unité des soins

intensifs d'un centre hospitalier secondaire (400 lits) de Rome, Italie. Cette épidémie a affecté trois patients qui n'avaient pas reçu de *S. boulardii* et l'infection aurait été transmise par le site d'insertion d'un cathéter. Les auteurs ont également signalé plusieurs autres cas documentés de septicémie par ce microorganisme. Toutefois, une conclusion semble faire de plus en plus l'unanimité dans le domaine des probiotiques: les probiotiques ne devraient pas être administrés directement pour des maladies sévères ou chez des individus fortement immunodéprimés comme dans le cas de lésions intestinales, en raison du risque accru de translocation bactérienne. Le suivi par des médecins spécialistes devrait être réalisé dans ces cas afin de pouvoir réagir rapidement aux complications (Tamboli *et al.*, 2003).

1.4.3. Marché des produits probiotiques

Les yogourts et laits fermentés probiotiques représentent le secteur le plus actif dans la catégorie des aliments fonctionnels en Europe avec des ventes de 889US\$ millions en 1997. Le marché Japonais est difficile à évaluer à cause du manque de distinctions entre le secteur des aliments santé et des aliments fonctionnels, mais un chiffre de 3.3-5US\$ milliards est tout de même avancé. Le marché Nord-américain est bien en dessous de ces valeurs, mais les produits laitiers enrichis en probiotiques gagnent en popularité (Chandan, 1999). Il est même prévu que la croissance du marché des aliments fonctionnels sera supérieure aux autres pays dans les années à venir lorsque la législation entourant les allégations santé sur les étiquettes des produits probiotiques sera révisée. Le marché global des aliments fonctionnels était de 6.6US\$ milliards en 1994 et de 17US\$ milliards en 2000 (Stanton *et al.*, 2001).

1.4.4. Interférence, exclusion et antagonisme contre les micro-organismes pathogènes

De nombreuses études démontrent le pouvoir antimicrobien des probiotiques contre diverses souches de bactéries pathogènes *in vitro*. Plusieurs mécanismes d'inhibition sont bien documentés dans la littérature afin d'expliquer ce phénomène

(Millette *et al.*, 2004). L'acidification de l'environnement immédiat du probiotique par la production d'**acides organiques** (acides acétique, butyrique et lactique) cause une inhibition de la croissance de nombreux pathogènes (Monk *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2002; Tsukahara *et al.*, 2002). Les **bactériiocines** (des agents antimicrobiens protéiques) sont d'autres substances produites par certaines bactéries afin d'éliminer les pathogènes (Kawamoto *et al.*, 2002; Russell et Mantovani, 2002). Certaines espèces de *Lactobacillus*, de *Lactococcus* et de *Leuconostoc* produisent du **peroxyde d'hydrogène**. Ce composé est aussi reconnu comme étant un inhibiteur de plusieurs bactéries (Ocana *et al.*, 1999).

1.4.5. Les bactériiocines des bactéries Gram +

La fréquence des publications scientifiques rapportant l'identification ou la purification de nouvelles bactériiocines synthétisées par des bactéries Gram + est entrée dans une phase exponentielle au cours des dernières années. La majorité des bactériiocines connues sécrétées par des bactéries Gram + sont généralement produites par les BAL. Étant donné que ces micro-organismes sont considérés comme GRAS, leurs peptides antimicrobiens ont attiré l'attention des scientifiques au cours des 30 dernières années surtout en vue de développer des applications dans l'industrie alimentaire. De plus, puisque les bactériiocines ont habituellement un spectre d'inhibition relativement restreint par comparaison avec les antibiotiques à large spectre, elles semblent être un bon complément à l'arsenal thérapeutique utilisé pour combattre les infections bactériennes. Elles permettraient de réduire l'inhibition des bactéries non-pathogènes du microbiote intestinal en ciblant spécifiquement le pathogène, ce qui résulte en une diminution de la pression sélective provoquée par l'antibiotique (Riley et Wertz, 2002). Cependant, de nombreux obstacles ralentissent l'utilisation des bactériiocines purifiés afin de soulager des diverses infections: elles sont très sensibles aux enzymes protéolytiques et aux pH alcalins prévalant dans de nombreux fluides corporels et le phénomène de résistance apparaît tôt ou tard chez de très nombreuses bactéries.

Quelques travaux ont démontré l'efficacité des bactériocines comme agent thérapeutique dans des modèles animaux. Par exemple, Kruszewska *et al.* (2003) ont administré la mersacidine (47 mg/kg; 1×/j durant 3 jours) pour enrayer une infection nasale de SARM dans un modèle murin. Cette étude a démontré que la charge nasale de SARM était indétectable suite au traitement à la mersacidine tandis que les souris n'ayant pas reçu la bactériocine avaient $7,5 \times 10^4$ - $1,5 \times 10^5$ ufc de SARM dans leurs cavités nasales. De plus, les concentrations d'IL-1 β et de TNF α étaient nulles chez les souris traitées à la mersacidine. La microcine J25, produite par la souche *E. coli* J25, a permis de réduire de 2-3 log la quantité de *Salmonella* Newport dans le foie et la rate de souris préalablement infectées par ce pathogène. Les dosages à l'étude étaient 0,5 mg/souris/j durant 6 jours ou 0,5 mg/souris tous les 4 h durant 24 h (Lopez *et al.*, 2007). Les auteurs de cette étude ont démontré que l'activité antimicrobienne était conservée durant au moins 24 h dans le sérum et le sang de souris. Cependant, malgré ces quelques succès, l'usage thérapeutique des bactériocines semble plus prometteur pour contrer des infections cutanés, comme c'est le cas pour la mammite bovine (Twomey *et al.*, 2000), ou pour prévenir les caries dentaires (Fitzgerald *et al.*, 1986).

Le terme bactériocine a été proposé par Jacob *et al.* (1953) afin de définir les protéines antibiotiques de type colicine. Plus les connaissances sur le sujet s'accumulaient, plus la définition se précisait. Aujourd'hui, les colicines partagent plusieurs caractéristiques en commun : (1) spectre antimicrobien étroit et dirigé vers des espèces apparentées à l'espèce productrice; (2) présence d'un résidu protéique essentiel à l'activité antimicrobienne; (3) mode d'action bactéricide; (4) attachement à des récepteurs spécifiques; (5) séquences génétiques de synthèse et d'immunité des colicines situées sur un plasmide; (6) biosynthèse déclenchée par le système SOS après que la bactérie a subi un stress (Jack *et al.*, 1995). Cependant, les bactériocines des bactéries Gram + ont un spectre d'activité antimicrobien plus large que celui des colicines et sont habituellement de faible poids moléculaire. L'activité antimicrobienne est la majorité du temps provoquée par la formation de pores dans la membrane bactérienne. Cette déstabilisation provoque la fuite du potassium, du phosphate inorganique et autres ions cytoplasmiques essentiels. De plus, une dissipation des deux constituants de la force

proto-motrice, le potentiel transmembranaire et le gradient de pH, mène à un arrêt de la synthèse d'ATP chez les bactéries sensibles (Ennahar *et al.*, 1999; Bauer et Dicks, 2005). Les interactions avec les bactéries ne semblent pas reliées à la présence de récepteurs particuliers mais résulteraient plutôt d'adsorptions électrostatiques avec les acides téichoïque et lipotéichoïque à la surface des membranes bactériennes (Ennahar *et al.*, 1999). Cependant, il est maintenant connu que la nisine et la mersacidine utilisent le lipide II (voir **Figure 1.7**) comme récepteur membranaire (Brötz *et al.*, 1998; Bauer et Dicks, 2005). De plus, certaines bactériocines des bactéries Gram + auraient des résidus lipidiques ou polysaccharidiques impliqués dans l'activité antimicrobienne des molécules (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Schved *et al.*, 1993). Les bactériocines sont synthétisées sous forme de prépeptide. La molécule biologiquement active est ensuite clivée de son peptide signal. Dans certains cas, des modifications post-traductionnelles peuvent s'effectuer; c'est ce qui se produit pour les lantibiotiques. La majorité de ces bactériocines sont synthétisées à partir d'un gène localisé sur un plasmide. Par contre, certaines bactériocines comme la nisine sont codées par un transposon chromosomique (Horn *et al.*, 1991).

Les bactériocines forment un groupe hétérogène défini comme des peptides antimicrobiens, produits par certaines espèces bactériennes (dont les bactéries lactiques), qui inhibent les bactéries compétitrices (Abee *et al.*, 1995; de Vos *et al.*, 1995; Nettles et Barefoot, 1993). Les bactériocines des BAL sont des agents antimicrobiens synthétisés par plusieurs genres bactériens: *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Carnobacterium*. La bactériocine la plus connue et la plus étudiée reste sans contredit la nisine. Elle est même reconnue et acceptée par l'OMS comme agent de conservation dans l'industrie alimentaire (Zhu *et al.*, 2000). Les bactériocines sont habituellement riches en résidus cystéine en plus d'être hydrophobes (Riley et Wertz 2002). Le spectre d'inhibition de la plupart des bactériocines est habituellement assez étroit, ne s'attaquant qu'aux espèces apparentées et Gram + (Abee *et al.*, 1995; de Vos *et al.*, 1995). Elles sont généralement stables à la chaleur, ne provoquent pas de réactions allergiques et sont rapidement dégradées par les enzymes protéolytiques dans le tractus intestinal humain. Le **Tableau 1.2** résumé bien les

caractéristiques principales des trois grandes classes de bactériocines (Drider *et al.*, 2006):

Tableau 1.2. Classification des bactériocines produites par les BAL.

Classe I :	Lantibiotiques : bactériocines modifiées comportant lanthionine et β -lanthionine
	Type A : forme allongée et flexible; charge nette positive; < 4 kDa; mode d'action : dépolarisation et perforation de la membrane cytoplasmique.
	<ul style="list-style-type: none"> • Nisine A, Z, Q (<i>Lactococcus lactis</i>)* • Épidermine (<i>Staphylococcus epidermidis</i>) • Pep5 (<i>S. epidermidis</i>) • Épilancine K7 (<i>S. epidermidis</i>) • Subtiline (<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633) (Bauer et Dicks, 2005)
	Type B : forme globulaire et rigide; neutre ou chargée –; entre 1,8 et 2,1 kDa; mode d'action : inhibition enzymatique (ex : Inhibition de la synthèse du peptidoglycane, inhibition des phospholipases)
	<ul style="list-style-type: none"> • Actagardine (<i>Actinoplanes</i> sp.) • Mersacidine (<i>Bacillus</i> sp.) • Pédiocine PD-1 (<i>Pediococcus acidilactici</i> PD-1) • Plantaricine C (<i>L. plantarum</i>) (Bauer et Dicks, 2005)
Classe II :	Bactériocines non modifiées, stables à la chaleur (peptides); 30 à 60 a.a.; mode d'action : poration membranaire
	IIa : bactériocines semblables à la pédiocine; < 10 kDa; anti- <i>Listeria</i> ; séquence consensus en N-terminal (YGNGVX)
	<ul style="list-style-type: none"> • Pédiocine PA-1/AcH, A (<i>P. acidilactici</i>) (Eijsink et al., 2002) • Sakacine A et P, 674 (<i>L. sakei</i>) • Lactocine A, B, G et M (varié) • Curvacine A (<i>L. curvatus</i>) • Lactacine F (<i>L. johnsonii</i>) • Leucocine A (<i>Leuconostoc gelidum</i>) • Carnobactériocine A, BM1 et B2 (<i>Carnobacterium</i> sp.) (Allison et al., 1995)
	IIb : bactériocines nécessitant la présence de 2 peptides pour être actives
	<ul style="list-style-type: none"> • Brochocine-C (<i>Brochothrix campestris</i>) (Gao et al., 1999)
	IIc : autres bactériocines
	<ul style="list-style-type: none"> • Acidocine B (<i>L. acidophilus</i>) (Leer et al., 1995)
Classe III :	Grosses bactériocines protéiques sensibles à la chaleur (> 30 kDa)
	<ul style="list-style-type: none"> • Helvéticine J (<i>L. helveticus</i>) (Joerger et Klaenhammer, 1986)

* exemple de bactériocine (espèce bactérienne productrice de la bactériocine)

La majorité des bactériocines sécrétées par les BAL appartiennent à la classe II. Ce sont de petits peptides synthétisés comme précurseurs, stables à la chaleur, actifs dans la membrane et qui ne contiennent pas de résidus lanthionine (Zhu *et al.*, 2000).

Les bactériocines sont synthétisées par les ribosomes et possèdent une extension N-terminale non conforme à la séquence signal consensus *sec*-dépendante, mais faisant plutôt appel aux transporteurs ABC (de Vos *et al.*, 1995). Une propriété importante permettant de différencier les bactériocines est leur degré de modification intramoléculaire post-traductionnelle qui va au-delà des ponts disulfures rencontrés habituellement. Par exemple, la classe des lantibiotiques est composée de peptides biologiquement actifs comportant des acides aminés inhabituels nommés lanthionines, qui consistent en deux résidus alanine liés par un lien thioéther (Chatterjee *et al.*, 2005) (**Figure 1.6**). Ces ponts monosulfures déterminent les caractéristiques des structures polycycliques des lantibiotiques et leur position intramoléculaire a été utilisée afin de regrouper ces peptides antimicrobiens en lantibiotiques linéaire (groupe Ia) et globulaire (groupe Ib).

Encore une fois, seules les bactériocines sécrétées par *Lc. lactis* MM19 et *P. acidilactici* MM33 présentées aux chapitres 4, 5 et 6 de cette thèse seront détaillées dans les prochaines sections.

1.4.5.1. La nisine

La nisine, une bactériocine produite par certaines souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, a été découverte en Angleterre en 1928 par L.A. Rogers et sa séquence d'acides aminés contenant des lanthionines a été déterminée en 1971 par Gross et Morell (Jack *et al.*, 1995). Ces auteurs ont démontré que la déshydratation d'une sérine et d'une thréonine mène à la formation de lanthionine et de méthyllanthionine après la conjugaison avec une cystéine (Chatterjee *et al.*, 2005). Cette bactériocine a reçu l'approbation GRAS (generally recognized as safe) par la FDA et peut être utilisée comme agent antibotulisme dans les fromages pasteurisés (Chung *et al.*, 1989) ainsi que

dans les ingrédients à base d'œuf liquide (Siragusa *et al.*, 1999). Par contre, dans les autres régions du monde, l'utilisation de la nisine est beaucoup plus répandue comme agent de conservation alimentaire, par exemple dans les sauces et vinaigrettes pour salade (Modi *et al.*, 2000) ou encore dans les boîtes de conserve (Choi *et al.*, 2000). De plus, la nisine est stable à la température du réfrigérateur, ce qui constitue un avantage supplémentaire pour son utilisation dans la protection des viandes (Cutter et Siragusa, 1998). Par contre, il semble que la nisine soit relativement insoluble et instable lorsque le pH est supérieur à 5, ce qui limite son utilisation comme agent de conservation alimentaire (Pol et Smid, 1999). D'autres études démontrent la grande influence du pH sur la stabilité de la nisine. Par exemple, Liu et Hansen (1990) démontrent que la nisine est si stable à un pH de 2 que les auteurs ont chauffé la molécule à 121°C sans la dénaturer, mais à un pH supérieur à 4, la nisine était désactivée. Certaines grosses protéines protègent la nisine diminuant ainsi l'influence des facteurs extrinsèques sur la stabilité de la bactériocine (Delves-Broughton, 1990).

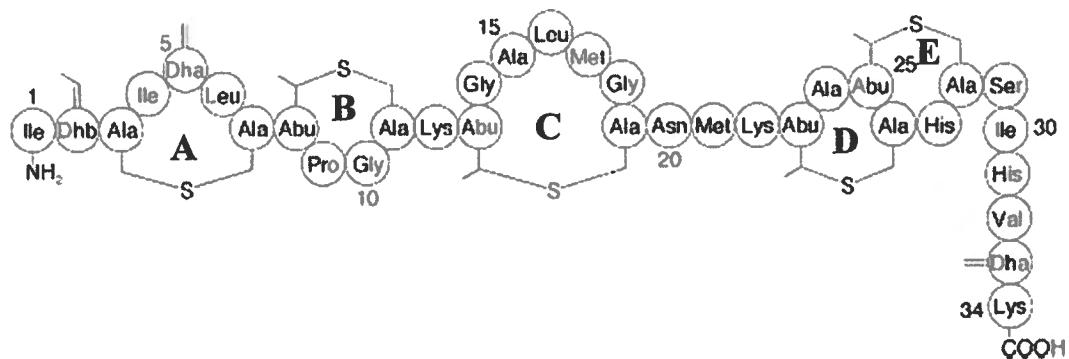


Figure 1.6. Structure de la nisine A (tiré de Martin *et al.*, 2004)

La nisine est un peptide pentacyclique constitué de 34 acides aminés dont 13 ont été modifiés post-traductionnellement (**Figure 1.6**). Il existe 3 variantes naturelles de la nisine la nisine A, Z et Q. La nisine U a été découverte récemment chez une souche de *Streptococcus uberis*. Le tableau 1.3 indique les légères différences en acides aminés dans la molécule (en bleu). La structure de la nisine contient deux domaines amphipathiques définis. Le domaine N-terminal composé des acide aminés 1 à 19 forme

les trois premiers anneaux lanthionine (anneaux A, B et C de la **Figure 1.6**). Une région flexible de 3 acides aminés relie le premier domaine au deuxième, soit les acides aminés 23 à 28, qui contient les deux derniers anneaux D et E (Bauer et Dicks, 2005). La nisine possède un large spectre d'activité bactéricide principalement dirigé contre les bactéries Gram +, mais aussi contre *Escherichia coli* sp. et *Salmonella* sp. si la membrane est perméabilisée par un agent chélateur (Stevens *et al.*, 1991 ; Millette *et al.*, 2004). La nisine doit d'abord s'ancrer sur le lipide II (undécaprényl-pyrophosphoryl-NAG-(pentapeptide)-NAM), une molécule clé dans la synthèse de la membrane bactérienne, afin de pouvoir lyser les souches sensibles. La nisine se lie à l'acide *N*-acétylmuramique du lipide II tandis que la mersacidine, une bactériocine de la classe Ib, se fixe sur le *N*-acétylglucosamine (**Figure 1.7**). Par la suite, la biosynthèse du peptidoglycane est bloquée et la nisine peut perforer la bactérie en insérant sa partie C-terminale hydrophobe dans la partie phospholipidique de la membrane. Il en résulte alors la formation de pores et la fuite rapide des ions cytoplasmiques et la lyse bactérienne (Bauer et Dicks, 2005).

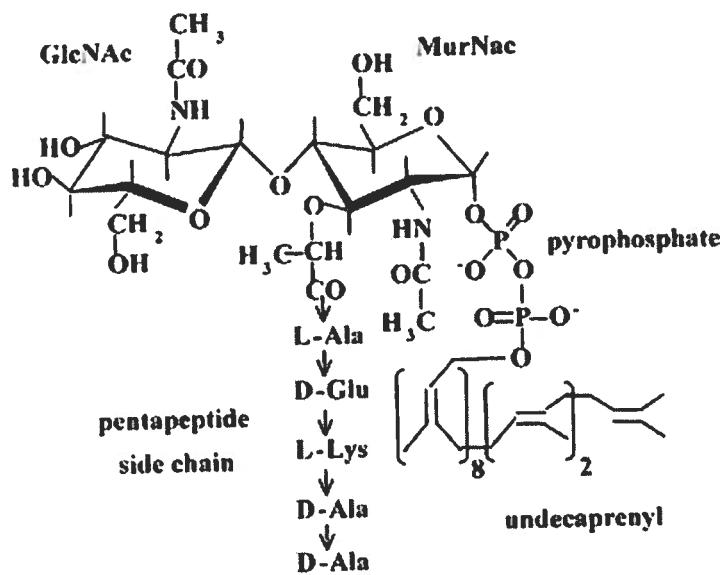


Figure 1.7. Structure primaire du lipide II. GlcNac: *N*-acétylglucosamine; MurNac: acide *N*-acétylmuramique; undecaprenyl : lipide II (adapté de Bauer et Dicks, 2005)

Quelques études ont démontré *in vitro* le potentiel de la nisine à éliminer les bactéries résistantes aux antibiotiques ou des pathogènes nosocomiaux. Severina *et al.* (1998) ont testé la capacité antimicrobienne de la nisine contre 56 souches de *Streptococcus pneumoniae* multi-résistantes, 33 souches de SARM et 29 isolats d'ERV. Les cultures de *S. pneumoniae* ont été traitées avec 1 mg/ml de nisine tandis que les bouillons de SARM et d'ERV ont été traitées avec 10-20 mg/ml. Les résultats ont montré que la bactériocine a permis d'empêcher la croissance de la grande majorité des souches testées. Par contre, les auteurs ont aussi noté l'apparition d'une forte résistante à la nisine chez plusieurs souches de *S. pneumoniae* lorsque la quantité d'antimicrobien n'était pas adéquate pour éliminer la population totale. Giachometti *et al.* (2000) ont testé la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la nisine, de la ranalexine et de 7 antibiotiques contre 40 isolats cliniques de SARM. La CMI de la nisine variait de 1-32 µg/ml tandis que sa concentration minimale bactéricide variait de 1-64 µg/ml selon la souche de SARM étudiée. Les auteurs ont alors montré que la combinaison de la nisine avec tous les antibiotiques, sauf les β-lactamines, améliorait l'activité bactéricide des molécules. Morency *et al.* (2001) ont rapporté que les nisines A et Z purifiées empêchent la croissance de diverses souches d'entérocoques multi-résistants dont une souche d'ERV, de *S. aureus* multi-résistants et de *H. pylori*. Par ailleurs, Mota-Meira *et al.* (2000) ont déterminé la CMI de la nisine A contre une panoplie de ces mêmes pathogènes. Les valeurs obtenues étaient toutes de l'ordre du µg/ml et comparables, sinon meilleures, que les CMI de la vancomycine et de l'oxacilline. Brumfitt *et al.* (2002) ont utilisé des méthodes standardisées pour déterminer la CMI de la nisine seule ou en combinaison avec d'autres antibiotiques qui affectent des étapes différentes durant la synthèse du peptidoglycane (bacitracine, chloramphénicol et ramoplanine) contre 20 souches de SARM et d'ERV. La CMI₅₀ de la nisine était de 6 mg/ml contre les SARM et de 4 mg/ml contre les ERV. Les auteurs ont aussi remarqué un phénomène de synergie entre la nisine et la ramoplanine autant contre SARM que contre les souches d'ERV tandis que le chloramphénicol était antagoniste. La nisine purifiée a une CMI₉₀ (0.256 mg/ml) plus faible que la vancomycine et le métronidazole contre des isolats cliniques de *Clostridium difficile* (Bartoloni *et al.*, 2004). L'ensemble de ces études démontre bien le

fort potentiel de la nisine comme nouvel agent thérapeutique qui peut s'avérer très utile dans la guerre contre la résistance bactérienne aux antibiotiques traditionnels.

1.4.5.2. La pédiocine

La pédiocine est un peptide antimicrobien produit par les bactéries du genre *Pediococcus*. Les deux premières souches productrices de cette molécule, *P. pentosaceus* FBB61 et L7230, ont été isolées au début des années 1960 à partir de la saumure de cornichons. Pourtant, ce n'est qu'en 1975 que la capacité antimicrobienne de ces deux souches a été mis en lien à la production de bactériocines et ce n'est qu'en 1985 que Daeschel et Klaenhammer (1985) ont déterminé que les 2 souches produisaient la pédiocine A. En 1987, Bhunia *et al.* (1987) ont isolé une souche de *P. acidilactici* H productrice de la pédiocine AcH (Bhunia *et al.*, 1991) tandis que Gonzalez et Kunka (1987) isolèrent, à partir de la souche *P. acidilactici* PAC 1.0., la pédiocine PA-1. Cependant, en 1992, une étude indépendante a démontré que les 2 pédiocines avaient la même séquence d'acides aminés codée par les mêmes nucléotides. Les pédiocines ont été renommées pédiocine PA-1/AcH afin d'éviter toute confusion. Par la suite, de nombreuses souches isolées dans divers aliments ont été rapportées comme étant productrices de la pédiocine PA-1/AcH (Ray et Miller, 2000). Par contre, la diversité des bactériocines produites par *Pediococcus* sp. est faible : seulement 4 pédiocines différentes et une pénocine ont été recensées jusqu'à présent (**Tableau 1.3**). Les 4 gènes nécessaires à la synthèse, l'excrétion par un système de transport ABC et l'immunité de la pédiocine sont dans le même opéron *pap* portés sur un plasmide (Drider *et al.*, 2006). La pédiocine mature est un peptide de 44 acides aminés et possède une masse moléculaire de 4 628 Da (**Tableau 1.3**). Son mode d'action est bactéricide envers les souches sensibles. Deux ponts disulfures intramoléculaires formés entre les 4 cystéines sont très importants dans l'activité antimicrobienne de la pédiocine. C'est une molécule cationique du fait de la présence de 4 lysines et de 3 histidines et son point isoélectrique est de 9.6 (Ray et Miller, 2000). La pédiocine cationique s'adsorbe à l'acide téichoïque chargée négativement sur

la membrane bactérienne ce qui crée des pores, la lyse cellulaire des souches sensibles et la fuite de K⁺, d'acides aminés et des constituants de faibles tailles. De plus, la pédiocine dérègle le potentiel électrique trans-membranaire et le gradient de pH, ce qui mène à un épuisement rapide de l'ATP et l'arrêt de toutes les biosynthèses. Le spectre d'activité antimicrobien des pédiocines inclut de nombreuses souches de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, *C. laramie*, *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Listeria monocytogenes*, et *Pediococcus* sp. De nombreuses études ont montré la capacité des pédiocines seules ou en combinaison avec d'autres traitements à augmenter la durée de vie d'un grand nombre d'aliments ou de les protéger contre la contamination par des bactéries pathogènes (Ray et Miller, 2000; Drider *et al.*, 2006). Cependant, aucune étude n'a démontré l'efficacité des pédiocines à inhiber les pathogènes cliniques ou résistants aux antibiotiques.

Le Tableau 1.3 résume l'ensemble des bactériiocines produites par diverses souches de *Lc. lactis* et de *Pediococcus* sp. Ce tableau montre que *Lc. lactis* a la possibilité de produire une très grande variété d'agents antimicrobiens. Toutes les molécules identifiées à ce jour font partie des classes I ou II. La diversité des pédiocines est beaucoup moins importante. De nombreux auteurs ont rapporté la production de pédiocines en tout point similaire à la pédiocine PA-1/AcH par des *P. acidilactici* d'origines variées (Ray et Miller, 2000). Le séquençage des génomes bactériens s'effectuant de plus en plus rapidement, il sera bientôt possible de détecter les gènes de production de nouvelles bactériiocines qui ne peuvent pas être produits dans les conditions du laboratoire. Ces gènes pourront alors être clonés dans des espèces bactériennes hétérologues. De cette façon, il sera possible de découvrir de nouvelles classes de molécules antimicrobiennes.

Tableau 1.3. Masse moléculaire (M. mol.), point isoélectrique (pI) et structure primaire des bactériocines produites par des souches de *Lactococcus* sp. et de *Pediococcus* sp.

Bactériocine		M. mol. (kDa)	Classe	pI	Structure primaire	Référence
Nisine	A	3.5	Ia	10.1	ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCHCSIHVSK	Jack <i>et al.</i> , 1995
	Z	3.33	Ia	ND*	ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCNCISIHVSK	Mulders <i>et al.</i> , 1991
	Q	3.32	Ia	ND	ITSISLCTPGCKTGVLMGCNLKATCNCISVHVSK	Zendo <i>et al.</i> , 2003
	U	3.03	ND	ND	ITSKSLCTPGCKTGILMTCPLKTATCGCHF (Cette bactériocine est produit par <i>Streptococcus uberis</i>)	Wiraman <i>et al.</i> , 2006
Lactococcine	A	5.77	Ia	9.2	KLTFIQSAAGDLYYNTNTHKYVYQQTQNAFGAAANTIVNGW MGGAAAGGFGLHH	Holo <i>et al.</i> , 1991
	B	5.3	Ia	9.1	SLQYVMSAGPYTWYKDTRTGKICKQTIDTASYTFGVMAEG WGKTFH	van Belkum <i>et al.</i> , 1992
	K	2.7	ND	ND	MVPTTFTLTTNNFLSDYQQLF	Kim <i>et al.</i> , 2006
	G α	4.34	I	10.9	GTWDDIGQQGIGRVAYWVGKAMGNMSDVNQASRINRKKH	Nissen-Meyer <i>et al.</i> , 1992
	G β	4.11	I	10.4	KKWGWLAWVDPAYEFIKGFGKGAIKEGNKDKWKNI	Nissen-Meyer <i>et al.</i> , 1992
	Q α	4.26	I	ND	SIWGDIGQQGVGKAAYWVGKAMGNMSDVNQASRINRKKH	Zendo <i>et al.</i> , 2006
	Q β	4.02	I	ND	KKWGWLAWVEPAGEFLKGFGKGAIKEGNKDKWKNI	Zendo <i>et al.</i> , 2006
	MMFII	4.14	IIa	ND	TSYGNGVHCNKSKCWIDVSELETYKAGTYSNPKDILW	Ferchichi <i>et al.</i> , 2001
	MMT24 α	3.76	IIb	ND	ND	Ghrairi <i>et al.</i> , 2005
	MMT24 β	3.25	IIb	ND	ND	Ghrairi <i>et al.</i> , 2005
972	7.25 (dimère)	IIb ou IIc	ND	ND	EGTWQHGYGVSSAYSNSYHHGSKTHSATVVNNNTGRQGKDT QRAGVWAKATVGRNLTEKASFYYNFW	Martinez <i>et al.</i> , 1999
Diacétine	B	≈ 2.5	ND	ND	ND	Ali <i>et al.</i> , 1995
Lacticine	481	3.4	Ia	ND	KGGSGVIHTISHECNMNSWQFVFTCCS	Rince <i>et al.</i> , 1994
	3147-A1	3.30	Ib	ND	(anciennement nommée lactococcin DR) CSTNNNTFSLSDYWGNNNGAWCTLTHECMAWCK	Martin <i>et al.</i> , 2004
	3147-A2	2.84	Ia	ND	TTPATPAISILSAYISTNTCPKKCTRAC	Martin <i>et al.</i> , 2004
Pédiocine	PA-1	4.62	IIa	9.6	KYYGNGVTGKHSCSVWDWKATTCIIMMGAMAATGGHO GNMKC	Marugg <i>et al.</i> , 1992
	PD-1	2.86	Ib	9.0	KKIKKSXSGDIXXEXDHLAXXXXX	Bauer <i>et al.</i> , 2005
	A	80	III	ND	estimé à 800 a.a. selon la séquence nucléotidique	Piva et Headon, 1994
	ACCEL	17.5	IIa	ND	KYYGNGVTXGKHSXXVDXG...	Wu <i>et al.</i> , 2004
Pénocine	A	4.68	IIa	9.45	KYYGNGVHCGKKTCYVDWGQATASIGKIIVNGWTQHGPWA HR	Diep <i>et al.</i> , 2006

* ND: non déterminé

1.4.6. Modulation du microbiote intestinal et prévention des infections gastro-intestinales par les probiotiques

Le principal effet allégué pour les probiotiques est leur capacité à « normaliser la flore intestinale ». Le microbiote intestinal joue un rôle important autant dans la santé que dans la maladie. En effet, le microbiote représente la première ligne de défense de l'intestin contre les pathogènes bactériens et viraux. Pour la population en bonne santé physique, la consommation de probiotiques aide à maintenir l'équilibre dans les différentes populations microbiennes indigènes, surtout les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium*. L'hôte maintient ainsi une saine capacité digestive, enzymatique et immunitaire. De nombreuses souches de BAL ont démontré une capacité à moduler les diverses populations microbiennes présentes dans le tractus gastro-intestinal. La consommation de 3×1 g de préparation en poudre de *Bifidobacterium longum* souches F6-1-ES et 69-2bs (2×10^9 bactéries viables/g) par 5 humains adultes en bonne santé durant 5 semaines n'a pas modulé les concentrations des principales populations considérées comme bénéfiques (BAL, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) du microbiote intestinal. Cependant, l'ingestion de *B. longum* a diminué le pourcentage des espèces potentiellement nocives comme *Clostridium* spp. lécithinase-négatif et *Bacteroides* spp. De plus, la consommation de ce probiotique a diminué le pH intestinal, ce qui est un autre mécanisme par lequel les probiotiques protègent l'hôte contre l'invasion de bactéries pathogènes. Les concentrations d'ammoniac et de β -glucuronidase ont aussi été réduites (Benno et Mitsuoka, 1992). Une autre étude, cette fois réalisée sur 34 adultes en bonne santé qui ont consommé chaque jour durant 10 jours, 3 bouteilles de 230 ml de yogourt AB (*L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* La5 et *B. lactis* Bb12) contenant 10^7 bactéries viables/ml, a permis de montrer une augmentation des population de bactéries anaérobies tout en diminuant la quantité de bactéries aérobiques. De plus, le ratio de bifidobactéries/coliformes, les coliformes étant souvent considérés comme pathogènes, était plus élevé à la suite de l'ingestion du probiotique. La souche de *B. lactis* ingérée a survécu au passage dans le tube digestif et a ainsi proliféré pendant plus de 8 jours au sein du microbiote intestinal avant de revenir à son niveau initial (Chen *et al.*, 1999). La consommation de poudre de *B. lactis* Bb12 mélangée dans de l'eau ayant une

concentration variant entre $1,6 - 4,8 \times 10^9$ ufc/jour durant 3 semaines ($n=37$) par des nouveaux-nés prématurés (< 37 semaines de grossesse) a augmenté de plus de 3 log la concentration fécale de *Bifidobacterium* par rapport au groupe placebo ($n=32$), tout en diminuant les concentrations d'*Enterobacteriaceae* et de *Clostridium* spp. (Mohan *et al.*, 2006). Plusieurs souches de lactobacilles semblent aussi pouvoir moduler positivement la flore intestinale. Tannock *et al.* (2000) ont suivi les variations des populations microbiennes intestinales chez 10 sujets humains adultes en bonne santé ayant consommé 250 ml de lait en poudre reconstitué contenant 10^9 de *L. rhamnosus* DR20 viables/jour durant 6 mois. Les principaux résultats obtenus étaient une augmentation de *Lactobacillus* spp. et d'*Enterococcus* spp. durant la période de consommation. Les résultats étaient relativement variables en fonction des sujets. Saito *et al.* (2002) ont montré que la consommation d'un lait fermenté contenant *L. helveticus* GCL1001 (10^8 bactéries viables/g) durant 4 semaines par 7 adultes en bonne santé a permis d'augmenter légèrement la concentration de *Bifidobacterium*, la seule variation significative parmi une douzaine de populations bactériennes évaluées. Toutefois, les études moléculaires ont montré que, malgré cette hausse, les espèces de bifidobactéries présentes n'ont pas été modifiées. Les auteurs ont conclu que le microbiote intestinal d'un adulte est trop bien implanté pour être influencé malgré la consommation de probiotiques. Marzotto *et al.* (2006) ont utilisé des méthodes d'analyses moléculaires afin d'évaluer les modifications quantitatives et qualitatives chez 13 enfants en bonne santé âgés entre 12 et 14 mois ayant consommé 100 g/jour d'un lait fermenté contenant *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (7,7 log ufc/g), *S. thermophilus* (8,6 log ufc/g) et *L. paracasei* A (8,2 log ufc/g) durant 4 semaines. L'étude a permis de démontrer que la souche de *L. paracasei* A survit au transit gastro-intestinal et réussit à dominer le microbiote intestinal après une semaine d'ingestion du probiotique. La souche aurait modifié temporairement la composition des espèces bactériennes présentes dans le tractus gastro-intestinal tout en augmentant la concentration des *Lactobacillus*. Tous les indicateurs reviennent au niveau de départ lorsque l'ingestion du lait fermenté est arrêtée. Figler *et al.* (2006) ont montré que la consommation de 0.5 l/jour de kéfir modifié (Biofir®) par 60 volontaires humains en bonne santé durant 6 semaines a permis d'augmenter les populations de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* par rapport aux 60 personnes qui avaient consommé un kéfir

traditionnel. Le produit Biofir® est un kéfir contenant la culture symbiolact-1 et un prébiotique. Un groupe de 30 patients qui devaient subir une colonoscopie à cause de polypes ou d'antécédents familiaux de tumeurs du colon se sont portés volontaires dans l'étude réalisée par Goossens *et al.* (2006). Dans cette étude, les sujets ont consommé 2× 100 ml/j durant 2 semaines d'une boisson fermentée à base de farine d'avoine contenant ($n=15$) ou non ($n=14$) le probiotique *L. plantarum* 299v. Les concentrations de *Clostridium* sp., de bactéries lactiques totales de *Lactobacillus* sp. ont toutes augmenté à la suite de la consommation du probiotique. Tous les autres groupes bactériens à l'étude n'ont pas été modifiés par la consommation de *L. plantarum* 299v. Donskey *et al.* (2001) ont testé l'influence de l'ingestion de *Bacillus coagulans* (non bactériocinogène), une souche brevetée par Ganeden Biotechnology, Inc. (San Diego, CA, USA), sur la densité de population d'ERV dans les matières fécales d'un modèle murin. Les auteurs ont noté une diminution significative de la densité d'ERV subséquente à la biothérapie comparativement à la prise de saline seulement pour 3 des souches d'ERV à l'étude. Dans les 2 autres cas, la réduction de population n'était pas significative. Les auteurs ont gavé les souris avec des probiotiques durant seulement 4 jours ce qui peut expliquer les résultats obtenus.

De nombreuses autres études ont été réalisées dans plusieurs pays. Après analyse de tous les résultats, il semble clair que les probiotiques peuvent influencer de manière positive l'équilibre entre les diverses populations du microbiote intestinal. Souvent, les populations de *Bifidobacterium* sp. et de *Lactobacillus* sp. sont augmentées temporairement tandis que celles des *Enterobacteriaceae* et des *Clostridium* spp. sont réduites. Par contre, il semble plus facile de modifier significativement les populations bactériennes des jeunes enfants puisque leur microbiote est plus sensible aux influences externes. Les adultes ont un microbiote intestinal très stable tout au long de leur vie (Isolauri *et al.*, 2004). Il est aussi évident que toutes les souches probiotiques n'ont pas le même effet sur les bactéries intestinales. C'est pourquoi il est important de bien caractériser les souches de probiotiques dans les études. L'influence de support d'administration (probiotique sous forme lyophilisé ou ingéré dans un lait fermenté) ne ressort pas vraiment des études citées précédemment. De plus, aucune étude clinique ne

fait ressortir l'effet dose de probiotique-réponse. Il serait très intéressant d'entreprendre des études cliniques qui pourraient assurément répondre à ces interrogations. La prise d'antibiotiques ou la maladie (voir section 1.4.5.) peuvent modifier le microbiote intestinal. Cette modulation, bien que temporaire, peut provoquer de l'inflammation incontrôlée déclenchée par un déséquilibre au niveau du microbiote. La consommation régulière de probiotiques pourrait alors atténuer les changements et prévenir l'apparition de symptômes désagréables (Myllyluoma *et al.*, 2006).

Le Tableau 1.4 résume les principales études cliniques montrant l'influence de la consommation de probiotiques spécifiques dans le traitement ou la prévention de pathologies causées par *Helicobacter pylori* et *Clostridium difficile*. Les mécanismes d'action ne sont pas encore bien élucidés, mais la stimulation de la production d'IgAs ou d'autres composantes du système immunitaire semble être la principale explication.

Tableau 1.4. Études cliniques montrant l'implication de la consommation de probiotiques dans le traitement ou la prévention des pathologies causées par *Helicobacter pylori* ou *Clostridium difficile*.

Pathogène	Probiotiques	Effets	Échantillon (n=)	Référence
<i>H. pylori</i>	<i>Clostridium butyricum</i> MIYAIRI 588 + thérapie antibiotique	- ↓ des modifications du microbiote induit par les antibiotiques - ↓ des effets secondaires	35 sujets avec ulcères d'estomac	Shimbo <i>et al.</i> , 2005
	<i>Bacillus clausii</i>	- ↓ de l'incidence et de l'intensité des effets secondaires (douleur gastrique, nausée, diarrhée) associés à la triple thérapie	120 sujets infectés <i>H. pylori</i>	Nista <i>et al.</i> , 2004
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LB	- 182/254 enfants ont été colonisés par <i>H. pylori</i> - traitement aux antibiotiques a fonctionné dans 66% vs 6.5% en faveur du groupe probiotique	254 enfants asymptomatiques	Gotteland <i>et al.</i> , 2005
	<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	- antibiothérapie : 57.5% d'élimination de <i>H. pylori</i> antibiothérapie + probiotiques : 84.6% d'élimination de <i>H. pylori</i> - ↓ effets secondaires et de la résistance aux antibiotiques	86 enfants avec symptômes de gastrites	Sykora <i>et al.</i> , 2005
	<i>Lactobacillus casei</i> DG	- ↓ effets secondaires associés à une quadruple antibiothérapie - ↑ de l'élimination de <i>H. pylori</i>	66 sujets avec infection <i>H. pylori</i> persistente	Tursi <i>et al.</i> , 2004
	<i>Lactobacillus brevis</i> CD2	- ↓ score test respiratoire à l'urée marquée et de la synthèse des polyamines (multiplication et différenciation cellulaire ⇒ cancer estomac)	22 sujets infectés <i>H. pylori</i>	Linsalata <i>et al.</i> , 2004
	10 jours antibiothérapie + <i>L. reuteri</i> ATCC 55730 ou placebo	- ↓ score GSRS mesurant les symptômes de l'infection et l'intensité des effets secondaires dans le groupe probiotique	40 enfants infectés <i>H. pylori</i>	Lionetti <i>et al.</i> , 2006
	Yogourt contenant <i>Lactobacillus gasseri</i> LG21	- Réduction de l'infection par <i>H. pylori</i> et de l'inflammation de la muqueuse gastrique	31 sujets infectés	Sakamoto <i>et al.</i> , 2001
	<i>Lactobacillus johnsonii</i> Lal	- ↓ score test respiratoire à l'urée marquée de 7.64%	326 enfants asymptomatiques (77.3% colonisation par <i>H. pylori</i>)	Cruchet <i>et al.</i> , 2003
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	- ↓ effets secondaires associés à une triple antibiothérapie (ballonnement, diarrhée, perturbation du goût)	120 sujets infectés par <i>H. pylori</i>	Armuzzi <i>et al.</i> , 2001a
	<i>L. rhamnosus</i> GG	- ↓ effets secondaires associés à une triple antibiothérapie (nausée, diarrhée, perturbation du goût)	60 sujets infectés par <i>H. pylori</i>	Armuzzi <i>et al.</i> , 2001b

Tableau 1.4 (suite)

<i>L. rhamnosus</i> GG ou <i>Saccharomyces boulardii</i> ou <i>Lactobacillus + Bifidobacterium</i> <i>S. boulardii + inuline</i>	- ↓ effets secondaires associés à une triple antibiothérapie, et ce pour tous les probiotiques de l'étude	85 sujets infectés par <i>H. pylori</i>	Cremonini <i>et al.</i> , 2002
AB-yogurt : <i>L. acidophilus</i> La5 <i>B. lactis</i> Bb12 <i>L. bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i> AB-yogurt : <i>L. acidophilus</i> La5 <i>B. lactis</i> Bb12 <i>L. bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i>	- 182/254 enfants ont été colonisés par <i>H. pylori</i> - traitement aux antibiotiques soigné 66% vs 12.5% pour le groupe <i>S. boulardii</i> - ↓ de l'activité uréase après 6 semaines de traitement chez les personnes ayant consommées le yogourt	254 enfants asymptomatiques	Gotteland <i>et al.</i> , 2005
AB-yogurt : <i>L. acidophilus</i> La5 <i>B. lactis</i> Bb12 <i>L. bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i>	- Éradication de l'infection chez 91% des sujets quadruple thérapie + prétraitement 4 sem probiotiques contre 77% - ↓ score test respiratoire à l'urée marquée dans le groupe probiotique	59 adultes infectés par <i>H. pylori</i>	Wang <i>et al.</i> , 2004
<i>C. difficile</i>	- Élimination de l'infection chez 91% des sujets triple thérapie + probiotiques contre 78% - Récupération normale des <i>Bifidobacterium</i> sp. à la 5 ^{ème} semaine	138 sujets infectés par <i>H. pylori</i> dont la triple thérapie est inefficace	Sheu <i>et al.</i> , 2006
<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> (Bio-K+ Pharma) Antibiotiques + <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> ou antibiotiques <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v + antibiothérapie ou placebo + antibiothérapie	- ↓ de 7x l'infection par <i>C. difficile</i> - ↓ de 20% de la durée d'hospitalisation - 46% (probio + antibiotiques) vs 78% (antibiotiques) des sujets positifs aux toxines	106 sujets infectés par <i>H. pylori</i>	Sheu <i>et al.</i> , 2002
<i>S. boulardii</i> 2x/j durant antibiothérapies diverses	- placebo : 6/9 récurrence -probiotique : 4/11 récurrence	≈ 20 sujets antibiothérapie	Beausoleil <i>et al.</i> , 2004
<i>S. boulardii</i> durant 28 j + antibiothérapie ou placebo + antibiothérapie	-placebo : 7/78 DAA (9%) ; 2/7 positif <i>C. difficile</i> -probiotique : 1/73 DAA (1.4%) ; 0/1 <i>C. difficile</i>	138 personnes âgées	Plummer <i>et al.</i> , 2004
<i>S. boulardii</i> durant 28 j + antibiothérapie ou placebo + antibiothérapie	Chez les sujets souffrant de récurrence : -placebo : 65% de récurrence -probiotique : 35%	20 sujets diarrhées récurrentes <i>C. difficile</i>	Wullt <i>et al.</i> , 2003
<i>S. boulardii</i> durant 28 j + antibiothérapie ou placebo + antibiothérapie	La combinaison antibiotique + probiotique permet de prévenir les récurrences Chez les sujets avec dose élevée de vancomycine : -placebo : 50% récurrence -probiotique : 16.7%	124 sujets infectés <i>C. difficile</i>	McFarland <i>et al.</i> , 1994
		168 sujets avec récurrence de <i>C. difficile</i>	Surawicz <i>et al.</i> , 2000

1.4.7. Modulation du microbiote intestinal par les BAL productrices de bactériiocines

Bien que le potentiel antimicrobien des bactériiocines ait été démontré dans une grande quantité de publications contre une variété de bactéries pathogènes alimentaires (Ray et Miller, 2000; Guinane *et al.*, 2005; Drider *et al.*, 2006), quelques études *in vitro* ont démontré l'activité bactéricide de bactériiocines contre des pathogènes résistants aux antibiotiques (Galvin *et al.*, 1999; Nascimento *et al.*, 2006), mais aucune étude clinique humaine n'a été réalisée. Cependant, quelques études ont été effectuées sur des animaux pour vérifier l'impact des bactériiocines sur la modulation du microbiote intestinal ou dans des modèles d'infections. Bernbom *et al.* (2006) ont vérifié les effets d'une souche *Lactococcus lactis* productrice de nisine sur la composition du microbiote intestinal chez des rats colonisés par une microflore intestinale humaine. Les rongeurs ont été gavés durant 2 jours consécutifs avec la souche de *Lc. lactis* productrice de nisine ou un mutant ayant perdu la capacité de produire cette bactériocine ou encore des concentrations croissantes de nisine. La diversité microbienne intestinale a été évaluée et quantifiée par des dénombrements sur des géloses sélectives ou par « denaturated gradient gel electrophoresis » (DGGE) à partir de selles de rats. La présence des 2 souches de *Lc. lactis* a augmenté le nombre de *Bifidobacterium* sp. fécaux durant les 8 premiers jours et a diminué la concentration d'entérocoques/streptocoques intestinaux. Les analyses DGGE ont montré que le profil de diversité microbienne chez les rats gavés par l'une ou l'autre des souches de *Lc. lactis* était différent de celui des rats gavés avec la saline (témoin). L'administration orogastrique de nisine n'a eu d'influence ni quantitative ni qualitative sur le microbiote intestinal. Mare *et al.* (2006) ont isolé une souche de *L. plantarum* productrice de plantaricine 423 dans un intestin porcin. Ils ont ensuite administré cette souche à des porcelets durant 28 jours. Les résultats ont montré que la souche adhère fortement à l'iléon et au côlon postérieur puisque de fortes concentrations de cette souche ont été visualisées dans ces sections tandis qu'une diminution de la population d'*Ent. faecalis* a été mesurée. Les auteurs concluent que la plantaricine est responsable de cette diminution, mais les mêmes expériences n'ont pas été réalisées avec

une souche non-bactériocinogène. Un autre exemple est la souche d'origine humaine *L. acidophilus* La1, maintenant reclassée *L. johnsonii* La1, qui inhibe l'adhésion et l'invasion cellulaire par des bactéries pathogènes *in vitro*. Cette souche produit une molécule antimicrobienne, active seulement en présence d'acide lactique et dont l'activité antimicrobienne n'est pas sensible aux protéases, laissant donc présager que ce n'est pas une bactériocine (Makras *et al.*, 2006). Cet agent inhibiteur agirait contre plusieurs bactéries pathogènes Gram + et Gram – telles *S. aureus*, *List. monocytogenes*, *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae* sans affecter la croissance des bifidobactéries et des lactobacilles évalués (Bernet-Camard *et al.*, 1997). Quelques études cliniques ont été réalisées avec cette bactérie (Garrido *et al.*, 2005; Brunser *et al.*, 2006; Yamano *et al.*, 2006), mais aucune n'a démontré l'impact de la production de molécules antimicrobiennes sur la modulation du microbiote intestinal. Beaucoup d'études devront être réalisées dans l'avenir afin de démontrer l'influence de souches bactériocinogènes sur la modulation du microbiote intestinal ou sur la prévention des infections *in vivo*, mais aussi pour démontrer la production de bactériocines *in situ*. Cependant, dans une étude réalisée par O'Mahony *et al.* (2001), des souris ont reçu par gavage des doses de 10^9 bactéries viables/j durant 16 semaines de la souche *L. salivarius* ssp. *salivarius* UCC118. Une réduction significative des entérocoques et des coliformes fécaux a été observée. À la suite de cette étude, il a été démontré que cette souche probiotique produit une bactériocine de classe IIb nommée abp118 (Flynn *et al.*, 2002). À ce moment, il était possible de penser, sans toutefois le confirmer, que la production de l'agent bactéricide est impliquée dans la forte capacité de colonisation de ce lactobacille. Pour le confirmer, une excellente étude a été publiée par Corr *et al.* (2007). Dans cette série d'expériences, les auteurs ont clairement démontré que l'ingestion de *Lactobacillus salivarius* UCC118 (1×10^9 ufc/j durant 3 jours), la souche productrice de la bactériocine abp118, a permis de réduire considérablement la translocation au foie et dans la rate de *Listeria monocytogenes* (2×10^9 ufc) causée par une infection chez des souris A/J. C'est, à ma connaissance, la première et la seule étude qui démontre directement la forte implication de la production de bactériocines dans la capacité anti-infectieuse d'une bactérie.

1.4.8. Diminution de l'incidence et de la durée des diarrhées

Quelques 4 milliards d'épisodes de diarrhées sont déclarés annuellement dans le monde causant 4% des décès (Sazawal *et al.*, 2006). Dans les pays en voie de développement, la diarrhée est la troisième cause de mortalité et elle serait responsable de 17% des décès des enfants de moins de 5 ans (Glass *et al.*, 2006). La diarrhée aiguë provoque une perturbation de l'absorption intestinale des micronutriments et des macronutriments ce qui mène à la malnutrition, la déshydratation et entraîne des retards de croissance. La diarrhée est définie comme toute augmentation du débit fécal quotidien d'un ou plusieurs constituants normaux de la selle (Kernbaum *et al.*, 1998). De nombreuses causes peuvent provoquer la diarrhée (plus de 20 agents infectieux, antibiothérapie, intolérance alimentaire, stress). Les intoxications alimentaires bactériennes, la gastro-entérite virale et la diarrhée du voyageur sont causées par l'ingestion d'agents infectieux qui s'implantent temporairement dans le microbiote et exercent leurs effets néfastes, avant d'être éliminés par le système immunitaire. La perturbation des bactéries indigènes du microbiote intestinal par un traitement aux antibiotiques peut aussi permettre la croissance de bactéries nocives et entraîner des diarrhées. Dans ce contexte, la consommation de probiotiques peut aider à prévenir l'apparition de plusieurs formes de diarrhées.

1.4.8.1. Causes les plus fréquentes des diarrhées

La diarrhée du voyageur, communément appelée « turista », se produit chez environ la moitié des individus fréquentant des pays à risque (Yates, 2005). La diarrhée se déclare en général en raison de la contamination par l'ingestion fortuite de bactéries pathogènes telles *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella enterica* sérovar Typhi, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas* spp. ou *Vibrio cholerae*, mais aussi par divers parasites (*Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayetanensis* ou *Cryptosporidium parvum*) ou des virus (Rotavirus ou Norovirus). Les symptômes sont de la fièvre, de la nausée, des vomissements, des crampes abdominales et parfois des

diarrhées sanguinolentes (Yates, 2005). Quelques probiotiques ont démontré une certaine capacité à réduire l'incidence des diarrhées du voyageur (**Tableau 1.5**). La nature du probiotique et la destination des voyageurs sont des critères très importants lors de l'analyse des résultats. D'ailleurs, les résultats attendus sont parfois contradictoires d'une étude à l'autre; il est donc évident que les études sont incomplètes et qu'il manque cruellement d'études pour prouver l'implication des probiotiques dans la prévention des diarrhées du voyageur.

Tableau 1.5. Études cliniques impliquant la consommation de probiotiques dans la prévention des diarrhées du voyageur.

Probiotique	Effet thérapeutique ^a (% probiotique/% témoin)	Population (n=)	Référence
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	35/29 (NS ^b)	50	de Dios Pozo-
<i>L. bulgaricus</i> (Lactinex)			Olano <i>et al.</i> , 1978
<i>L. acidophilus</i>	55/51 (NS)	212	Kollaritsch <i>et al.</i> 1983
<i>L. fermentum</i> souche KLD	23.8/23.8 (NS)	282	Katelaris <i>et al.</i> , 1995
<i>L. acidophilus</i> (souche non spécifiée)	25.7/23.8 (NS)	282	Katelaris <i>et al.</i> , 1995
Lactobacilles + bifidobactéries + streptocoques	43/71 ($P = 0.02$)	81	Elack <i>et al.</i> , 1989
<i>L. acidophilus</i> LB non viable	61.4/100 personnes/mois vs 43.4/100 personnes/mois (NS)	174	Briand <i>et al.</i> , 2006
<i>Saccharomyces boulardii</i>	28.7/39.1 ($P < 0.05$)	1016	Kollaritsch <i>et al.</i> , 1993
<i>L. rhamnosus</i> GG	41/46.5 (NS)	756	Oksanen <i>et al.</i> , 1990
<i>L. rhamnosus</i> GG	3.9/7.4 ($P = 0.05$)	245	Hilton <i>et al.</i> , 1997

^a Pourcentage de sujets montrant les symptômes de diarrhées dans le groupe probiotique vs le groupe témoin, respectivement.

^b Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes de l'étude.

Les **intoxications alimentaires** sont des infections gastro-intestinales provoquées par l'ingestion d'aliments contaminés par des bactéries pathogènes telles qu'*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium. Lorsque les aliments ne sont pas entreposés adéquatement (par exemple à température pièce), les bactéries se multiplient rapidement. Lors de la consommation d'aliments contaminés, les bactéries pathogènes peuvent s'implanter sur la surface mucosale et sécréter des entérotoxines, provoquant ainsi la diarrhée (Prescott *et al.*, 2003). Cependant, la prise de probiotiques peut prévenir un tel problème par la compétition exercée pour les nutriments ou pour les sites d'attachement à la muqueuse intestinale.

La **gastro-entérite** est la deuxième cause de consultation clinique après les infections respiratoires. Des symptômes aigus de gastro-entérite, inflammation des muqueuses gastrique et intestinale caractérisée par des vomissements et de la diarrhée, peuvent être déclenchés par un grand nombre d'agents pathogènes (virus, bactéries ou parasites). La cause principale des diarrhées infantiles et aussi la plus meurtrière est le **rotavirus**, qui tue chaque année 640 000 enfants (Reid et Burton, 2002). Le rotavirus envahit la muqueuse intestinale et s'y reproduit, ce qui cause des dommages membranaires et en augmente la perméabilité. La prise orale de solutions de réhydratation est le traitement principal, mais il ne réduit pas la durée des diarrhées. Cette fois, de nombreuses études ont démontré l'efficacité des probiotiques à prévenir l'incidence et la durée de ce type de diarrhée (**Tableau 1.6**).

Tableau 1.6. Études cliniques impliquant la consommation de probiotiques dans la prévention ou le traitement des diarrhées associées au Rotavirus ou des gastro-entérites.

Type de diarrhée	Probiotique	Population à l'étude	Effet thérapeutique	Référence
Rotavirus	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	71 enfants	→ durée diarrhées	Isolauri <i>et al.</i> , 1991
	<i>L. rhamnosus</i> GG	39 enfants	→ durée diarrhées ↑ IgA anti-rotavirus	Kaila <i>et al.</i> , 1992
	<i>L. rhamnosus</i> GG	49 enfants	→ durée diarrhées ↑ IgA anti-rotavirus -effet spécifique de GG vs autres BAL	Majamaa <i>et al.</i> , 1995
	<i>L. rhamnosus</i> GG	42 enfants	→ durée diarrhées	Isolauri <i>et al.</i> , 1994
	<i>L. rhamnosus</i> GG	25 enfants	→ durée diarrhées -importance de la viabilité BAL	Kaila <i>et al.</i> , 1995
	<i>L. rhamnosus</i> GG	81 enfants	-prévention des diarrhées à rotavirus nosocomiales (2.2% vs 16.7%)	Szajewska <i>et al.</i> , 2001
	<i>L. rhamnosus</i> GG	123 enfants	→ durée diarrhées	Shornikova <i>et al.</i> , 1997a
	<i>L. rhamnosus</i> GG	220 enfants	-inefficace à prévenir les infections nosocomiales à rotavirus	Mastretta <i>et al.</i> , 2002
	<i>L. reuteri</i> DSM12246 + <i>L. rhamnosus</i> 19070-2	69 enfants	→ durée diarrhées et hospitalisation	Rosenfeldt <i>et al.</i> , 2002
	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12	175 enfants	-protection contre les rotavirus	Phuapradit <i>et al.</i> , 1999
	<i>L. rhamnosus</i> souches 573L/1; 573L/2; 573L/3	87 enfants	→ durée diarrhées	Szymanski <i>et al.</i> , 2006
Gastro-entérites	<i>L. rhamnosus</i> GG	32 enfants	→ incidence et durée diarrhées	Raza <i>et al.</i> , 1995
	<i>L. rhamnosus</i> GG	26 enfants	→ durée diarrhées	Pant <i>et al.</i> , 1996
	<i>L. rhamnosus</i> GG	100 enfants	→ durée diarrhées	Guarino <i>et al.</i> , 1997
	<i>L. rhamnosus</i> GG	287 enfants	→ durée diarrhées	Guandalini <i>et al.</i> , 2000
	<i>L. rhamnosus</i> GG	179 enfants	-Aucun effet positif	Salazar-Lindo <i>et al.</i> , 2004
	<i>L. reuteri</i>	40 enfants	→ durée diarrhées	Shornikova <i>et al.</i> , 1997b
	<i>L. acidophilus</i> CERALA	89 enfants	→ durée diarrhées	Gaon <i>et al.</i> , 2003
	<i>Saccharomyces boulardii</i>	38 enfants	→ durée diarrhées	Chapoy, 1985
	<i>Enterococcus faecium</i> SF68	211 adultes	→ durée et de la sévérité des diarrhées	Buydens et Debeuckelaere, 1996

La diarrhée associée à la prise d'antibiotiques (DAA) est l'effet secondaire le plus souvent rencontré durant une antibiothérapie (Wistrom *et al.*, 2001). C'est un problème majeur de santé publique qui cause un accroissement de la durée d'hospitalisation, des procédures de diagnostics et de soins, ce qui engendre une augmentation des coûts en soins de santé. L'incidence de la DAA varie entre 5 et 39% selon l'antibiotique utilisé, la susceptibilité génétique et l'environnement dont la durée de l'hospitalisation (McFarland, 1998). Une perturbation des populations bactériennes ou une réduction de la diversité microbienne du microbiote intestinal sont des facteurs impliqués dans la pathogenèse des DAA (Young et Schmidt, 2004). La prévention ou le traitement avec des probiotiques permettrait le maintien du microbiote intestinal, ce qui empêcherait la colonisation par *Clostridium difficile* ou d'autres bactéries pathogènes. Différentes bactéries se sont avérées bénéfiques face aux diarrhées associées à la prise d'antibiotiques (**Tableau 1.7**).

Tableau 1.7. Études cliniques randomisées montrant l'effet thérapeutique de la consommation de probiotiques dans la prévention des diarrhées associées à la prise de divers antibiotiques.

Antibiotique	Probiotique	Étude aveugle	Population à l'étude (n=)	Probiotique/témoin (% probiotique/% témoin) ^a	Référence
Ampicilline	<i>L. acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i>	oui	98	8.3/21	Gotz <i>et al.</i> , 1979
Néomycine	<i>L. acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i>	non	39	20/42	Clements <i>et al.</i> , 1983
Amoxicilline-clavulanate	<i>L. acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i>	non	27	effet positif	Witsell <i>et al.</i> , 1995
Divers	<i>E. faecium</i> SF68	oui	45	8.7/ 27.2	Wunderlich <i>et al.</i> , 1989
Érythromycine	<i>B. longum</i>	oui	10	effet positif	Colombel <i>et al.</i> , 1987
Érythromycine	<i>L. rhamnosus</i> GG	non	16	effet positif	Siitonen <i>et al.</i> , 1990
Divers	<i>L. rhamnosus</i> GG	oui	202	8/ 26	Vanderhoof <i>et al.</i> , 1999
Divers	<i>L. rhamnosus</i> GG	oui	119	5/16	Arvola <i>et al.</i> , 1999
Divers	<i>L. sporogenes</i> + FOS	oui	120	39/62	La Rosa <i>et al.</i> , 2003
Clindamycine	<i>B. longum</i> <i>L. acidophilus</i>	oui	23	effet positif (↓ de <i>C. difficile</i>)	Nord <i>et al.</i> , 1997
Divers	<i>B. lactis</i>	oui	80	16/31	Correa <i>et al.</i> , 2005
Divers	<i>S. thermophilus</i> <i>Saccharomyces boulardii</i>	oui	180	9.5/21.8	Surawicz <i>et al.</i> , 1989
β-lactamines	<i>S. boulardii</i>	oui	193	7.2/14.6	McFarland <i>et al.</i> , 1995
Divers	<i>S. boulardii</i>	oui	269	8/23	Kotowska <i>et al.</i> , 2005
Sulbactame-ampicilline, azithromycine	<i>S. boulardii</i>	non	466	5.7/18.9	Erdeve <i>et al.</i> , 2004
Divers	<i>Clostridium butyricum</i> MIYAIRI	non	110	9/59	Seki <i>et al.</i> , 2003

^a Pourcentage de sujets montrant les symptômes de diarrhées dans le groupe probiotique vs le groupe témoin, respectivement.

Il est donc évident à la lecture des études présentées dans le Tableau 1.7 que la consommation de divers probiotiques durant un traitement aux antibiotiques s'avère très bénéfique pour prévenir l'incidence des diarrhées ou encore diminuer la durée de celles-ci. Par contre, ce ne sont pas tous les probiotiques qui ont des effets équivalents. En effet,

les études qui impliquent *L. rhamnosus* GG ou *S. boulardii* montrent des résultats beaucoup plus intéressants et sont mieux supportées par des essais cliniques contrôlés ou des méta-analyses que par plusieurs autres travaux réalisés avec d'autres micro-organismes.

1.4.9. Soulagement des symptômes associés aux maladies inflammatoires de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin désignent des maladies très semblables, la maladie de Crohn et la recto-colite ulcéreuse. Le syndrome de l'intestin irritable est un désordre fonctionnel intestinal très fréquent touchant en moyenne 10 à 15 % de la population générale (Hungin *et al.*, 2003). Il est important de mentionner qu'une perte de l'homéostasie et des perturbations immunitaires au niveau du tube digestif sont les principales causes de ces maladies. Un déséquilibre du microbiote intestinal pourrait être partiellement responsable de ces troubles intestinaux. Certaines études démontrent que le rétablissement du microbiote peut être effectué par la consommation de probiotiques (Nobaek *et al.*, 2000; Verdu et Collins, 2004) tandis que d'autres études semblent plutôt démontrer l'importance de l'immunomodulation induite par les probiotiques (Steidler *et al.*, 2000; O'Mahony *et al.*, 2005).

1.4.10. Immunomodulation

Les probiotiques ont la capacité de moduler, c'est-à-dire de stimuler ou de réprimer, le système immunitaire (SI) de l'hôte. Les bactéries ou seulement certaines de leurs composantes (parois bactériennes, peptides immuno-modulateurs, exopolysaccharides, ADN) entrent en contact avec les nombreuses cellules immunitaires présentes dans le GALT et provoquent une cascade de réactions (Yasui *et al.*, 1999; Isolauri *et al.*, 2001; Leblanc *et al.*, 2002). Les sections suivantes résument les mécanismes d'action des probiotiques sur l'immunomodulation.

1.4.10.1. Effets des probiotiques sur la réponse immunitaire

1.4.10.1.1. Immunité non-spécifique

- ↑ de la phagocytose et production de cytokines par les macrophages
- stimulation de l'activité des cellules *natural killer* (NK)
- les macrophages et les cellules NK seront donc plus aptes à éliminer les pathogènes
- ↑ de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α)
- Inhibition de voie de signalisation cellulaire NF- κ B
- Favorise l'apoptose (suicide cellulaire)

L'ingestion de diverses souches de *Lactobacillus* sp. augmente la résistance de l'hôte aux pathogènes microbiens en les éliminant plus facilement de l'intestin. De nombreuses souches de bactéries vivantes ont induit la production de cytokines pro-inflammatoires, ce qui correspond à une stimulation de l'immunité non-spécifique. Les probiotiques peuvent activer la production de macrophages et la phagocytose par ces derniers. La phagocytose est responsable de l'activation précoce de la réponse inflammatoire. Les phagocytes sécrètent alors des agents toxiques (intermédiaires réactifs de l'oxygène, enzymes lytiques) dans plusieurs réactions inflammatoires. L'activité phagocytaire mène au recrutement de cellules immunocompétentes et à la génération de la réponse inflammatoire. Récemment, une étude a démontré une activité phagocytaire plus forte chez des enfants souffrant d'allergies alimentaires que chez des enfants sains, ce qui indique une augmentation de la capacité à générer et à produire des molécules qui mèneront à une réponse inflammatoire chez les enfants souffrant d'allergies. Il est aussi intéressant de remarquer que la consommation de probiotiques par des personnes saines résulte en une stimulation du système immunitaire tandis que ce dernier est régulé à la baisse chez des individus allergiques réduisant ainsi les symptômes cliniques (Isolauri *et al.*, 2001).

En général, l'inflammation intestinale accompagne un débalancement du microbiote intestinal. Par exemple, il a été remarqué que les diarrhées à rotavirus sont associées à une augmentation de l'uréase fécale, une enzyme pro-inflammatoire qui sensibilise la muqueuse intestinale à l'ammoniac et qui stimule la croissance de bactéries productrices d'uréase. Un débalancement de la composition du microbiote intestinal a été rapporté chez des sujets atteints d'arthrite rhumatoïde, ce qui signifie que la diversité du microbiote intestinal est influencée par un état inflammatoire systémique. Une thérapie aux probiotiques s'est révélée efficace pour normaliser la concentration d'uréase fécale. Par conséquent, la consommation de probiotiques stabilise la composition du microbiote intestinal et prévient la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires. Ces agents sont sécrétés par le tissu lymphoïde associé à l'intestin en réponse (normale ou exagérée) aux antigènes retrouvés dans la lumière intestinale qui peuvent potentiellement affecter l'intégrité mucosale (Isolauri *et al.*, 2001).

Les cytokines sont des messagers chimiques sécrétés par les cellules du SI afin de communiquer entre elles. Il existe des cytokines pro-inflammatoires: interleukine-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-12, TNF- α , INF- γ et d'autres anti-inflammatoires: IL-2, IL-4, IL-5 et IL-10. Des études ont montré que, chez des souris transgéniques ayant perdu la capacité de produire des cytokines, une réponse immune inoffensive face au microbiote intestinal normal se transforme en un état inflammatoire en absence d'IL-2 et d'IL-10. Cette expérience indique que l'inflammation est provoquée par une rupture de la fragile balance existant entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires du milieu intestinal. Une autre étude a montré que la consommation de *Lactobacillus rhamnosus* GG permet de diminuer les concentrations de TNF- α fécales chez des sujets atteints de dermatites atopiques ou d'allergies au lait de vache. La consommation de lactobacilles peut aussi mener à une sécrétion d'INF- γ par les lymphocytes. L'INF- γ augmente la capture des antigènes par les plaques de Peyer. De plus, les probiotiques augmentent la production des IgA mucosaux et systémiques face à des antigènes alimentaires. En conséquence, la consommation de probiotiques stabilise la barrière immunologique de la muqueuse intestinale par la réduction des cytokines pro-inflammatoires (Isolauri *et al.*, 2001).

1.4.10.1.2. Immunité humorale ou spécifique

- ↑ de la production d'IgA totaux (principalement contre les bactéries Gram -)
- ↑ de la production d'IgA spécifiques par exemple IgA anti-rotavirus
- ↓ de la production d'IgE

L'ingestion de *Bifidobacterium bifidum* augmente les anticorps dirigés contre l'ovalbumine tandis que *Bifidobacterium breve* stimule la production d'IgA dirigé contre la toxine du choléra dans un modèle murin. Des enfants infectés par le rotavirus et souffrant de diarrhées ont mangé un lait fermenté enrichi en *Lactobacillus rhamnosus* GG. Une augmentation du nombre de cellules productrices d'IgA dirigés contre le rotavirus a été observée et la concentration d'IgA sérique était plus élevée (Yasui *et al.*, 1999).

Les enfants allergiques au lait de vache ont une hypersensibilité de type retardé aux protéines du lait, une production déficiente d'IgA locaux ainsi qu'une hypersensibilité immédiate par les IgE. Une thérapie avec des probiotiques a pu améliorer significativement la dermatite atopique provoquée par une réponse immune inadéquate chez ces enfants allergiques. Les probiotiques peuvent aussi altérer le nombre de récepteurs aux antigènes sur les cellules immunes. En effet, il a été remarqué que ces récepteurs étaient en plus grande concentration à la surface des lymphocytes chez des enfants allergiques que chez des enfants sains. Une thérapie avec des probiotiques a permis de normaliser la quantité de ces récepteurs diminuant du coup les symptômes allergiques. De plus, les probiotiques modifient la structure des antigènes potentiellement nuisibles et peuvent ainsi rétablir une réponse immune plus modérée (Isolauri *et al.*, 2001).

En résumé, les probiotiques diminuent le risque de réactions allergiques par :

- la normalisation de la perméabilité intestinale, ce qui empêche l'activation des cellules dendritiques avec des IgE et les lymphocytes T;

- l'augmentation de la concentration d'IgA au-dessus de la muqueuse intestinale; les allergènes sont piégés par les anticorps et ne peuvent donc plus traverser la muqueuse intestinale et provoquer une réaction allergique;
- la modification de la réponse Th2 vers Th1.

1.4.10.1.3. Immunité cellulaire

Les probiotiques peuvent moduler la réponse des différentes populations de cellules T. Certains favorisent le développement d'une réponse principalement axée sur les cellules Th1, alors que d'autres stimulent la voie Th2. La bactérie *Lactococcus casei* favorise la voie Th1 chez la souris en inhibant la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5, alors que la production d'INF- γ augmente. La co-culture de cellules de la muqueuse intestinale isolées chez des volontaires avec *L. casei* DN-114 001, *L. casei* DN-114 056 ou *L. casei* ATCC 334 a diminué la production du TNF- α , favorisant ainsi la branche Th2. La présence de *Lactobacillus bulgaricus* LB-10 dans la culture n'a cependant pas modifié la production de TNF- α tandis que la souche non-pathogène *Escherichia coli* ECOR-26 a augmenté la quantité de TNF- α dans le milieu. De plus, la souche *Lactobacillus casei* DN-114 001 a pu prévenir l'augmentation du TNF- α en présence d'une souche non-pathogène d'*Escherichia coli* (Yasui *et al.*, 1999; Isolauri *et al.*, 2001). Les probiotiques peuvent aussi modifier la réponse inflammatoire en favorisant la suppression par les cellules T régulatrices. En effet, dans un modèle d'inflammation intestinale, des souris traitées avec le mélange probiotique VSL#3 ont une proportion plus grande de cellules T régulatrices produisant du TGF- β et de l'IL-10 et une diminution notable des symptômes inflammatoires (Camilleri, 2003).

1.4.11. Activité anti-cancérogène et anti-mutagène

Le cancer colorectal (CCR) est une cause très importante de mortalité dans plusieurs pays. En terme de fréquence, le CCR est le deuxième type de cancer le plus meurtrier derrière le cancer du poumon chez les hommes et le cancer du sein chez les femmes. Selon son origine génétique, le CCR peut être divisé en deux catégories : le

CCR découlant de polyposes ou ceux ne découlant pas de polyposes (Taketo, 2006). Les indices montrant que les gènes sont impliqués dans ce type de cancer proviennent de l'étude d'une forme dominante autosomale de CCR appelé polypose adénomateuse familiale (familial adenomatous polyposis; FAP en anglais). Une mutation du gène APC (adenomatous polyposis coli) situé sur le chromosome 5q21 conduit au développement de centaines de polypes sur la muqueuse intestinale lorsque les individus deviennent des jeunes adultes. Par la suite, ces polypes se développent en adénomes et en adénocarcinomes (Yang *et al.*, 1997). De nombreuses observations directes ont démontré clairement que plusieurs probiotiques ont la capacité de prévenir la formation de tumeurs (Wollowski *et al.*, 2001).

Les mécanismes d'action avancés seraient les suivants (Hirayama et Rafter, 2000; Lee et Lee, 2000; Rafter, 2002):

- Modifications des activités métaboliques du microbiote intestinal
- Stimulation de la production d'enzymes détoxifiantes;
- Liaison et dégradation des enzymes procarcinogènes : β -glucuronidase, nitroréductase, azoréductase;
- Liaison et excrétion des agents mutagènes;
- Production de composés antitumoraux et antimutagènes (ex: acide butyrique)
- Stimulation de l'apoptose des cellules tumorales

De nombreux enzymes bactériennes telles que la β -glucuronidase (EC 3.2.1.31), la nitroréductase (EC 1.6.99) et l'azoréductase (EC 1.7.1.6) sont impliquées dans la carcinogenèse intestinale puisque ces enzymes catalysent la réduction d'agents procarcinogènes en métabolites carcinogènes qui s'accumulent dans l'intestin. En effet, Kim et Jin (2001) ont établi un lien entre l'étiologie du cancer du colon et l'augmentation de l'activité de la β -glucuronidase fécale. Cette enzyme sécrétée par certains membres indigènes du microbiote intestinal, dont *E. coli* HGU-3, hydrolyserait le lien, préalablement formé dans le foie, entre l'acide glucuronique et le méthylazoxyméthanol (MAM), ce qui a pour effet de libérer immédiatement le MAM qui s'accumule en

relativement forte concentration dans la muqueuse du colon. Le MAM, métabolite dérivé du DMH, est un puissant carcinogène avec une haute spécificité pour le colon. Chez le rat, la souris et le hamster, des injections répétées de DMH provoquent des carcinomes du colon et de l'intestin grêle (Fiala, 1975). Pour étayer cette hypothèse, il a été démontré que l'administration de DMH à des souris gnotobiotiques diminuait de façon exponentielle l'incidence des cancers du colon (Reddy *et al.*, 1974). L'azoréductase convertit plusieurs drogues et colorants alimentaires qui contiennent des liaisons azotées en composés amine qui sont très souvent considérés comme toxiques, mutagènes ou carcinogènes (Nakamura *et al.*, 2002). La nitroréductase participe à la conversion du dinitrotoluène, du nitrobenzène et du nitropyrrène en amines carcinogènes (Nakamura *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont montré que l'ajout de BAL dans la diète de modèles murins ou lors d'études effectuées chez l'humain réduit l'activité de ces enzymes fécaux (Goldin et Gorbach, 1984; Rowland *et al.*, 1998). Ces observations ont amené les chercheurs à s'intéresser à la capacité antitumorale des probiotiques. D'autres études ont montré que des souches variées de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* semblaient produire des composés solubles sécrétés dans le surnageant qui auraient la capacité d'inhiber la prolifération des cellules tumorales et de réduire l'incidence des cancers. Cependant, aucun composé n'a été identifié à ce jour (Rafter, 2002; Yamazaki *et al.*, 2000)

1.4.12. Soulagement des symptômes associés à l'intolérance au lactose

L'intolérance au lactose est le résultat d'une mauvaise digestion du lactose causé par une déficience en lactase, l'enzyme qui permet de digérer le lactose et de le convertir en sucres simples facilement assimilables par l'intestin (glucose et galactose). L'intolérance au lactose n'est donc pas une allergie et est retrouvée principalement chez les personnes âgées et les individus dont la muqueuse de l'intestin grêle est en état inflammatoire (entérite, infections bactériennes ou parasitaires, syndrome de l'intestin irritable). Cependant, le lactose qui n'est pas assimilé par l'intestin fermenté et entraîne un inconfort plus ou moins important, causant des douleurs abdominales, des crampes, des

ballonnements, de la diarrhée, des flatulences ou de la nausée. Les mécanismes par lesquels l'intolérance au lactose cause ces inconforts sont très mal compris. Les diarrhées pourraient être causés par une trop grande sécrétion d'eau ou une accélération du transit intestinal dans l'intestin grêle ou une perturbation du péristaltisme et de l'absorption d'eau dans le côlon (de Vrese *et al.*, 2001). En général, les individus intolérants au lactose ne ressentent aucun inconfort lors de la consommation de laits fermentés. Ceci peut être expliqué de deux façons. La première hypothèse est que la digestion du lactose dans la lumière intestinale est réalisée par la lactase du yogourt qui a été sécrétée par les bactéries lactiques durant la fermentation. La seconde est que le yogourt a un transit intestinal plus long que le lait, ce qui permet au lactose d'être dégradé plus longtemps et d'être alors assimilé. En clinique, il a été démontré que le remplacement du lait par du yogourt ou des produits laitiers fermentés permet une meilleure digestion et diminue les diarrhées et les autres symptômes associés à l'intolérance au lactose d'individus ayant subi l'ablation d'une section de leur intestin (Marteau *et al.*, 1990). La consommation de probiotiques peut donc diminuer les symptômes associés à l'intolérance au lactose en fournissant l'enzyme digestive nécessaire. L'efficacité de plusieurs probiotiques (*Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* et de nombreux autres) à déjà été démontrée (de Vrese *et al.*, 2001; Montalto *et al.*, 2006).

1.4.13. Prévention des infections uro-génitales

Les infections uro-génitales (IUG) affectent plus de 300 millions de femmes par année dans le monde et comprennent les infections de la vessie, des reins, du vagin, de l'urètre et du col de l'utérus. Chaque infection provoque des symptômes durant en moyenne 6 jours. Le traitement des IUG représente un coût énorme pour le système de santé en Amérique du Nord. Les IUG non soignées chez les femmes enceintes peuvent provoquer des fausses couches et des accouchements prématurés allant jusqu'à la mort du foetus. La principale cause des IUG est la présence d'uropathogènes en provenance de l'intestin tels que *E. coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, autres *Enterobacteriaceae* et *Enterococcus faecalis*. Le traitement habituel consiste en la prise d'antibiotiques ce qui soulage les IUG en 1-7 jours (Reid, 2001; Reid *et al.*, 2004). Cependant, le problème est

que la résistance bactérienne aux antibiotiques (triméthoprime/sulfaméthoxazole, clindamycine, métronidazole) est en augmentation (Reid *et al.*, 2001). Une des solutions alternatives à ce problème consiste à consommer du jus de canneberge contenant des molécules qui empêchent les uropathogènes d'adhérer aux muqueuses génitales (Kontiokari *et al.*, 2001). La vaginose bactérienne est définie comme une infection bénigne du tractus génital des femmes et est caractérisée par la présence de 3 des 4 critères énoncés ci-dessous :

- libération d'amines (putrescine, cadavérine et triméthylamine) ou une odeur de poisson après ajout d'hydroxyde de potassium;
- pH vaginal > 4.5;
- débalancement du microbiote vaginal :
 - normal** - microbiote dominé par des lactobacilles;
 - intermédiaire** - microbiote colonisé par des bactéries Gram-, des bâtonnets Gram variable (*Bacteroides*, *Gardnerella* ou *Mobiluncus*) ;
 - vaginose** - microbiote dominé par les pathogènes
- décharge vaginale laiteuse.

Une muqueuse vaginale saine est complètement recouverte et colonisée par > 50 espèces bactériennes, en majorité des lactobacilles. Les uropathogènes proviennent de l'intestin et réussissent d'une façon encore incomprise à traverser les barrières bactériennes, à survivre aux différentes conditions adverses, à coloniser la muqueuse vaginale et même à se multiplier. Finalement, ces pathogènes peuvent poursuivre leur route vers la vessie. Plusieurs facteurs sont soupçonnés d'avoir un rôle à jouer dans l'incidence des vaginoses tels que: les concentrations hormonales (en particulier l'œstrogène), les changements induits par la contraception orale, une modification du pH vaginal, une thérapie stéroïdienne, l'immunosuppression, une maladie comme le diabète sucré, le cycle menstruel ou la modulation du microbiote vaginal par la prise d'antibiotiques et l'utilisation de spermicides.

Le Tableau 1.8 résume quelques-unes des études cliniques démontrant une certaine efficacité à prévenir les vaginoses bactériennes.

Tableau 1.8. Études cliniques impliquant la consommation de probiotiques dans la prévention des vaginoses.

Probiotique	Administration	Effets thérapeutiques ^a	Durée du traitement (jours)	Population à l'étude (n =)	Référence
<i>L. fermentum</i> <i>L. casei</i> <i>L. gasseri</i>	Tampon de bactéries lyophylisées	44% / 38%	28	vaginose	Eriksson <i>et al.</i> , 2005
Métronidazole + <i>L. rhamnosus</i> GR-1	Capsules de bactéries lyophylisées	-88% de guérison / 40% ↑ <i>Lactobacillus</i> sp. chez 96% des femmes du groupe probiotique	30	125 femmes africaines pré-monopausées avec vaginose	Anukam <i>et al.</i> , 2006
<i>L. reuteri</i> RC-14 ou placebo <i>L. rhamnosus</i> GR-1	Capsules de bactéries lyophylisées	- aucun effet secondaire - retour à un microbiote vaginal normal chez 37% probiotique contre 13 % placebo - ↑ <i>Lactobacillus</i> sp. - ↓ levures et coliformes	60	64 femmes en bonne santé	Reid <i>et al.</i> , 2003a
<i>L. fermentum</i> RC-14 <i>Lactobacillus</i> sp	Capsules <i>Lactobacillus</i> sp (Doderlein Med)	37% probiotique contre 13 % placebo - ↑ temporaire <i>Lactobacillus</i> sp. - Les auteurs concluent à la non-nécessité d'utiliser les probiotiques	5	70 avec vaginose	Wewalka <i>et al.</i> , 2002

^a: % de sujets montrant les symptômes de vaginoses dans le groupe probiotique vs le groupe témoin, respectivement.

Mode d'action anti-uropathogènes des probiotiques (Reid et Burton, 2002; Reid *et al.*, 2003b)

- Excellente capacité d'adhésion et de colonisation de la muqueuse vaginale afin d'occuper tous les sites disponibles, ce qui prévient l'adhésion des pathogènes;
- Acidification du pH vaginal;
- Production de molécules antimicrobiennes : peroxyde d'hydrogène, bactériocines, acides organiques;

- Sécrétion de biosurfactants afin d'empêcher l'adhésion des pathogènes à la muqueuse vaginale;
- Excrétion de molécules de coaggrégation afin d'empêcher la dispersion des uropathogènes.

1.4.14. Amélioration de l'équilibre lipidique

Mann et Spoerry (1974) ont été les premiers à faire un lien entre la consommation de laits fermentés et une réduction du cholestérol chez les peuples Maasai. Depuis cette époque, de nombreuses études effectuées sur des animaux ont prouvé la capacité de souches spécifiques de BAL à réduire le cholestérol sanguin. Cependant, les études cliniques humaines ne sont pas aussi convaincantes (Tableau 1.9). Par exemple, Lin *et al.*, (1989) ont montré une réduction du cholestérol sérique de 5,7 à 5,3 mM après 7 semaines et de 5,4 mM après 16 semaines de consommation de *L. acidophilus* et de *L. bulgaricus*. La concentration de cholestérol sérique n'avait pas varié dans le groupe témoin. Toutefois, dans une deuxième étude en double aveugle contre un groupe placebo réalisée sur 460 volontaires, la consommation de ces souches bactériennes n'a eu aucun effet. Schaafsma *et al.*, (1998) ont montré qu'un groupe d'individus ayant consommé un yogourt enrichi de *L. acidophilus* et de fructo-oligosaccharides a permis de réduire le cholestérol sérique tandis que dans l'étude réalisée par de Roos *et al.* (1999), aucune modification n'a été mesurée. De nombreux facteurs comme les différences dans le protocole expérimental, les sujets à l'étude, la quantité de laits fermentés consommés et les souches de BAL, seraient la raison de ces variations lors des études cliniques.

En résumé, les probiotiques peuvent normaliser les taux de cholestérol et de triglycérides, surtout chez les personnes en surcharge pondérale, par divers mécanismes:

- **déconjugaison du cholestérol;**
- **↑ de la capture et de l'excrétion du cholestérol;**
- **rétablissement de la balance HDL/LDL;**
- **stimulation de certains enzymes impliqués dans la transformation des acides gras**

Tableau 1.9. Études cliniques montrant l'influence de la consommation de probiotiques sur les lipides sanguins.

Probiotiques	Design expérimental	Effets thérapeutiques	Population à l'étude (n =)	Références
Kéfir (Liberté)	double aveugle, placebo, 6 semaines	- pas d'effets sur: HDL, LDL, triglycérides, cholestérol - ↑ bactéries fécales	13 hommes hypercholestérolémie	St-Onge et al., 2002
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	double aveugle, placebo, 6 semaines	- ↓ pression sanguine - ↓ leptine et fibrinogène - ↓ isoprostane et IL-6 donc ↓ des risques de maladies cardio-vasculaires	36 hommes/femmes 35-45 ans fumeurs	Naruszewicz et al., 2002
<i>L. acidophilus</i> 145	double aveugle, placebo, 21 semaines	- ↑ HDL - ↓ ratio LDL/HDL	29 femmes 19-56 ans	Kiessling et al., 2002
<i>B. longum</i> 913 + oligofructose		- pas d'effets sur cholestérol total et LDL	15 normocholestérolémie 14 hypercholestérolémie	
<i>L. acidophilus</i> DDS-1	double aveugle, placebo, 6 semaines	- le soya ↓ cholestérol total (2.2%)	37 femmes post ménopause	Greany et al., 2004
<i>B. longum</i> + protéines de soya		-le soya ↓ LDL (3.5%) -le soya ↑ HDL (4.2%) -soya + probiotiques n'est pas mieux	hypercholestérolémie	
<i>L. acidophilus</i>	double aveugle, placebo, 4 semaines	- pas d'effets sur: HDL, LDL, triglycérides, cholestérol	13 hommes/femmes hypercholestérolémie	Lewis et Burmeister, 2005
<i>L. acidophilus</i> L1	double aveugle, placebo, 4 semaines	↓ cholestérol sérique total -pas d'effets sur: HDL, LDL, triglycérides	40 hommes/femmes hypercholestérolémie	Anderson et Gilliland, 1999
<i>Enterococcus faecium</i> 2 souches de <i>S. thermophilus</i> CAUSIDO	double aveugle, placebo, 8 semaines	↓ LDL (8.4%) et ↑ fibrinogène chez les sujets en obèses	70 hommes/femmes poids santé ou obèse (18-55 ans)	Agerholm-Larsen et al., 2000
<i>Enterococcus faecium</i> 2 souches de <i>S. thermophilus</i> CAUSIDO	double aveugle, placebo, 6 mois	↓ LDL et du cholestérol total après 1 mois -pas de différence entre le groupe CAUSIDO et le groupe placebo après 6 mois→ effet hypocholestérolémiant du placebo -pas d'effets sur HDL et triglycérides	87 hommes/femmes (50-70 ans), normocholestérolémie, non obèse	Richelsen et al., 1996

Tableau 1.9
(suite)

<i>Enterococcus faecium</i>	double aveugle, placebo, 6 semaines	↓ LDL (10%) et du cholestérol total -pas d'effets sur HDL et triglycérides	58 hommes (44 ans), normocholestérolémie, non obèse	Agerbaek et al., 1995
2 souches de <i>S. thermophilus</i> CAUSIDO				
<i>L. acidophilus</i>	4 groupes avec des concentrations cholestérol semblable, 20 jours	↓ LDL et du cholestérol total chez les groupes avec des taux de cholestérol moyen à élevé	27 hommes/femmes concentrations croissantes de cholestérol	Ashar et Prajapati, 2000
Yogourt + <i>L. acidophilus</i> + FOS	double aveugle, placebo, 3 semaines	↓ LDL (4.4%) ↓ cholestérol total (5.4%) ↓ ratio LDL/HDL (5.3%) -pas d'effets sur triglycérides, HDL, glucose sanguin	30 hommes 33-64 ans	Schaafsma et al., 1998
<i>L. casei</i> TMC0409	double aveugle, placebo, 8 semaines	-↑ HDL ↓ triglycérides	20 hommes hypercholestérolémie	Kawase et al., 2000
<i>S. thermophilus</i> TMC1543		↓ pression sanguine systolique		
Lait fermenté <i>B. longum</i> BL1	double aveugle, placebo, 4 semaines	↓ cholestérol total	32 hommes (28-60 ans) hypercholestérolémie	Xiao et al., 2003

1.5. BUT, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DU PROJET

1.5.1. But

Cette étude a pour but de démontrer l'influence de bactéries lactiques d'origine humaine et productrices de bactériocines à moduler le microbiote intestinal et à prévenir la colonisation intestinale par une bactérie pathogène résistante aux antibiotiques.

1.5.2. Hypothèses

1- Les BAL originant de l'intestin humain à potentiel probiotique (*Lactobacillus acidophilus* et *L. casei* composant le ferment CL1285 de Bio-K+ International Inc. et *L. rhamnosus* RW-9595M d'Agriculture et Agro-alimentaire Canada) possèdent une grande capacité antimicrobienne contre des bactéries pathogènes alimentaires et cliniques.

2- Il est possible d'isoler de l'intestin humain des BAL productrices de bactériocines. Ces BAL résistent au transit gastro-intestinal et ont la capacité de moduler les populations microbiennes du microbiote intestinal chez des souris en santé.

3- La consommation de BAL productrices de bactériocines permet de prévenir ou éliminer une infection intestinale causée par *Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV).

1.5.3. Objectifs spécifiques

Afin de répondre correctement aux hypothèses, sept objectifs de recherche ont été établis :

Objectif 1 : Déterminer la capacité antimicrobienne et le spectre d'inhibition du CL1285 et de *L. rhamnosus* RW-9595M par comparaison avec des probiotiques reconnus.

Objectif 2 : Déterminer les mécanismes antimicrobiens du ferment CL1285 et du lait fermenté produit par Bio-K+ international Inc.

Objectif 3 : Isoler à partir de fèces humaines des BAL potentiellement productrices de bactériocines.

Objectif 4 : Caractériser l'activité antimicrobienne du surnageant de culture des BAL isolées de fèces humaines.

Objectif 5 : Purifier et identifier les bactériocines sécrétées par ces BAL d'origine humaine.

Objectif 6 : Démontrer que les BAL productrices de bactériocines ont la capacité de moduler les populations dans le microbiote intestinal de souris en santé.

Objectif 7 : Démontrer la capacité de BAL productrices de bactériocines à prévenir ou éliminer la colonisation intestinale par *Enterococcus* résistant à la vancomycine.

1.5.4. Moyens pour atteindre les objectifs

Objectif 1 : La démonstration du potentiel antimicrobien des BAL a été effectuée avec les tests de diffusion sur gélose et de diffusion dans des puits contre plusieurs genres et espèces de bactéries Gram + et Gram -.

Objectif 2 : Afin de déterminer les molécules antimicrobiennes produites par les BAL, un test d'inhibition bactérienne dans des plaques 96 puits a été mis en place. Le surnageant provenant du lait fermenté par le CL1285 a été testé directement, neutralisé ou irradié afin d'éliminer l'effet antimicrobien de l'acidité et des bactériocines potentiellement présentes dans la préparation.

Objectif 3 : Des fèces humaines ont été recueillies et des colonies provenant de ces fèces ont été isolées après ensemencement en surface sur des géloses MRS et incubation dans une atmosphère anaérobie. L'activité antibactérienne de chaque colonie a été évaluée par un test de diffusion dans des puits.

Objectif 4 : L'influence sur l'activité antimicrobienne du surnageant des souches de *L. lactis* MM19 et *P. acidilactici* MM33, d'enzymes, d'agents chimiques, de la température, du pH et de l'irradiation a été évaluée avec le test de diffusion dans des puits tandis qu'un SDS-PAGE couplé à un test de diffusion sur gélose a permis d'estimer le poids moléculaire des molécules antibactériennes.

Objectif 5 : La purification de la pédiocine a été réalisée par une chromatographie échangeuse de cations suivi d'un traitement avec des cartouches Sep-Pak C18. L'identification de la séquence d'acides aminés et la détermination précise du poids moléculaire de la pédiocine ont été effectuées par spectrométrie de masse. La séquence nucléotidique des gènes de production des bactériocines produites par *L. lactis* MM19 et *P. acidilactici* MM33 a été déterminée par l'amplification élective avec des amorces de la nisin et de la pédiocine PA-1/AcH en utilisant un appareil PCR.

Objectif 6 : L'influence des BAL productrices de bactériocines sur le microbiote intestinal a été étudiée en gavant durant 3 semaines des souris C57Bl/6 et en dénombrant diverses populations fécales sur des géloses sélectives.

Objectif 7 : L'implication de la production de bactériocines dans l'action anti-infectieuse des BAL a été réalisée en utilisant un modèle murin d'infection à ERV développé par Donskey *et al.* (2001). La comparaison avec une souche non-bactérocinogène a permis de démontrer l'importance de ce type de molécules antimicrobiennes.

CHAPITRE 2

Publication 1

Running head: Probiotic properties of *Lactobacillus*

Characterization of *Lactobacillus* strains with high probiotic potential

M. Millette^a, F. M. Luquet^b, M. T. Ruiz^b and M. Lacroix^a.

^a : INRS-Institut Armand-Frappier

Research Laboratories in Sciences Applied to Food

Canadian Irradiation Center

531, Boulevard des Prairies

Laval, QC, H7V 1B7, Canada

^b : Bio-K Plus International Inc.

495, Boulevard Armand-Frappier

Laval, QC, H7V 4A7, Canada

Ce chapitre a été soumis en décembre 2006 dans l'International Journal of Food Microbiology, mais il a été refusé. À la suite des commentaires de l'éditeur du journal ainsi que des évaluateurs de la thèse, de nombreuses corrections ont été apportées à l'article. Il a été soumis au périodique Le Lait en juillet 2007.

2.1. Contributions des auteurs

J'ai imaginé, mis au point, réalisé toutes les expériences et rédigé le manuscrit scientifique. De plus, j'ai supervisé un stagiaire qui m'a assisté lors des études préliminaires qui ont mené aux résultats démontrant le potentiel antipathogène *in vitro* du nouveau probiotique CL1285. Le Dr. François-Marie Luquet est le directeur scientifique de Bio-K+ International Inc. Il a approuvé le projet et participé aux discussions scientifiques. La Dr. Marcia Ruiz a participé aux discussions scientifiques et a corrigé le manuscrit. Prof. Monique Lacroix était la responsable scientifique et la coordinatrice du projet de recherche. De plus, Prof. Lacroix a supervisé l'élaboration des protocoles et les discussions scientifiques entourant ce projet. Elle a révisé le manuscrit.

2.2. Résumé en français

Propriétés probiotiques de nouveaux lactobacilles

Les souches *Lactobacillus acidophilus* et *L. casei* sont utilisées dans la production d'un lait fermenté probiotique. La capacité de ces souches à inhiber la croissance de pathogènes bactériens alimentaires (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus*), de bactéries responsables de l'altération des aliments ou d'infections nosocomiales (*Enterococcus faecalis*, *Ent. faecium*, *E. coli*, *Listeria innocua*) a été évaluée. Un mélange de cultures microbiennes [lactobacilles probiotiques: pathogènes], à un fort ratio de $[10^8:10^4]$ a été incubé à 37°C durant 48 h sous agitation à 200 rpm. Les résultats ont montré qu'après 48 h de fermentation, aucun pathogène viable n'a été détecté tandis que 10^9 ufc/ml de lactobacilles a été dénombré. De plus, en présence des lactobacilles, le taux de division pour tous les pathogènes à l'étude était ralenti après seulement 8 h de fermentation. La capacité de survie du ferment probiotique au transit gastro-intestinal *in vitro* a aussi été évalué et comparé à d'autres espèces de lactobacilles. L'impact de l'ingestion de nouveaux probiotiques sur le microbiote fécal de souris C57Bl/6 a été réalisé par dénombrements des populations microbiennes sur géloses sélectives. Les résultats ont montré que le gavage quotidien avec des probiotiques a permis d'augmenter la concentration des bactéries lactiques tout en diminuant la population de staphylocoques.

2.3. Abstract

Lactobacillus acidophilus and *L. casei* strains that are used to produce a probiotic fermented milk have been evaluated for their potential to inhibit the growth of selected foodborne pathogens (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus*) and bacterial strains, responsible for food contamination or nosocomial infections (*Enterococcus faecalis*, *Ent. faecium*, *E. coli*, *Listeria innocua*). A mixed culture of [probiotic lactobacilli: pathogen], at a high ratio of [$10^8:10^4$] was incubated at 37°C for 48 h under agitation at 200 rpm. Results showed that after 48 h of fermentation, no viable pathogen was detected while a level of 10^9 cfu/ml of lactobacilli was enumerated. Moreover, in the presence of lactobacilli, the growth rate of all pathogens tested was delayed after only 8 h of fermentation. The ability to survive simulated gastrointestinal passage was also evaluated and compare to other probiotics. The impact of the ingestion of novel probiotics on the fecal microbiota using selective plating was also realized. Results showed an increase of total culturable LAB and a decrease in *Staphylococcus* spp. population in the LAB-treated mice indicating that these culture could improved the intestinal health. Also, reduction in fecal *Enterobacteriaceae* was noticed following mice feeding with *L. rhamnosus* ATCC 9595 while a higher enumeration was measured for *L. rhamnosus* RW-9595M, an exopolysaccharide-overproducing mutant. These contradictory results were discussed.

Keywords: Probiotic, *Lactobacillus*, probiotic, antimicrobial, gastrointestinal, microbiota

2.4. Introduction

According to De Buyser *et al.* (2001), milk and its derivates are responsible for 1 to 5% of the total bacterial outbreaks in seven industrialized countries. *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* are the main etiologic agents of these contaminations (De Buyser *et al.*, 2001). Mead *et al.* (1999) estimated that foodborne diseases in United States cause annually 76 million illnesses, 325,000 hospitalizations, and 5,000 deaths. Altekruze *et al.* (1998) concluded that ripening alone cannot prevent entirely the risk of contamination associated with many pathogenic bacteria in milk and other food products. Lactic acid bacteria (LAB) play a significant role in fermented foods (Nettles et Barefoot, 1993; de Roissart et Luquet, 1994) and many strains are routinely used as starter cultures in order to increase the shelf-life of milk, vegetable, grain, meat and bakeries (Abee *et al.*, 1995). The shelf-life improvement is essentially due to the production of metabolite compounds such as lactic acid, bacteriocins (acidocin, acidophilin, lacticin, nisin), and hydrogen peroxide (Luquet et Corrieu, 2005). These antimicrobial compounds are produced by LAB in order to increase their competitiveness. They also could be used to decrease the number of pathogenic bacteria responsible of food poisoning, such as *E. coli* (Goh *et al.*, 2002), *Salm. enterica* serovar Typhimurium (Cody *et al.*, 1999), *S. aureus* (Asao *et al.*, 2003) or *List. monocytogenes* (Dalton *et al.*, 1997). Moreover, antibiotic-resistant bacteria kill 8000 persons/year in Canadian hospitals (Spurgeon, 2006). The most involved bacteria are *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Enterococcus faecium* and *Streptococcus pneumoniae* (Conly, 2002). The use of LAB can help to control infections and illnesses caused by *Enterococcus* spp. (Mangiante *et al.*, 2001). It is well-known that numerous enterococci are responsible for outbreaks of illness in many hospital complexes because of their resistance to wide-spectrum antibiotics such as ampicillin, gentamicin and vancomycin (Handwerger *et al.*, 1993; Roger *et al.*, 1999).

Some strains of LAB can be considered as probiotic bacteria. Probiotics can be defined as live microorganisms, which when consumed in adequate amounts, confer a

health effect on the host (FAO/WHO, 2006). Many studies have demonstrated the efficiency of probiotics to offer a proper alternative to the use of antibiotics in the treatment of enteric infection (Mack *et al.*, 1999) or to reduce the symptoms of antibiotic-associated diarrhea (Marteau *et al.*, 2001). A *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* fermented milk containing over 50 billions of live bacteria per portion of 98 g have been successfully used to prevent *Clostridium difficile*-associated and antibiotic-associated diarrhea at Maisonneuve-Rosemont hospital in Montréal, Québec, Canada (Beausoleil *et al.*, 2004).

Viability and survival of probiotic bacteria are important characteristics in order to provide health benefits. Many factors have been claimed to affect the viability of LAB in dairy foods, including processing of the food and storage temperature. Also, probiotic should survive the gastro-intestinal transit to finally colonize the gut. Natural resistance to gastro-intestinal transit varies between LAB species (Charteris *et al.*, 1998). Indeed, certain strains have the capacity to resist more easily under the extreme acidity of stomach or to the bile salts in the small intestine (Grill *et al.*, 1995; Truelstrup Hansen *et al.*, 2002). The stomach pH depends on its content and can vary from 1.5 to 3. According to Gänzle *et al.* (1999), the pH of the stomach 35 min after the ingestion of meat is 3.0; 2.5 after 50 min, 2 after 70 min and 1.8 after 120 min. The time of transit in the stomach would be 30 min for liquid (milk) and 140 min for meat. According to Goldin *et al.* (1992), the ingestion of food or dairy products would tend to increase the pH of the stomach to 3 or more. The ingestion of LAB requires a short passage in the esophagus followed by a stomach transit and a transfer to the duodenum, jejunum, ileum and finally, the colon. The presence of bile salts is another factor which can affect the bacterial survival (Charteris *et al.*, 2000). Pochart *et al.* (1992) showed that after ingestion of 1×10^{10} in 400 g of fermented milk by six fasting healthy adults, about 23.5% of the bifidobacteria have been recovered in the terminal ileon. They could quantify the bifidobacteria concentration in samples recuperated via intestinal perfusion. Marteau *et al.* (1997) compare a dynamic *in vitro* model that simulates the gastrointestinal tract to human *in vivo* data to follow the passage in the intestine of bifidobacteria and *L. acidophilus*. They showed that about 30% of the bifidobacteria ingested were recovered

after 8 h either in the ileum of human volunteer and ileal compartment the model, while only 10% of the *L. acidophilus* has been recovered in the same way.

A desirable characteristic of probiotics is their capacity to modulate the intestinal microbiota (Rastall *et al.*, 2004). Although, some studies did not demonstrate that probiotic consumption can influence this complex ecosystem (Zoetendal *et al.*, 1998; Tannock *et al.*, 2000), some others showed a significant difference (Figler *et al.*, 2006; Marzotto *et al.*, 2006; Mohan *et al.*, 2006). Thus, it could be possible that this capacity is strain-dependant, variable following the duration of the treatment and the ingested quantity, but also according to the mode of delivery (lyophylized powder in capsule or active bacteria in fermented milk). Cinquin *et al.* (2006) have studied the prebiotic effect of exopolysaccharides produced by *L. rhamnosus* RW-9595M using a three-stage chemostat containing immobilized infant fecal microflora. The purified polysaccharide was not metabolized by the infant microbiota and lacked prebiotic effect. However, there are no data reporting the capacity of this live bacterial strain to modulate the intestinal microbiota *in vivo*. This study will compare the ability of the exopolysaccharide-producing strain to the wild type *L. rhamnosus* ATCC 9595 and to a probiotic *L. acidophilus/L. casei* mixture.

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial potential of a *L. acidophilus/L. casei* probiotic mixture to inhibit the growth of pathogenic bacteria during milk fermentation. The efficiency of these lactobacilli was also evaluated by the estimation of the generation time of pathogenic bacteria during fermentation. The bile salts and acid tolerance of these strains was also evaluated and compared to other probiotics. Finally, the safety and the capacity of various probiotic bacteria to modulate the fecal microbiota of C57Bl/6 mice were also evaluated over the course of a three-week feeding trial.

2.5. Material and Methods

2.5.1. Bacterial strains

The probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* (6 different strains) and *L. casei* (patented CL1285 mixture) were provided by Bio-K+ International Inc. (Laval, QC, Canada). These strains were previously isolated from human intestine (personnal communication). We received the strains already mixed in Lactobacilli MRS broth (MRS; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). *Escherichia coli* ATCC 25922, *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). *Enterococcus faecalis* LSPQ 2724 and *Enterococcus faecium* LSPQ 3550 were obtained from Laboratoire de Santé Publique du Québec (Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada). *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 (*S. Typhimurium*) were provided by Charles Dozois (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada) while *L. rhamnosus* ATCC 9595 and *L. rhamnosus* RW-9595M were provided by Agriculture and Agri-Food Canada (St-Hyacinthe, QC, Canada). Lactobacilli were propagated in MRS broth at 35 °C for 24 h. All other bacteria were propagated in Brain-Heart Infusion broth (BHI; Difco Laboratories) at 35 °C for 24 h. Bacterial strains were stored at -80 °C in their respective media containing 10% (w/v) glycerol (Laboratoires MAT, Montreal, QC, Canada). Before each experiment, the bacterial content of one vial was thawed, transferred to 9 ml of their respective media and activated by two consecutive inoculations and incubation for 24 h at 35 °C. Thereafter, bacteria were washed twice in sterile saline (0.85% w/v) after centrifugation at 4 °C for 10 min at 6000 × g.

2.5.2. Fermentation of mixed cultures

Forty (40) ml of skim milk (10% w/v) in water, sterilized at 110 °C for 20 min was used as the fermentation substrate. Activated and washed CL1285 mixture was diluted in 12 ml of saline and 1 ml of this suspension was added to the milk in order to obtain an initial population of 10^8 cfu/ml. The milk was then inoculated with pathogenic

bacteria (10^4 cfu/ml). Two groups were evaluated: 1) group containing pathogenic bacteria alone; 2) group containing a mixture of pathogens and CL1285 mixture.

2.5.3. Microbial analysis

Samples of microbial suspension (1 ml) were taken at 0, 4, 8, 24 and 48 h of fermentation in order to evaluate the concentration of each bacterium in milk. Bacterial enumeration was done using pour plate method on selective media. LAB were screened on MRS agar; *S. aureus* were pour-plated on Baird-Parker Agar (Difco), *E. coli* and *Salm. Typhimurium* were enumerated on MacConkey (Difco) and Enterococcus agar (Difco) was used for enumeration of *Ent. faecalis* and *Ent. faecium*. *List. innocua* was plated on Palcam agar (Difco). All dishes were incubated at 35 °C from 24 to 48 h and colonies were counted using Darkfield Quebec Colony Counter (American Optical, Scientific instrument division, Keene, OH, USA). All the *Lactobacillus* sp. used in this study showed typical colonies when grown on MRS agar in the conditions described above. Among all the pathogens tested, only both enterococci can grow on this media but colonies were very different from those of *Lactobacillus* sp. Thus, the selective enumeration of *Lactobacillus* sp. was easily realized.

2.5.4. Calculation of the generation time

The antimicrobial capacity of the probiotic culture was evaluated by calculation of the generation time of the pathogen during the exponential growth phase, in absence or in presence of lactobacilli. The generation time is derived from the division rate according to the following formulas (Prescott *et al.*, 2003):

$$k = [(\log N_t - \log N_0)/0.301 \times t]$$

$$g = 1/k$$

where k is the division rate, g is the generation time, $\log N_t$ is the microbial enumeration after $t = 8$ hours of fermentation and $\log N_0$ is the microbial enumeration after 4 h.

2.5.5. Acid tolerance of LAB

Simulated gastric fluid (SGF) was formulated according to *United States Pharmacopeia* (USP) (Le Tien *et al.*, 2004). Briefly, SGF was composed by 3.2 g/l of pepsin (Sigma), 2.0 g/l NaCl and pH was finally adjusted to 1.5, 2.0, 2.5 or 3.0 by addition of HCl (5 M). A volume of one ml of an overnight MRS broth cultures of LAB were added to 19 ml of SGF for 30 min at 37 °C under mild agitation (200 rpm) in a G24 Environmental Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc., NJ, USA). After 30 min in gastric solution, 1 ml was collected and mixed in sterile PBS (pH 7.4). A similar process was carried out for bacteria without the acidic treatment in order to determine the initial concentration of LAB.

2.5.6. Viable cell determination

Appropriate dilutions from these samples were done in sterile peptone water (0.1% w/v) and plated (pour-plate method) on MRS agar. Plates were incubated under aerobic conditions at 35 °C for 48 h. The average number of colony-forming units (cfu) from triplicate analysis was determined using a Darkfield Quebec Colony Counter.

2.5.7. Bile salt tolerance of LAB

The bile salt tolerance of probiotic LAB was determined using a method described by Casey *et al.* (2004). Briefly, MRS agar containing a commercial preparation of bile salts normally used to inhibit growth of Gram positive bacteria in broth. Bile salts mixture (Sigma B-3426, Oakville, ON, Canada) was added in concentrations varying between 0 and 10% (w/v). Bile salts containing-MRS agar was then autoclaved for 15 min at 121 °C, cooled and plated. Overnight MRS broth cultures (100 µl of bacteria in the stationary phase of growth) were inoculated on surface of bile salts-containing MRS agar and incubated at 37 °C for 72 h under anaerobic conditions. Presence of bacterial lawn indicated a good growth and thus good resistance of bacteria to bile salts while presence of small and isolated colonies indicated a poor resistance to bile salts. Absence of colonies indicated that the LAB did not tolerate the bile salt concentration assayed. Minimal inhibitory concentration represented the lowest concentration of the bile salts assayed totally inhibiting the growth of colonies as judged from visual examination.

2.5.8. Animals

Six- to eight-week-old female C57Bl/6 mice were housed in plastic cages and kept under pathogen-free conditions with free access to commercial chow and water. This work was approved and supervised by the INRS-IAF Animal Care Committee.

2.5.9. Oral feeding of mice

Four healthy mice received a daily dose of about 10^9 viable bacteria (CL1285 mixture, *L. rhamnosus* ATCC 9595 or *L. rhamnosus* RW-9595M) in 100 μl of phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 by intragastric route using a stainless steel feeding needle and a 1-ml syringe. Mice were weighed at day 1, 9, 18, and then 9 days after the end of the feeding treatment (day 27-post feeding) and any signs of physiological or psychological perturbation were noticed along the experiment. Stool samples were collected before the administration of PBS or probiotics and at day 1, 9 and 18 after the beginning of the feeding procedures. Final analysis was done 9 days after the end of the treatment (day 27-post feeding). Two independent repetitions were done for a total of eight mice in each experimental group.

2.5.10. Quantification of stool organisms

Fresh stool samples were weighed, diluted in 1000 μl of sterile saline, homogenized with a pestle, 10-fold serially diluted in 0.1% peptone water and finally 100 μl were inoculated on the following media: MRS agar for detection of total lactic acid bacteria (LAB), Rogosa SL agar for detection of *Lactobacillus* spp., Reinforced Clostridium Medium (RCM) for quantification of total anaerobic mesophilic bacteria, Baird-Parker agar (BPA) for detection of *Staphylococcus* spp. and MacConkey agar for enumeration of *Enterobacteriaceae*. MRS, Rogosa and RCM plates were incubated in anaerobic jars at 37 °C for 72 h while BPA and MacConkey plates were incubated under aerobic conditions at 37 °C for 48 h. The lower limit of detection was 10^2 microorganisms per mg feces.

2.5.11. Statistical analyses

Fermentation, acid resistance and bile salts tolerance experiments were carried out in triplicate. For each replication, three samples were analyzed. Student-*t* test was done using statistics SPSS program (version 10.1) to determine if there is a significant difference between the generation time of the pathogen alone, the pathogen in presence or in absence of probiotic lactobacilli mixture. Student-*t* test was also done to evaluate if there is a significant difference of viability between LAB population before and after acid treatment. Finally, analysis of variance (ANOVA) was done to verify if there is a significant difference of microbial population in feces of mice fed with various probiotics. Data were analyzed at a 5% level of significance.

2.6. Results

2.6.1. Antimicrobial activity of *L. acidophilus* and *L. casei* probiotic strains

Figure 2.1 (A-G) shows the growth of various pathogenic bacteria when cultured alone or in presence of the CL1285 culture. Most pathogens were completely eliminated in 48 h of fermentation in co-culture (Figure 2.1 A-D and G). Figure 2.1E shows the growth of *Ent. faecalis* LSPQ 2724. The concentration of *Ent. faecalis* increased from 3.8 to 8.71 \log_{10} cfu/ml after 48 h of fermentation alone. In presence of CL1285, the concentration of *Ent. faecalis* increased from 3.14 and 7.45 \log_{10} cfu/ml after 24 h. Indeed, in presence of LAB, the concentration of *Ent. faecalis* decreased by 1.6 \log_{10} cfu/ml after 8 h of fermentation as compared to the sample without LAB. Thereafter, the *Enterococcus* content remain rather stable until the end of the experiment at a level of 6.93 \log_{10} cfu/ml, representing a reduction of 1.78 \log_{10} cfu/ml as compared to monoculture. Figure 2.1F shows the growth of *Ent. faecium* LSPQ 3550. When cultured alone, the *Ent. faecium* concentration increased from 3.58 to 8.86 \log_{10} cfu/ml in 48 h. When *Ent. faecium* was tested in presence of CL1285 culture, the concentration of *E. faecium* increased from 3.05 to 6.23 and 7.98 \log_{10} cfu/ml after 8 and 24 h of fermentation, respectively. Then, the concentration of *E. faecium* decreased to 5.62 \log_{10} cfu/ml after 48 h. Reductions of 1.79, 0.48 and 3.24 \log_{10} cfu/ml were noticed after 8, 24 and 48 h of fermentation when both bacteria were mixed together as compared to the media containing *Ent. faecium* only.

Generation times of the pathogenic bacteria in absence or in presence of CL1285 after 8 h of fermentation are presented in table 2.1. Generation time of *E. coli* ATCC 25922 increased from 69.8 to 174.0 min when cultivated in presence of CL1285, representing an increase of 256%. Generation times of *E. coli* O157:H7, *List. innocua* and *Salm. Typhimurium* increased from 34.4 to 71.5, from 41.8 to 99.0 and from 52.7 to 107.8 min, respectively. These results represented an increase of the generation time by approximately 200%. *S. aureus* generation time increased from 45.7 to 301 min representing an increase of the generation time by 657% times. The presence of CL1285

increased the division time of *Ent. faecium* and *Ent. faecalis* from 37.8 to 53.1 and from 46 to 62.3 min, representing an increase of the generation time of 140 and 135% respectively.

2.6.2. Survival of gastrointestinal transit

The growth of LAB in MRS in presence of an increasing concentration of bile (0-10%) salts was evaluated in order to verify the tolerance of the probiotic CL1285 to bile. The minimal inhibitory concentration of the bile salts mixture was 5% for both bacteria (data not shown). Moreover, results presented in Table 2.2 show that both bacteria can survive at an acidic environment during 30 min. No significant difference ($P > 0.05$) was observed between initial microbial population at 0 and 30 min for $\text{pH} \geq 2.5$ while significant reduction was observed at pH 2 for both bacteria and no bacterial viability was detected after 30 min at pH 1.5.

2.6.3. Modulation of the fecal microbiota

The composition of microbial populations in C57Bl/6 mice fecal samples during the trial is shown in figures 2.2 – 2.6. The LAB counts in the mice feces were significantly higher after 18 days of CL1285 ingestion than after PBS ingestion ($P \leq 0.05$). However, after feeding ended, the level of LAB was similar to its initial count. Ingestion of *L. rhamnosus* ATCC 9595 led to a significant decrease of LAB count ($P \leq 0.05$) after 9 days of feeding while an increase was observed after 18 days of feeding. The high level of LAB population was also observed after feeding ended (Figure 2.2). The same observations were noticed in mice fed with *L. rhamnosus* RW-9595M but LAB count variations were not statistically significant. *Lactobacillus* spp. population were not affected significantly ($P > 0.05$) by the bacterial composition of all probiotics evaluated (Figure 2.3). As observed for lactobacilli, fecal *Enterobacteriaceae* counts were not affected quantitatively by the presence of CL1285 or *L. rhamnosus* RW-9595M. However, after 18-days of feeding with *L. rhamnosus* ATCC 9595, a reduction of 0.43 \log_{10} CFU/mg was observed. This reduction was only temporary as seen by the increase

in *Enterobacteriaceae* population observed after the feeding ended (Figure 2.4). The consumption of the three probiotics led to a significant reduction in *Staphylococcus* spp. population ($P \leq 0.05$). The most important diminution was observed for the CL1285-fed mice. Moreover, the variation in *Staphylococcus* spp. population was seen nine days after the post-feeding in the CL1285-fed mice while the modification was temporary for both *L. rhamnosus* fed-group group (Figure 2.5). Finally, Figure 2.6 shows the total anaerobe counts in feces of each group of mice. An increase of these populations was observed for both *L. rhamnosus* strains treated groups ($P \leq 0.05$). This increase was observed until the end of the treatment for the ATCC 9595 strain but not for the RW-9595M strain after the post-feeding.

2.7. Discussion

The antimicrobial potential of LAB used to produce fermented food products is well-known (Elotmani *et al.*, 2002; Gulmez and Guven, 2003; Mante *et al.*, 2003; Ogwaro *et al.*, 2002). Antimicrobial activity is attributed to different metabolites such as lactic acid, hydrogen peroxide and bacteriocins. As examples of these latter peptides, nisin, pediocin or acidocin, may have a key role in this inhibitory activity (Benkerroum *et al.*, 2002; Olasupo *et al.*, 1994). Survival during many days of *E. coli* O157:H7, *List. monocytogenes* and *S. aureus* in milk-based products has been already stated by others (Schaack and Marth, 1988; Ogwaro *et al.*, 2002; Gulmez and Guven, 2003). Pitt *et al.* (2000) demonstrated that bacterial survival in fermented milk is dependant of the LAB strain, the temperature and the duration of the fermentation. The authors demonstrated that *List. monocytogenes* was completely inhibited after 20 h at 37 °C in presence of *L. bulgaricus* and *L. plantarum* while many other LAB did not have the same impact on the pathogen. The present study has shown the effectiveness of a new probiotic preparation, CL1285, to inhibit the growth of *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7, *List. innocua* LSPQ 3285, *S. aureus* ATCC 29213 and *Salm. Typhimurium* SL1344. The results also showed that most enteropathogenic bacteria tested, except both *Enterococcus* spp., could be totally eliminated after 48 hours of fermentation. Nevertheless, the presence of the probiotic CL1285 has reduced by 1.73 and 3.24 log CFU/ml the microbial growth of *Ent. faecalis* LSPQ 2724 and *Ent. faecium* LSPQ 3550, respectively, after 48 hours of fermentation. It is not yet possible to determine if a strain have a higher antimicrobial potential than another because only the complete CL1285 mixture was evaluated. Moreover, it could be interesting to follow the ratio between the lactobacilli strains during the fermentation process. Subsequent set of experiments will address these important questions. The aim of this experiment was to demonstrate the antimicrobial potential of a probiotic preparation using a massive LAB concentration (10^8 CFU/ml) against a high pathogenic load. Thus, conclusions in this study could not be directly correlated with standard fermented milk preparation where lower inoculation level is routinely used (about 10^7 CFU/ml) so an overvaluation of the antimicrobial capacity

may have been done. Further studies will be realized using different ratio of LAB: pathogenic bacteria to confirm the inhibitory capacity of the CL1285.

LAB have the characteristic to produce lactic acid as their principal end-product. This lead to an acidification of the environment in which they evolve (Prescott *et al.*, 2003). According to Gonzalez *et al.* (1993), most of the pathogenic bacteria do not resist the acidic environment. Our results indicated that the pH of the media decreased from an initial value of 6.3 to 4.2 after 24 h and decreased to 3.8 at the end of the fermentation (results not shown). It is well-known that LAB fermentation could result in a rapid acidification of the substrate if this latter is adequate for the fastidious growth requirements of the LAB (Rubin et Vaughan, 1979; Byrne *et al.*, 2002; Rossland *et al.*, 2003). A clinical trial has demonstrated that consumption of a lactic acid-fermented cereal gruel having a pH \leq 4 help to control the colonization of pathogens in children's intestine (Kingamkono *et al.*, 1999). In our study, we observed that after 24 h of fermentation, the pH of the milk was reduced to 4.2 in the presence of CL1285. The concentration of most of the pathogenic bacteria was reduced by only 1 to 2 \log_{10} cfu/ml. A discrete acidification of the milk to pH 3.8 was recorded between 24 and 48 h of fermentation. However, during this period, a high bactericidal activity of 5 to 6 \log_{10} cfu/ml was observed leading to the complete elimination of the pathogenic bacteria after 48 h of fermentation. This observation suggests that antimicrobial metabolites other than organic acids are implicated in the elimination of the pathogenic bacteria. Further studies will be needed to fully understand the mechanisms controlling the antimicrobial activity produced by CL1285. Our results also showed that after only 8 h of fermentation, the LAB have the ability to reduce the growth rate of all the pathogenic bacteria evaluated in this study. Nutrient depletion, acidification of the substrate, and/or production of antimicrobial compounds could explain this phenomenon.

LAB have been used since a long period time in food fermentation intended for human consumption. A persistent problem of probiotics is their ability to resist, survive or colonize the intestine at least temporarily. LAB must survive the acidic environment of the stomach in order to reach the gut and modulate the microbiota. Results obtained in

this study demonstrated that the CL1285 probiotic preparation completely resists a simulated gastric fluid at pH ≥ 2.5, which is the pH of the stomach following food consumption (Gänzle *et al.*, 1999). Bile salt tolerance is considered one of the most important attributes required by LAB to survive in the duodenum and the upper small intestine (Saarela *et al.*, 2000). Our study showed that CL1285 and *L. rhamnosus* GG survived a bile salt stress but also grew on MRS agar containing 4% of a standardized bile salts mixture. However, at this point, it is not possible to confirm that all the strains present in the CL1285 mixture have the same acidity and bile salt tolerance. Further investigations using pure strains will be needed before a clear conclusion could be done. Succi *et al.* (2005) observed a 7 log₁₀ CFU/ml reduction when *L. rhamnosus* GG was placed in acidified MRS (pH 2) after an incubation of 2 h at 37°C while a reduction of approximately 2.5 log₁₀ CFU/ml was measured at pH 3. Subsequently, the bacterial culture was transferred in MRS at pH 7 but containing 2 % of bile salts (Oxoid LP0055) for 5 h at 37 °C. *L. rhamnosus* GG showed no loss of viability at the end of the treatment which is in agreement with results obtained in this study.

This study also demonstrated that ingestion of novel probiotics is well tolerated by C57Bl/6 mice over the course of a three week-feeding trial and can alter quantitatively the balance of colonic bacterial populations. This effect is strain dependant. All the probiotic tested have the potential to increase, at least transiently, the total culturable LAB content. Although the mice were fed routinely with probiotic *Lactobacillus* strains, the increase in total LAB was not correlated with an elevation of the *Lactobacillus* population. It could be hypothesized that a reorganization of the intestinal microbiota was induced and the probiotic species replaced or stimulated the growth of the indigenous *Lactobacillus* strains leading to a variation of the bacterial species but the total culturable *Lactobacillus* spp. enumeration on Rogosa agar was not modified. Manninen *et al.* (2006) observed that indigenous *L. acidophilus* population in the small intestine of dogs was stimulated following ingestion of other species of the *Lactobacillus* genera. The same hypothesis could explain the increase in total anaerobes obtained following ingestion of both *L. rhamnosus* strains. However, there was no variation in total anaerobes following the ingestion of the CL1285. MRS agar and Rogosa SL are media usually used in

numerous studies for the enumeration of total LAB or *Lactobacillus* spp. in human or animal feces or gut (Klainer *et al.*, 1967; Hartemink and Rombouts, 1999; Figler *et al.*, 2006). However, these media also permit the growth non-LAB such as many species of *Bifidobacterium* spp. or *Pediococcus* spp. for the Rogosa SL agar (Jackson *et al.*, 2002). This could explain the elevated concentration of *Lactobacillus* spp. in regard of the total ananerobes counts. We also studied bacterial populations that are less abundant in intestinal microbiota such as total *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus*. These microbial populations are often considered as deleterious microorganisms (Kallman *et al.*, 1997). For *Enterobacteriaceae* population, only ingestion of *L. rhamnosus* ATCC 9595 by mice decreased the counts of culturable *Enterobacteriaceae*, while the other probiotics did not modulate quantitatively this population. This reduction correlated with an increase of the total LAB and anaerobes. However, the level of *Enterobacteriaceae* counts was similar to its initial level after probiotic intragastric administration ended. It is intriguing that *L. rhamnosus* RW-9595M did not have the same effect as the wild-type strain. Further experiments will be needed to have a better comprehension of this phenomenon. A reduction of *Staphylococcus* spp. was noticed following the ingestion of CL1285. It could be hypothesized that CL1285 culture inhibits the growth of *S. aureus* as shown by the *in vitro* experiments. The reorganization of the microbial population could explain the temporary decrease in *Staphylococcus* sp. observed for both *L. rhamnosus* evaluated. It could thus be suggested that the composition of intestinal microbiota could be altered specifically following ingestion of probiotics. Overall, in order to ascertain these hypothesis properly, culture-independent techniques such as the integrated use of denaturated gradient gel electrophoresis (DGGE), fluorescence in situ hybridization (FISH) and real time-PCR should be used to monitor qualitatively and quantitatively the variations in fecal microbial populations during probiotic feeding. These techniques also have the advantage to be more specific and sensitive than plate counts on selective media (Marzotto *et al.*, 2006; Van Houtte *et al.*, 2006).

2.8. Conclusion

This study has demonstrated that the novel probiotic CL1285 mixture can eliminate numerous pathogenic bacteria such as *E. coli* O157:H7, *Salm.* Typhimurium, *S. aureus*, in less than 48 h during the production of fermented milk. The CL1285 preparation would be a good substrate to protect food products against pathogens contamination and to increase their shelf-life. However, other studies are undergoing to determine this bactericidal activity. Moreover, this study clearly indicated that the novel probiotic CL1285 and other probiotic could survive the stressful gastrointestinal transit and reach the gut. The presence of live probiotic in the gut could be beneficial to humans by establishing a normal intestinal microbiota and by preventing invasion by deleterious bacteria. This study also showed that mice supplementation with probiotic bacteria had an effect on the intestinal microbiota. The population of total LAB in the feces increased while *Staphylococcus* sp. decreased following the feeding of mice with all probiotics evaluated. Moreover, this study showed that an exopolysaccharide-producing strain of *L. rhamnosus* modulate differently the fecal microbiota as compared to its wild-type strain. Further studies using molecular tools should give more information. All the strains survive gastro-intestinal transit and have the ability to modify the intestinal microbiota. These probiotic may play an important role in the maintenance of gastrointestinal health by prevention of pathogenic population colonization.

Acknowledgements

This research was supported by Quebec Research Council in Fishing and Agri-Food (CORPAQ) of the Quebec ministry of Agriculture, Fishery and Food (MAPAQ) and by Bio-K Plus International Inc. through their “Volet Compétitivité des Entreprises” program. The authors are grateful to Bio-K Plus International Inc. for the CL1285 probiotic preparation, to Dr. Charles Dozois from INRS-Institut Armand-Frappier, department of applied microbiology for providing *Salm.* Typhimurium SL1344 and *E. coli* O157:H7 and to Julie Pousset for technical assistance.

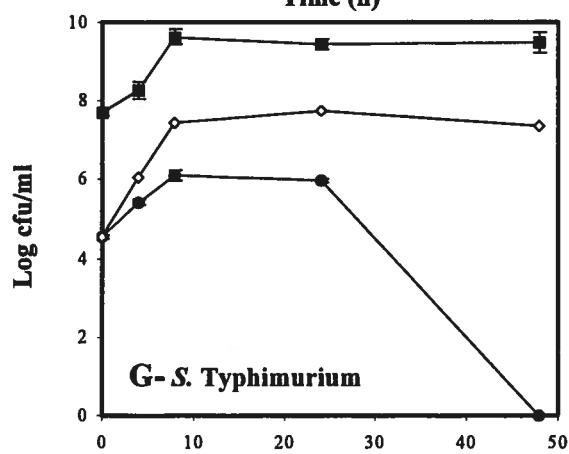
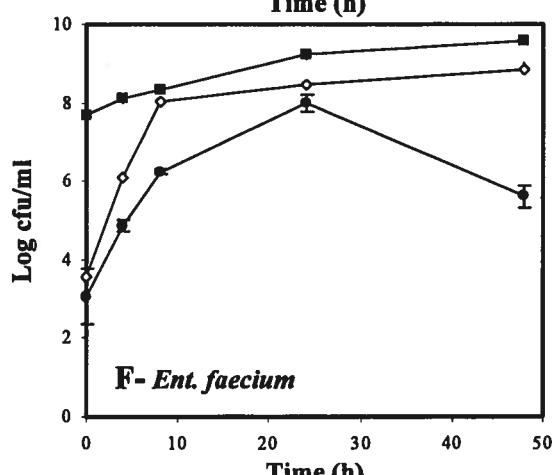
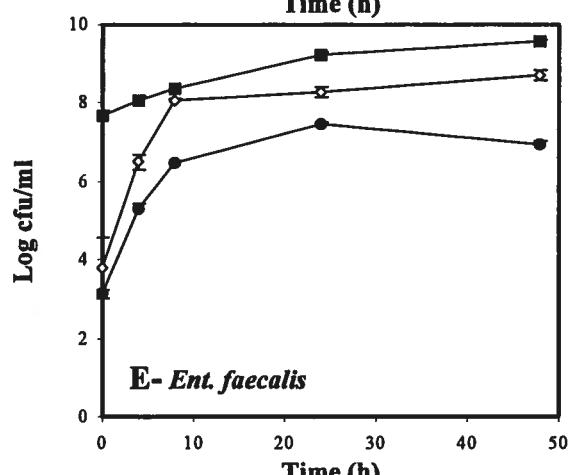
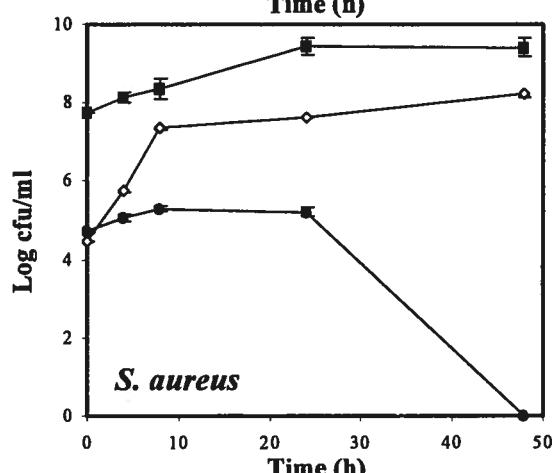
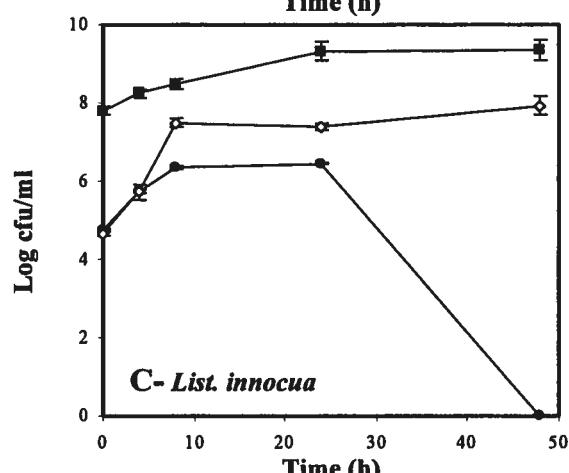
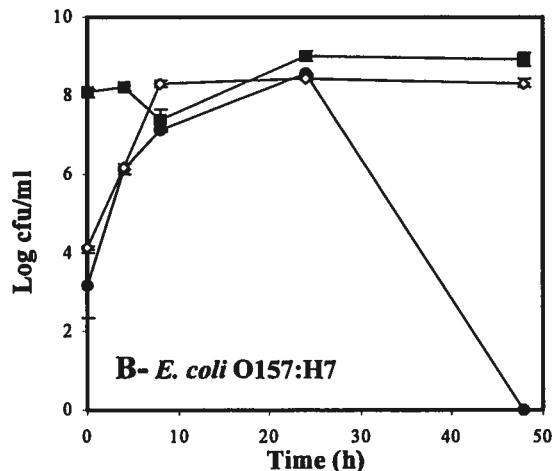
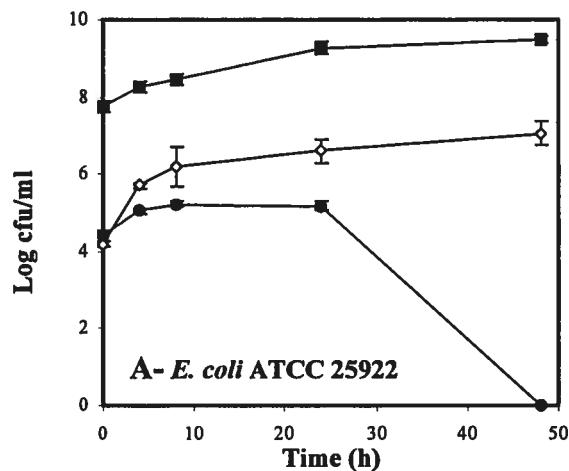


Figure 2.1. Inhibition of pathogenic bacteria in associative culture with probiotic CL1285 in skim milk at 37 °C. (□) LAB concentration during associative culture; (●) Pathogenic bacteria concentration during associative culture; (◊) Pathogenic bacteria concentration during mono-culture. (A) *Escherichia coli* ATCC 25922; (B) *E. coli* O157:H7 EDL933; (C) *Listeria innocua* LSPQ 3285; (D) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; (E) *Enterococcus faecalis* LSPQ 2724; (F) *Ent. faecium* LSPQ 3550; (G) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344. Results are the mean Log CFU/ml from three independent experiments. Error bars represent the standard deviation of the mean.

Table 2.1. Generation time of the bacterial pathogens after 8 hours of fermentation in skim milk at 37 °C in mono-culture or co-culture with probiotic CL1285

Bacterial strains	Mono-culture (min ± SD)	Co-culture (min ± SD)	Increase in the generation time
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	69.8 ± 16.4a ¹	174.0 ± 20.3b	249 % ²
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL 933	34.4 ± 1.0a	71.5 ± 2.5b	208 %
<i>Enterococcus faecalis</i> LSPQ 2724	46.0 ± 0.2a	62.3 ± 6.3b	135 %
<i>Enterococcus faecium</i> LSPQ 3550	37.8 ± 0.8a	53.1 ± 2.3b	140 %
<i>Listeria innocua</i> LSPQ 3285	41.8 ± 2.5a	99.0 ± 3.7b	237 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium SL1344	52.7 ± 0.9a	107.8 ± 5.3b	205 %
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	45.7 ± 0.6a	301 ± 13.5b	657 %

¹: Generation time in lines bearing different letters are significantly different ($P \leq 0.05$)

²: Increase of generation time (GT) = (Associative-culture GT / Mono-culture GT) × 100

Results are the mean generation time (min) obtained from three independent experiments.

Table 2.2. Survival of lactic acid bacteria strains after an incubation of 30 min at 37 °C in simulated gastric fluid (pH 1.5 to 3.0)

Microorganisms	Time (min)	pH	Log CFU survivor
<i>L. acidophilus/L. casei</i> (CL1285)	0	-	9.57 ± 0.09 ^B
	30	1.5	< 1
	30	2.0	5.90 ± 0.52 ^A
	30	2.5	9.55 ± 0.04 ^B
	30	3.0	9.63 ± 0.04 ^B
<i>L. rhamnosus</i> GG ATCC 53103	0	-	9.10 ± 0.13 ^{B*}
	30	1.5	< 1
	30	2.0	5.33 ± 0.62 ^A
	30	2.5	9.08 ± 0.14 ^B
	30	3.0	9.01 ± 0.13 ^B
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595	0	-	9.57 ± 0.09 ^B
	30	1.5	< 1
	30	2.0	5.09 ± 0.77 ^A
	30	2.5	9.51 ± 0.10 ^B
	30	3.0	9.51 ± 0.09 ^B
<i>L. rhamnosus</i> RW-9595M	0	-	9.69 ± 0.09 ^B
	30	1.5	< 1
	30	2.0	4.32 ± 1.27 ^A
	30	2.5	9.84 ± 0.11 ^B
	30	3.0	9.81 ± 0.18 ^B

*: Different letters in a bacterial group indicate a significant difference in microbial count ($P \leq 0.05$).

Mean Log CFU and standard deviation from three independent repetitions are presented.

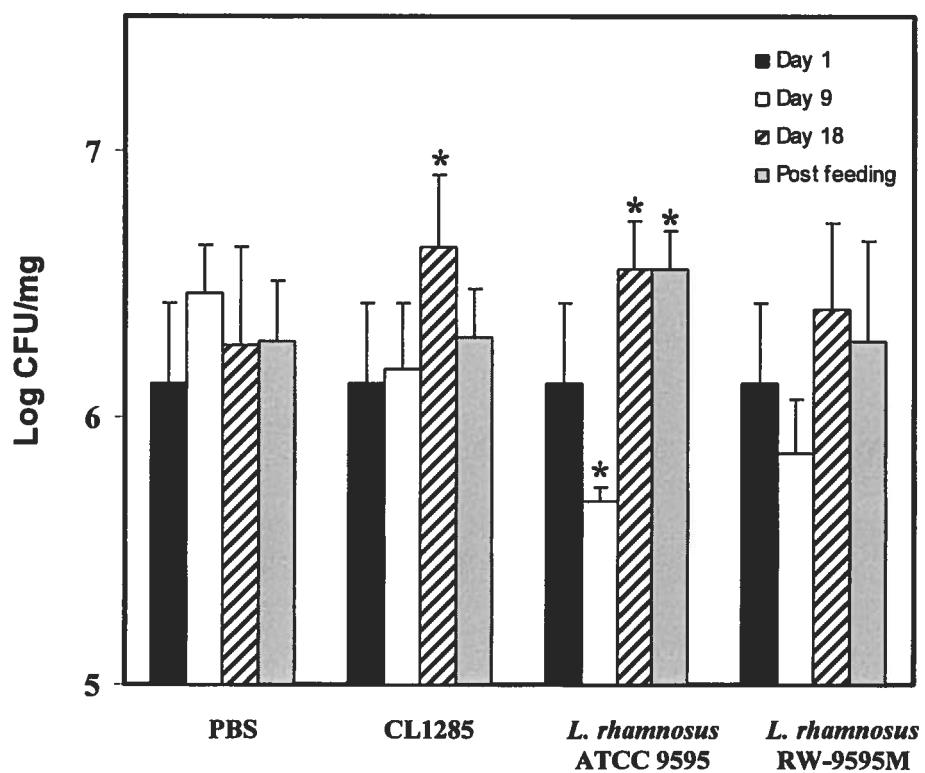


Figure 2.2. Lactic acid bacteria population in feces of C57Bl/6 mice during feeding with probiotic bacteria. Error bars represent the standard deviation of the mean Log CFU/mg feces obtained from 8 mice in two independent experiments. Variations are considered significant ($P \leq 0.05$) when bacterial concentration from a given day was different from Day 1 and from PBS group the same day.

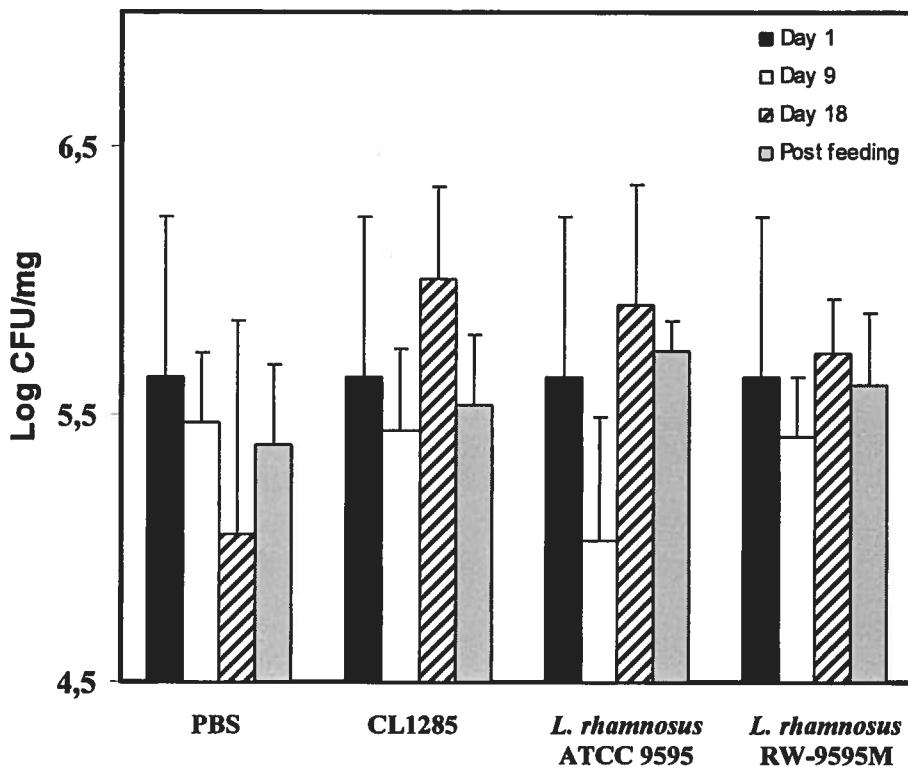


Figure 2.3. *Lactobacillus* spp. population in feces of C57Bl/6 mice during feeding with probiotic bacteria. Error bars represent the standard deviation of the mean Log CFU/mg feces obtained from 8 mice in two independent experiments. Variations are considered significant ($P \leq 0.05$) when bacterial concentration from a given day was different from Day 1 and from PBS group the same day.

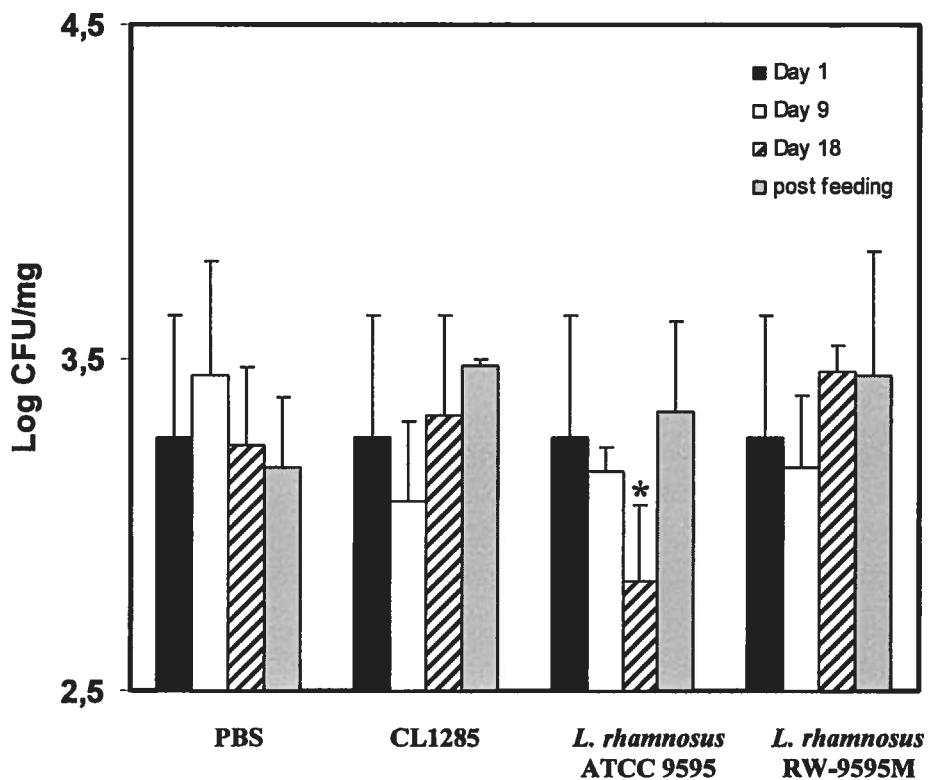


Figure 2.4. *Enterobacteriaceae* population in feces of C57Bl/6 mice during feeding with probiotic bacteria. Error bars represent the standard deviation of the mean Log CFU/mg feces obtained from 8 mice in two independent experiments. Variations are considered significant ($P \leq 0.05$) when bacterial concentration from a given day was different from Day 1 and from PBS group the same day.

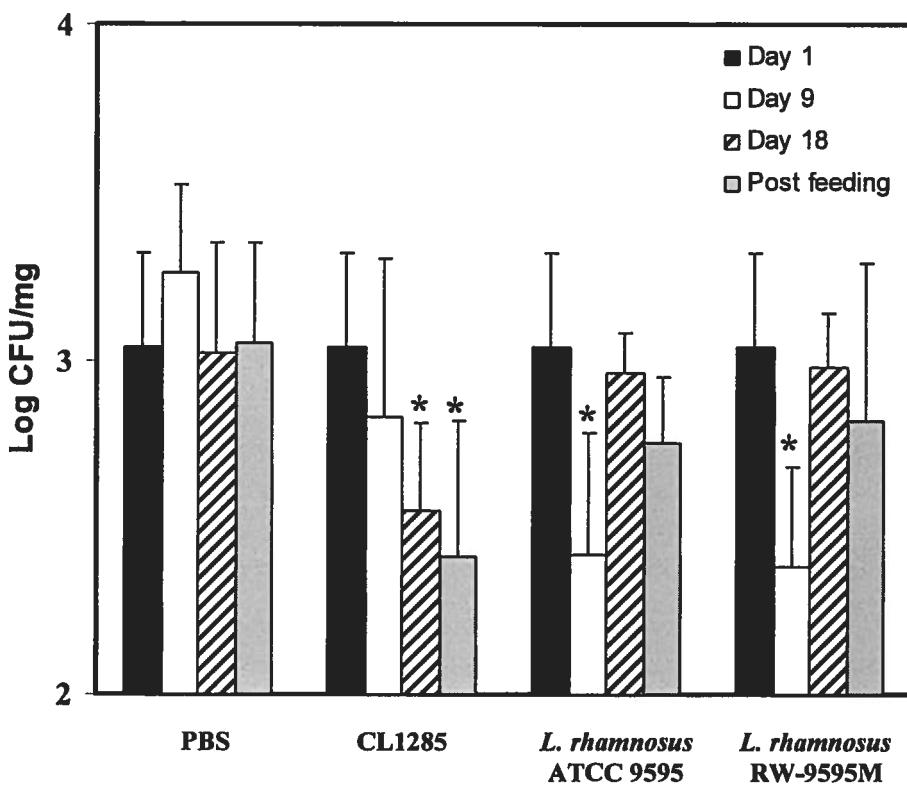


Figure 2.5. *Staphylococcus* spp. population in feces of C57Bl/6 mice during feeding with probiotic bacteria. Error bars represent the standard deviation of the mean Log CFU/mg feces obtained from 8 mice in two independent experiments. Variations are considered significant ($P \leq 0.05$) when bacterial concentration from a given day was different from Day 1 and from PBS group the same day.

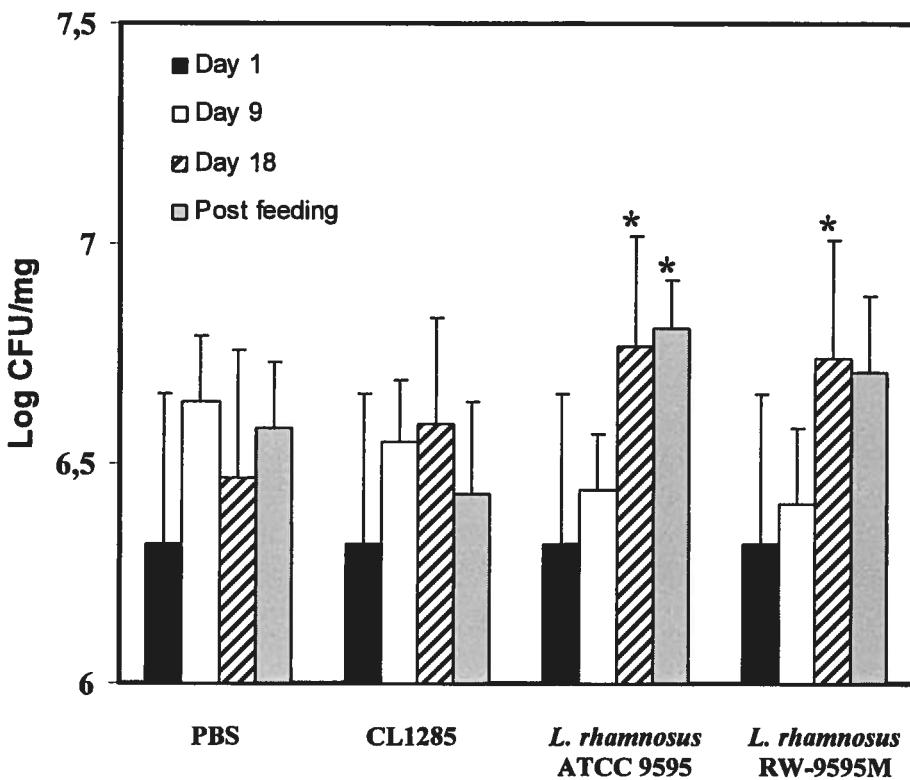


Figure 2.6. Content of the total mesophilic anaerobes population in feces of C57Bl/6 mice during feeding with probiotic bacteria. Error bars represent the standard deviation of the mean Log CFU/mg feces obtained from 8 mice in two independent experiments. Variations are considered significant ($P \leq 0.05$) when bacterial concentration from a given day was different from Day 1 and from PBS group the same day.

CHAPITRE 3

Publication 2

***In vitro* growth control of selected pathogens by a *Lactobacillus acidophilus* and *L.
casei*-fermented milk**

Millette, M.¹, F. M. Luquet² and M. Lacroix¹.

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Research Laboratories in Sciences Applied to Food,
Canadian Irradiation Centre, 531, Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V
1B7 ;

² : Bio-K Plus International Inc., 495, Boulevard Armand-Frappier, Laval, QC, Canada,
H7V 4A7

Running title: Growth control by probiotic fermented milk

Article accepté pour publication le 28 septembre 2006:

Letters in Applied Microbiology. 2007. vol. 44. p. 314-319.

3.1. Contributions des auteurs

J'ai imaginé, mis au point, réalisé toutes les expériences et rédigé le manuscrit scientifique. Le Dr. François-Marie Luquet est le directeur scientifique de Bio-K+ International Inc. Il a approuvé le projet et participé aux discussions scientifiques. La Prof. Monique Lacroix était la responsable scientifique et la coordinatrice du projet de recherche. De plus, la Prof. Lacroix a supervisé l'élaboration des protocoles et les discussions scientifiques entourant ce projet. Elle a révisé le manuscrit.

3.2. Résumé en français

Inhibition de la croissance de bactéries pathogènes par les métabolites contenus dans du lait fermenté par *Lactobacillus acidophilus* et *L. casei*

Objectifs: L'inhibition de pathogènes alimentaires a été testée en présence d'un mélange de *Lactobacillus acidophilus* et *L. casei* durant une fermentation à pH contrôlé.

Méthodologie et résultats: La croissance d'*Escherichia coli* O157:H7, de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, de *Staphylococcus aureus*, de *Listeria innocua*, d'*Enterococcus faecium* et d'*Ent. faecalis* a été évaluée durant 48 h à 37 °C. En présence des bactéries lactiques (BAL), une augmentation du temps de génération a été observée pour toutes les bactéries Gram + à l'étude. *Staph. aureus* était la bactérie la plus sensible avec une augmentation du temps de génération de 210%. Par contre, aucune inhibition n'a été remarquée après 8 h de fermentation pour toutes les bactéries Gram – évaluées. La fraction soluble d'un lait fermenté par *L. acidophilus* et *L. casei* a été récupérée et l'activité antimicrobienne en a été vérifiée. *List. innocua* et *Staph. aureus* étaient les bactéries les plus sensibles à la présence du surnageant de lait fermenté montrant des pourcentages d'inhibition de 85,9 et 84,7%, respectivement. Cette fraction soluble a été neutralisée pour éliminer l'effet antimicrobien des acides organiques; cette fois, les bactéries les plus sensibles étaient *List. innocua* et *E. coli* O157:H7 avec des pourcentages d'inhibitions de 65,9 et 61,9%, respectivement. Finalement, la fraction soluble a été neutralisée et irradiée à 45 kGy par une source de ^{60}Co pour éliminer les effets antibactériens des acides organiques et des bactériocines. *Ent. faecalis*, *E. coli* O157:H7 et *Staph. aureus* ont été les bactéries les plus affectées par cette fraction avec 39,1, 32 et 31,2% d'inhibition. **Conclusions:** Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que des acides organiques et des substances inhibitrices semblables aux bactériocines seraient impliqués dans l'activité antimicrobienne observée dans la fraction soluble de cette préparation probiotique. **Impact de l'étude:** Cette étude a démontré les mécanismes d'actions antimicrobiens d'un lait fermenté par *L. acidophilus* et *L. casei* utilisé pour prévenir les diarrhées associées aux antibiotiques.

3.3. Abstract

Aims: Foodborne pathogen inhibition was tested in presence of a mixture of *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* during fermentation under controlled pH conditions. **Methods and results:** The growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* was evaluated during 48 h at 37°C. In presence of the lactic acid bacteria (LAB), an increase of the generation time for all Gram + bacteria evaluated was observed. *Staph. aureus* was the most sensitive strain showing an increase of the generation time by 210%. However, no inhibition occurred after 8h of fermentation for all Gram- bacteria evaluated. The soluble portion of a *L. acidophilus* and *L. casei*-fermented milk was recuperated and tested for its antimicrobial activity. *List. innocua* and *Staph. aureus* were the most sensitive bacteria to the presence of fermented milk supernatant showing an inhibition of 85.9 and 84.7%, respectively. This soluble fraction was neutralized to eliminate the antimicrobial effect of the organic acids produced; the most sensitive strains were *List. innocua* and *E. coli* O157:H7 showing an inhibition of 65.9 and 61.9%, respectively. Finally, the soluble fraction was neutralized and irradiated at 45 kGy using a ⁶⁰Co source to eliminate the possible antimicrobial effect of both organic acids and bacteriocin-like substances. *Ent. faecalis*, *E. coli* O157:H7 and *Staph. aureus* were the most affected bacteria by this fraction showing 39.1, 32 and 31.2% of inhibition. **Conclusions:** The results obtained in this study suggest the implication of both organic acids and bacteriocin-like inhibitory substance in the antimicrobial activity observed in the soluble fraction of the probiotic preparation. **Significance and impact of the study:** This study revealed the antimicrobial mechanisms of action of a *L. acidophilus* and *L. casei*-fermented milk used to prevent antibiotic associated diarrhea.

Keywords: Probiotic, pathogen, lactic acid bacteria, fermentation, *Lactobacillus casei*, *acidophilus*

3.4. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) have been widely used in various fermented food products and around the world for many centuries. The preservative role and health benefits of fermented milk (Scheinbach, 1998), kefir (Adolfsson *et al.*, 2004), and yogurt (Perdigon *et al.*, 2003) are now recognized. Antimicrobial activity of LAB have been demonstrated in various species (Rossland *et al.*, 2003; Ghrairi *et al.* 2004; Nes et Johnsborg 2004). Also, their antagonistic actions are demonstrated against numerous intestinal and food-borne pathogens such as *Escherichia coli* O157:H7 (Wilderkyke *et al.*, 2004), *Clostridium difficile* (Plummer *et al.*, 2004), *Listeria monocytogenes* (Mahoney et Henriksson, 2003), *Staphylococcus aureus* (Heikkila et Saris, 2003) and many others. Some LAB can prevent the adherence, establishment, invasion or toxin production of intestinal or vaginal pathogens (Gusils *et al.*, 2003). These LAB can also inhibit pathogenic bacteria growth by a pH reduction through production of organic acid such as acetic, propionic or lactic acid (Naaber *et al.*, 2004) or by producing hydrogen peroxide. LAB can also compete for nutrients or adhesion site against pathogens. Finally, LAB can secrete antimicrobial peptides named bacteriocins. Bacteriocins from LAB are low molecular weight, cationic, amphiphilic molecules that exert an antimicrobial action against related species and generally affect Gram + species with few exceptions.

A randomized, double-blind, placebo controlled trial was conducted in two hospitals in Montréal (Canada) using a *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei*-fermented milk and has demonstrated a preventive effect against antibiotic-associated diarrhea and a reduced *Clostridium difficile*-associated diarrhea incidence (Beausoleil *et al.*, 2004).

The aims of this study were to evaluate the antimicrobial potential of a probiotic mixture containing *L. acidophilus* and *L. casei* strains during milk fermentation under neutralized pH. The antimicrobial potential of the soluble fraction extracted from a fermented milk product with this bacterial formulation was also evaluated.

3.5. Material and methods

3.5.1. Bacterial strains and growth conditions

L. acidophilus and *L. casei* strains, was graciously provided by Bio-K+ International Inc. (Laval, QC, Canada). *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). *Enterococcus faecalis* LSPQ 2724, *E. faecium* LSPQ 3550 and *Listeria innocua* LSPQ 3285 were purchased from Laboratoire de Santé Publique du Québec (Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada). *E. coli* O157:H7 EDL933 and *Salmonella* Typhimurium SL1344 were provided by INRS-Institut Armand-Frappier (Laval, QC, Canada). Lactobacilli strains were propagated in Lactobacilli MRS broth (MRS; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) at 35°C for 24 h. All other bacteria were propagated in 10 ml of Brain-Heart Infusion (BHI; Difco Laboratories) at 35°C for 24 h. Bacterial strains were stored at –80°C in their respective media containing 10% (wt/vol) glycerol (Laboratoires MAT, Montreal, QC, Canada). Before each experiment, the bacterial content of one vial was thawed, transferred in 9 ml of their respective media and activated by two consecutive incubations of 24 hours at 35°C. Thereafter, bacteria were washed twice in 10 ml sterile saline (0.85 % wt/v) after centrifugation at 4°C for 10 min at 2000×g.

3.5.2. Antipathogenic activity of lactobacilli

In order to eliminate the antimicrobial effect of the media acidification during fermentation by lactobacilli, the pH was maintained at 6.5 by a constant addition of KOH (5 mol l⁻¹). Each fermentation was conducted in a 1 L fermentor (BioFlo C30, New Brunswick Scientific Co., New Jersey, USA) equipped with pH and temperature probes. Fermentations were also conducted under agitation (250 rpm) for 48 h at pH 6.5 and 37°C. A volume (500 ml) of sterile reconstituted non-fat dry milk (10% wt/vol; RNDM; Difco) was inoculated with: 10⁴ CFU ml⁻¹ pathogen or with a mixture of 10⁴ CFU ml⁻¹ pathogen n presence of 10⁸ CFU ml⁻¹ of probiotic culture. For each pathogen evaluated, two separate experiments were done.

3.5.3. Microbial analysis

Samples (15 ml) were taken at 0, 4, 8, 24 and 48 h in order to evaluate the concentration of each bacterium during fermentation in RNDM. Bacterial enumeration was done using pourplate method on selective media. LAB were screened on Lactobacilli MRS agar; *Staph. aureus* were pour-plated on Baird-Parker Agar (Difco), *E. coli* and *Salm. Typhimurium* were enumerated on MacConkey (Difco) and Enterococcus agar (Difco) was used for enumeration of *Ent. faecalis* and *Ent. faecium*. *L. innocua* was plated on Palcam agar (Difco). All dishes were incubated at 35°C from 24 to 48 h and colonies were counted using Darkfield Quebec Colony Counter (American Optical, Scientific instrument division, Keene, OH, USA).

3.5.4. Calculation of the generation time

The antimicrobial capacity of the probiotic culture was evaluated on the growth of pathogenic bacterium by calculation of the generation time, in absence and in presence of lactobacilli strains, during their exponential growth phase. The generation time is derived from the division rate according to the following formulas (Prescott *et al.*, 2003):

$$k = [(\log N_t - \log N_0)/0.301 \times t]$$

$$g = 1/k$$

where k is the division rate (h^{-1}), g is the generation time (h) , $\log N_t$ is the microbial enumeration (CFU ml^{-1}) after $t = 8$ hours of fermentation and $\log N_0$ is the microbial enumeration (CFU ml^{-1}) after 4 h.

3.5.5. Antimicrobial capacity of the soluble fraction of *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei*-fermented milk

In order to verify the antimicrobial potential of the soluble fraction of fermented milk, 100 g of the commercial fermented milk was centrifuged at 16 500×g for 30 min at 4°C and the supernatant was filter-sterilized (0.2 μm ; Sarstedt, Montreal, QC, Canada). This supernatant was separated in three groups (“acidic fraction” – “neutralized fraction” – “neutralized and irradiated fraction”). The pH of the supernatant was 4.5 and named

“acidic fraction”. A portion of the supernatant was neutralized to pH 6.5 by addition of 5 mol l⁻¹ NaOH, in order to eliminate the antibacterial effect of the acidity against the pathogenic bacteria and this group was named “neutralized fraction”. Half of the neutralized fraction was irradiated at a dose of 45 kGy using a UC15-A irradiator (MDS Nordion, Laval, QC, Canada) in order to inactivate the possible antimicrobial peptides present in the supernatant. This group was named “irradiated and neutralized fraction”. One hundred µl of BHI, 100 µl of treated supernatant, 50 µl of one of the pathogen suspension (approximately 10⁶ CFU ml⁻¹) or sterile saline for the blank was added separately in flat bottom 96-wells plates (Sarstedt). The plates were then incubated at 35°C and the microbial growth was monitored at 650 nm using a DMS-100S UV-Visible spectrophotometer (Varian Inc., Ville St-Laurent, QC, Canada) every hour during 12 h until the bacterial stationary phase was reached.

3.5.6. Calculation of % of growth inhibition of the pathogens by the whey

The pathogen growth inhibition by the fermented milk soluble fraction was calculated after 12 h of incubation of the 96-wells plates. The content of pathogens was estimated by spectrophotometric measurements at 650 nm. The data were subjected to the following equation:

$$A_{samples} - A_{blank} = A_{calculated}$$

$A_{samples}$: absorbance of the well containing the 50 µl of pathogenic bacteria in saline suspension, 100 µl of fermented milk supernatant fraction and 100 µl of BHI.

A_{blank} : absorbance of the well containing the blank (50 µl saline), 100 µl of fermented milk supernatant fraction and 100 µl of BHI.

$A_{calculated}$: Calculated absorbance of each sample.

The percentage of pathogen inhibition was calculated as follows:

$$[(A_{BHI} - A_{treatment}) / A_{BHI}] \times 100 = \text{Inhibition \%}$$

$A_{treatment}$: $A_{calculated}$ in presence of the pathogens in BHI and supernatant fraction.

A_{BHI} : $A_{calculated}$ in presence of pathogens in BHI and water (instead of supernatant fraction).

Inhibition %: percentage of the growth of the pathogen growth inhibition by the presence of the fermented milk soluble fraction.

3.5.7. Statistical analysis

Fermentation experiments were carried out in duplicate. For each replication, 3 samples were analyzed. Student-t test was done using statistics SPSS program (version 10.1) to determine if there is a significant difference between the generation time of the pathogen alone or in presence or in absence of probiotic culture. Also, data were analyzed at a 5% level of significance.

3.6. Results

3.6.1. Delay of generation time by mixed culture

Generation times of pathogenic bacteria are presented in Table 3.1. The results show a clear increase of the generation time particularly for the Gram + bacteria when grown in presence of the lactobacilli culture. *Staph. aureus* had a generation time of 40.5 min when cultured alone in RNDM media while the presence of the LAB increased the generation time to 84.8 min. *L. innocua* exhibit a generation time of 59.5 and 78.5 min under mono- and co-culture respectively. *Ent. faecium* and *Ent. faecalis* had a rapid growth when cultured alone in RNDM media showing a generation time of 39 min. However, in presence of lactobacilli culture, *Ent. faecium* was more sensitive than *Ent. faecalis*. A generation time of 62.7 and 43.2 min was respectively observed. In contrast, Gram – pathogenic bacteria were less sensitive to the presence of the lactobacilli culture. *E. coli* showed a decrease of the generation time in presence of the lactobacilli culture. The generation time decreased from 93.1 to 56.4 min. Moreover, *Salm. Typhimurium* was not affected by the presence of lactobacilli culture and showed a generation time of 58.2 min.

3.6.2. Antimicrobial activity of the soluble fraction extracted from the milk fermented by probiotic preparation

Table 3.2 presents the percentage of inhibition of selected pathogenic bacteria (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Ent. faecium*, *Ent. faecalis*, *Staph. aureus*, *E. coli* 0157:H7) when cultivated in presence of the soluble fraction of *L. acidophilus* and *L. casei*-fermented milk. According to Turcotte *et al.* (2004), results of the antimicrobial test on microplates are more sensitive than the agar diffusion assay to detect bacteriocins. These results are shown in table 3.2 and indicate that *L. innocua* is the most sensitive bacteria to the acidification of the culture medium showing a growth inhibition of 41.2% when incubated in BHI at pH 4.5. *Ent. faecium*, *Ent. faecalis* and *Staph. aureus* were the most resistant bacteria to acidity showing inhibition percentages of 6.4, 23.9 and 17.2% respectively. *L. monocytogenes* and *E. coli* have showed a growth inhibition of 25.8 and 27.8% respectively.

The crude soluble fraction obtained from the *L. acidophilus* and *L. casei*-fermented milk had a pH of 4.5. Pathogens growth inhibition evaluated in presence of acid metabolites varied from 73.5 % for *Ent. faecium* up to 85.9 % for *L. innocua* after 12 h of incubation at 35 °C. The bacterial sensitivity, in a decreasing order, is: *L. innocua* (86%) > *Staph. aureus* (85%) > *L. monocytogenes* (78%) > *E. coli* O157:H7 (77%) > *Ent. faecalis* (75%) > *Ent. faecium* (74%) (Table 3.2). In order to verify the role played by organic acids on the antimicrobial activity, neutralization of the soluble fraction to pH 6.5 significantly reduced its inhibitory potential against all the selected pathogens ($P \leq 0.05$). However, residual antimicrobial activity of the neutralized soluble fraction was still relatively high (Table 3.2). The pH neutralization and irradiation of the *L. acidophilus* and *L. casei*-fermented milk supernatant was done to eliminate the antimicrobial effect of the organic acids and peptides metabolites. Previous results obtained in our laboratory have shown that an irradiation dose of 45 kGy totally eliminated the antimicrobial activity of nisin (results not shown) and this dose of irradiation is normally used to inactivate enzymes. Growth inhibition results of neutralized and irradiated fraction on selected pathogens are presented by decreasing order of sensitivity: *Ent. faecalis* (39%) > *E. coli* O157:H7 (32%) > *Staph. aureus* (31%) > *L. innocua* (26%) > *L. monocytogenes* (14%) > *Ent. faecium* (13%) (Table 3.2).

3.7. Discussion

LAB antimicrobial activity is primarily due to a pH reduction produced by the secretion of lactic acid or by substrate competition. It is well-known that *Lact. casei* and *Lact. acidophilus* can produce as high as 1.5% of lactic acid during fermentation depending on the media composition (Heller, 2001). It can thus be hypothesized that pathogenic bacteria tested in this study are more sensitive to organic acids than acidification by HCl or that lactobacilli produced other antimicrobial compounds. The reduction of the antimicrobial activities observed after irradiation of the soluble fraction suggests the presence of bacteriocins in lactobacilli culture. Gram + bacteria, except *Ent. faecalis* and *Staph. aureus*, are more sensitive to those metabolites than *E. coli* O157:H7

which is in agreement with the definition of bacteriocins. Antagonistic activity also depends on the production of metabolites such as bacteriocins (Olasupo *et al.*, 1995). Bacteriocins are antimicrobial peptides, ribosomally synthetized and subsequently secreted by Gram + as well as by Gram – bacteria. Their antimicrobial activity is generally restricted to strains phylogenetically related to the producers (Berjeaud et Cenatiempo, 2004). Some strains of *Lact. acidophilus* produce acidocin CH5 (Chumchalova *et al.*, 2004), acidocin J1132 (Tahara *et al.*, 1996), acidophilin 801 (Zamfir *et al.*, 1999) and lactacin B (Barefoot et Klaenhammer, 1983) while *Lact. casei* strains can produce lacticin 705 (Vignolo *et al.*, 1993) and caseicin A (Olasupo *et al.*, 1995). As observed in our results, lactobacilli culture exerted an antimicrobial activity mainly against Gram + bacteria which correspond to the definition of bacteriocins. Purification and characterization of the antimicrobial metabolites should be done to confirm the bacteriocin production by the probiotic culture. Variable residual activity of the neutralized and irradiated fraction was observed suggesting the presence of other antimicrobial compounds than organic acids and bacteriocins into the *L. acidophilus* and *L. casei*-fermented milk supernatant. Reid and Burton (2002) discussed about the implication of hydrogen peroxide-producing Lactobacilli in the maintenance of a healthy urogenital tract. In our study, the implication of hydrogen peroxide as an antimicrobial compound was not demonstrated.

In conclusion, these results indicate that the probiotic culture is able to delay the growth of many food-borne pathogens such as *Staph. aureus*, *Ent. faecium*, *Ent. faecalis* and *L. innocua*. Moreover, the whey recuperated in the *L. acidophilus* and *L. casei*-fermented milk was also able to inhibit the growth of many pathogenic bacteria such as *E. coli* O157:H7 by 77%, *L. monocytogenes* by 78% or *Staph. aureus* by 85%. Different mechanisms of action seem to be involved in this antimicrobial activity such as organic acids, bacteriocins and at least another one. Concentration and purification steps should be done to confirm the presence of such metabolites.

Acknowledgements

This research was supported by Quebec Research Council in Fishing and Agri-Food (CORPAQ) of the Quebec ministry of Agriculture, Fishery and Food (MAPAQ) and by Bio-K Plus International Inc. through their “Volet Compétitivité des Entreprises” program. The authors are grateful to Bio-K Plus International Inc. for the lactobacilli probiotic preparation and to Dr. Charles Dozois from INRS-Institut Armand-Frappier, department of applied microbiology, for providing *S. Typhimurium* SL1344. M. Millette is a scholarship recipient of the Fondation Armand-Frappier.

Table 3.1. Generation time of pathogenic bacteria after 8 hours of fermentation in mono-culture or co-culture in presence of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* in 10% reconstituted non-fat dry milk at 37°C under pH controlled conditions (pH 6.5).

Bacterial pathogens	Mono-culture (min)	Co-culture (min)	Lactobacilli impact on generation time (%)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	40.5 ± 2.3a	84.8 ± 8.7b	↑ 210
<i>Listeria innocua</i> LSPQ 3285	59.5 ± 4.4a	78.5 ± 4.2b	↑ 130
<i>Enterococcus faecium</i> LSPQ 3550	39.5 ± 0.8a	62.7 ± 1.3b	↑ 160
<i>Enterococcus faecalis</i> LSPQ 2524	39.8 ± 0.6a	43.2 ± 2.2b	↑ 110
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	93.1 ± 6.1b	56.4 ± 6.0a	↓ 170
<i>Salmonella</i> Typhimurium SL1344	58.2 ± 2.8a	58.5 ± 9.5a	0

^{a,b} Different letter means a significant difference between generation time of the mono- and co-culture ($P \leq 0.05$).

Table 3.2. Inhibition percentages of selected bacteria after 12 hours of incubation in Brain Heart Infusion containing soluble fractions obtained from the *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei*-fermented milk.

Pathogenic bacteria	BHI	BHI (pH 4.5)	Whey (pH 4.5)	Whey (pH 6.5)	Whey irradiated 45 kGy (pH 6.5)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0	27.8 ^a ± 3.1	77.2 ^c ± 1.0	61.9 ^b ± 2.1	32.0 ^a ± 4.9
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	23.9 ^b ± 5.8	75.3 ^d ± 1.1	52.6 ^c ± 3.3	39.1 ^a ± 4.2
<i>Enterococcus faecium</i>	0	6.4 ^a ± 3.9	73.5 ^d ± 5.2	48.9 ^c ± 4.7	12.5 ^b ± 2.5
<i>Listeria innocua</i>	0	41.1 ^b ± 4.4	85.9 ^d ± 3.7	65.9 ^c ± 2.1	25.9 ^a ± 2.7
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	25.8 ^b ± 1.8	78.4 ^d ± 2.5	59.7 ^c ± 3.2	14.1 ^a ± 1.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	17.2 ^a ± 2.7	84.7 ^d ± 3.6	49.5 ^c ± 3.6	31.2 ^b ± 5.4

^{a-c}Different letter means a significant difference between treatment ($P \leq 0.05$).

ADDENDA

À la suite des commentaires reçus lors de la correction de cette thèse, il a été jugé utile d'effectuer des expériences complémentaires à celles réalisées dans le chapitre 3. La première étude avait pour objectif de vérifier l'influence, sur l'inhibition des pathogènes par le surnageant obtenu du lait fermenté commercial, de l'agitation des plaques 96 puits durant l'incubation des bactéries. La méthodologie est la même que celle décrite dans les sections 3.5.5 et 3.5.6. à l'exception que les plaques ont été agitées sur un agitateur rotatif de plaques 96 puits durant 12 h à 37°C et que seulement trois souches ont été étudiées. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3.3** et indiquent qu'il n'y a pas de différences significatives ($P > 0.05$) entre les pourcentages d'inhibition des pathogènes calculés suite à une incubation avec ou sans agitation. Il est même possible de constater une légère sous-évaluation de l'inhibition lorsque les plaques n'étaient pas agitées.

La seconde étude avait pour but de comparer le pouvoir antimicrobien de la fraction soluble obtenu à partir du lait fermenté commercial (whey) à celui d'un lait acidifié artificiellement (placebo). La compagnie BioK+ International Inc. utilise un lait acidifié avec du glucono-deltalactone (GDL) comme placebo lors de ses études cliniques. Ce placebo contient des ingrédients identiques au lait fermenté par *L. acidophilus* et *L. casei* mais avec du GDL et de la pectine en plus. C'est donc la fraction soluble du placebo qui a servi d'élément comparatif au lait fermenté. Les résultats du **Tableau 3.4** indiquent que la fraction soluble du placebo dont le pH a été ajusté à 4.5 possède un pouvoir d'inhibition supérieur (*E. coli* O157:H7) ou équivalent (*List. monocytogenes* et *S. aureus*) à celui obtenu à partir du lait fermenté. Il est connu depuis longtemps que le GDL possède un fort potentiel antimicrobien (El-Shenawy et Marth, 1990). Afin de démontrer l'implication du GDL dans le pouvoir antimicrobien du placebo, des concentrations croissantes de GDL ont été ajoutées dans les puits de BHI. Le pourcentage d'inhibition du GDL a donc été évalué avec le même test. Le **Tableau 3.4** montre clairement que l'augmentation de l'inhibition coïncide avec les plus fortes concentrations

de GDL. En fait, le potentiel antimicrobien du surnageant de placebo est équivalent à celui procuré par 0.5% de GDL dans du BHI.

Pour mesurer véritablement l'implication des acides organiques dans le potentiel antimicrobien du lait fermenté par *L. acidophilus* et *L. casei*, il serait pertinent de doser les concentrations de tous les acides organiques présents dans cette préparation. Par la suite, l'inhibition des pathogènes par chacun des acides pourrait être évalué avec le test décrit dans la section 3.5.5. Des études sont présentement en cours afin d'isoler et de purifier les molécules antimicrobiennes contenues dans le lait fermenté.

Tableau 3.3. Pourcentage d'inhibition de bactéries sélectionnées après 12 heures d'incubation dans une infusion cœur-cervelle contenant la fraction soluble extraite d'un lait fermenté commercial avec ou sans agitation des plaques à 37°C.

Bactéries pathogènes		BHI (pH 4.5)	Whey (pH 4.5)	Whey (pH 6.5)	Whey irradiated 45 kGy (pH 6.5)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Sans agitation	25.2 ^a ± 5.4	80.1 ± 4.0	54.7 ± 7.3	39.4 ± 8.6
	Avec agitation	29.9 ± 6.1	87.4 ± 8.2	58.3 ± 3.1	43.1 ± 5.0
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Sans agitation	28.4 ± 3.4	85.9 ± 8.3	64.7 ± 6.6	14.9 ± 4.5
	Avec agitation	30.2 ± 1.2	90.4 ± 6.7	70.5 ± 8.9	20.3 ± 7.1
<i>Staphylococcus</i> aureus	Sans agitation	17.6 ± 5.1	76.9 ± 8.9	52.7 ± 2.8	36.3 ± 7.7
	Avec agitation	25.8 ± 7.4	82.8 ± 5.7	60.4 ± 9.5	43.6 ± 8.3

^a Aucune différence significative n'a été été mesurée entre les % d'inhibition obtenus avec et sans agitation ($P > 0.05$).

Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type des % d'inhibition de 10 échantillons réalisés dans deux expériences indépendantes.

Tableau 3.4. Pourcentage d'inhibition de bactéries sélectionnées après 12 heures d'incubation dans une infusion cœur-cervelle contenant la fraction soluble extraite d'un lait fermenté commercial, du placebo ou de diverses concentrations de glucono-delta-lactone avec agitation des plaques à 37°C.

Bactéries pathogènes	Whey (pH 4.5)	Placebo (pH 4.5)	BHI (pH 4.5)			
			% GDL			
			0	0.25	0.5	1.0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	83.8 ^b ± 3.4	90.4 ^c ± 2.8	33.5 ^a ± 2.3	36.3 ^a ± 3.6	87.7 ^{bc} ± 7.8	97.8 ^d ± 3.4
<i>Listeria monocytogenes</i>	87.1 ^b ± 6.9	96.2 ^b ± 8.4	28.9 ^a ± 5.1	31.2 ^a ± 4.7	92.4 ^b ± 6.3	99.3 ^c ± 1.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	80.0 ^c ± 3.7	84.3 ^c ± 4.9	22.6 ^a ± 1.7	27.8 ^b ± 1.1	85.8 ^c ± 5.8	99.1 ^d ± 2.9

^{a-d} Des lettres différentes dans une même ligne indiquent une différence significative entre les % d'inhibition ($P \leq 0.05$).

Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type des % d'inhibition de 10 échantillons réalisés dans deux expériences indépendantes.

CHAPITRE 4

Publication 3

**Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and
Pediococcus acidilactici isolates.**

M. Millette[†], C. Dupont[†], D. Archambault^{††} and M. Lacroix[†]

[†] INRS-Institut Armand-Frappier, Research Laboratories in Sciences Applied to Food,
Canadian Irradiation Centre, 531, Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V
1B7 ;

[‡] INRS-Institut Armand-Frappier, 531, Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada,
H7V 1B7 ;

^{††} Université du Québec à Montréal, Département des Sciences Biologiques, C.P.8888,
Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8.

Article accepté pour publication le 30 mars 2006:

Journal of Applied Microbiology. 2007. vol. 102. p. 274-282.

4.1. Contributions des auteurs

J'ai imaginé, mis au point, réalisé toutes les expériences et rédigé le manuscrit scientifique. Le Prof. Claude Dupont, de par son expertise en biochimie, a participé aux discussions scientifiques entourants la caractérisation de l'activité antimicrobienne des surnageants de cultures. Il m'a aussi prodigué plusieurs conseils très utiles sur les enzymes qui ont été utilisées dans ces expériences. Il a révisé le manuscrit. Le Prof. Denis Archambault a participé aux discussions scientifiques du projet et a révisé le manuscrit. La Prof. Monique Lacroix était la responsable scientifique et la coordinatrice du projet de recherche. De plus, la Prof. Lacroix a supervisé l'élaboration des protocoles et les discussions scientifiques entourant ce projet. Elle a révisé le manuscrit.

4.2. Résumé en français

Caractérisation partielle de bactériocines produites par des souches humaines de *Lactococcus lactis* et de *Pediococcus acidilactici*.

Objectifs: Le but de ce projet était d'isoler des bactéries lactiques (BAL) productrices de bactériocines à partir de l'intestin humain. **Méthodologie et résultats:** Un total de 111 BAL ont été isolées à partir des fèces d'un adulte humain et testées pour leur capacité à produire des bactériocines. Les surnageants neutralisés de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM19 et de *Pediococcus acidilactici* MM33 ont montré une activité antimicrobienne. Les molécules antibactériennes présentes dans le surnageant de culture de *L. lactis* ont inhibé *Enterococcus faecium*, plusieurs espèces de *Lactobacillus* et *Staphylococcus aureus* tandis que celles dans le surnageant de *Ped. acidilactici* ont inhibé *Enterococcus* sp., quelques lactobacilles et plusieurs sérovars de *Listeria monocytogenes*. Les métabolites antimicrobiens étaient stables à la chaleur et actifs sur une gamme de pH s'étendant de 2 à 10. Les activités antimicrobiennes des surnageants de culture des deux bactéries ont été inhibées par de nombreuses protéases, mais pas par la catalase. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide couplé à un antibiogramme a permis d'estimer le poids moléculaire des deux substances antimicrobiennes entre 3,5 et 6 kDa. **Conclusions:** Étant donné que les métabolites antibactériens sécrétés par *L. lactis* MM19 et *Ped. acidilactici* MM33 sont sensibles aux enzymes protéolytiques, il est possible d'émettre l'hypothèse que des bactériocines sont impliquées dans l'activité inhibitrice. Les spectres d'inhibition et les analyses biochimiques semblent démontrer que les deux bactériocines sont distinctes. **Impact de l'étude :** Nous sommes les premiers à avoir isolé des souches productrices de bactériocines de *Pediococcus* et de *Lactococcus* à partir de l'intestin humain. Ces souches pourraient s'avérer bénéfiques afin de contrôler les entéropathogènes.

4.3. Abstract

Aims: The aim of this study was to isolate bacteriocin-producing lactic acid bacteria (LAB) from human intestine. **Methods and Results:** A total of 111 LAB were isolated from human adult stool and screened for their bacteriocin production. Neutralized cell-free supernatants from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33 showed antimicrobial activity. The antimicrobials in the supernatant from a culture of *L. lactis* inhibited *Enterococcus faecium*, various species of *Lactobacillus* and *Staphylococcus aureus*; while those in the supernatant from a culture of *Ped. acidilactici* inhibited *Enterococcus* spp., some lactobacilli and various serotypes of *Listeria monocytogenes*. The antimicrobial metabolites were heat-stable and were active over a pH range of 2 to 10. The antimicrobial activities of the supernatants of both bacteria were inhibited by many proteases but not by catalase. The plate overlay assay allowed an approximation of size between 3.5 and 6 kDa for both antimicrobial substances. **Conclusions:** Since the antagonistic factor(s) produced by *L. lactis* MM19 and *Ped. acidilactici* MM33 were sensitive to proteolytic enzymes, it could be hypothesized that bacteriocins were involved in the inhibitory activities. Inhibition spectrum and biochemical analysis showed that these bacteria produced two distinct bacteriocins. **Significance and impact of the study:** We are the first to isolate bacteriocin-producing strains of *Pediococcus* and *Lactococcus* from human intestine. These strains might be useful for control of enteric pathogens.

Keywords: Bacteriocin; *Lactococcus lactis*; *Pediococcus acidilactici*; antimicrobial peptide; lactic acid bacteria

4.4. Introduction

The use of lactic acid bacteria (LAB) is a natural method of extending the shelf life of food. The production of lactic acid by LAB is known to prevent the growth of spoilage or pathogenic bacteria (Kleerebezem et Hugenholtz, 2003). LAB compete for their ecological niche by at least one other mechanism, namely bacteriocin production (Kaur *et al.*, 2004). Several strains of LAB, and the bacteriocin nisin, are generally recognized as safe and thus can be used in the production of cheese, fermented sausage or other fermented foods (Riley et Gordon, 1999; Ferchichi *et al.*, 2001).

Bacteriocins have attracted attention as potential substitutes for antibiotics to cure and/or prevent bacterial infections and are widely employed in food preservation (Riley et Wertz, 2002). They are defined as ribosomally synthesized, secreted, bactericidal peptides, and are produced by some microorganisms in all major lineages of *Eubacteria* and *Archaeabacteria* (Riley et Gordon, 1999). Research work accomplished over the last decades has focused on the detection, characterization and purification of bacteriocins. Most bacteriocin-producing LAB have been isolated from fermented foodstuffs (Ray et Miller, 2000) but bacteriocin-producing human strains of *Lactobacillus* or *Bifidobacterium* have been isolated from the human intestine, stool, or vaginal tract (Reid, 2001; Toure *et al.*, 2003).

Maintenance of a healthy intestinal microbiota is important in order to protect human health and probiotic LAB are known to contribute to this state. However, the relationship between probiotic characteristics and bacteriocin-producing capacity is poorly known. LAB may reduce the risk of infection by foodborne pathogens, by mechanisms that might include the production of antagonistic compounds, competition for mucosal surfaces and stimulation of the host's immune response (Ganzle *et al.*, 1999). Some intestinal LAB have been shown to exhibit inhibitory activity against *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Shigella* (Silva *et al.*, 1987). *Lactobacillus rhamnosus* HN001-fed mice challenged with *E. coli* O157:H7 showed reduction in both morbidity and bacterial translocation rates, higher intestinal anti-*E. coli* O157:H7 IgA responses, and enhanced blood leukocyte phagocytic activity. *Lactobacillus plantarum* strain 299v antagonized *E.*

coli-induced injury and intestinal permeability in rats whereas *Bifidobacterium longum* strain inhibited *E. coli* translocation from the gastrointestinal tract in antibiotic-decontaminated specific-pathogen-free and germ-free mice (Servin and Coconnier, 2003). However, the antagonistic compounds thought to promote these antimicrobial effects are not well characterised and their contribution to *in vivo* effects is still not well defined. It is important to detect novel bacteriocins produced by human LAB strains and to study their specific influence on antipathogenic activities in the intestine.

To our knowledge, no bacteriocins synthesized by lactococci or pediococci strains of human intestinal origin have been reported. In this paper, we report on novel bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33 isolated from adult human stool. The spectrum of antimicrobial activity, production, isolation and characterization of the bacteriocins produced by these bacteria are presented.

4.5. Material and Methods

4.5.1. Micro-organisms and growth conditions

The bacterial indicator strains used in this study are listed in Table 1. All bacteria were maintained at -80°C in appropriate media containing 10% glycerol (w/v). All isolated and indicator strains of LAB were propagated in their respective culture broth as indicated in Table 1 at 35°C. Before being used in experiments, strains were propagated twice in broth overnight. Soft agar media was prepared by the addition of 0.75% (w/v) instead of 1.5% agar to liquid culture to examine the bacterial antimicrobial capacity by the well-diffusion assay.

4.5.2. Isolation of bacteriocin-producing bacteria

Bacteriocin-producing bacteria were isolated by the direct plating method. Briefly, a 25-g healthy human stool sample was mixed with 225 ml of 0.85% (w/v) peptone water (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) water and serially ten-fold dilutions were prepared in the same diluent. Plates of Lactobacilli MRS agar were spread with 0.1 ml portion of each dilution, and were incubated at 35°C for 24 h under anaerobic conditions. A total of 111 colonies were isolated and reinoculated onto separate agar plates that were incubated 35°C for 48 h under anaerobic conditions. Single isolates from these plates were each cultured in 10 ml of Lactobacilli MRS broth for 18 h at 35°C and tested for antibacterial activity using well-diffusion assay against target bacteria listed in Table 4.1.

4.5.3. Identification of LAB

Gram staining, motility, catalase and oxidase tests were conducted as a preliminary step in characterization of the selected bacteria. In order to precisely identify the species of MM19 and MM33, DNA extraction and PCR amplification of the DNA coding for 16S ribosomal RNA (16S rDNA) procedures were performed as described by Labbé *et al.* (2003). 16S rDNA PCR products were sequenced through Génome Québec services (Montréal, QC, Canada). The sequences of the 16S rDNA of isolates MM19 and MM33 were compared to DNA sequences from the National Center for Biotechnology

Information (NCBI) database using the standard nucleotide–nucleotide homology search Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul *et al.* 1990).

4.5.4. Preparation of culture supernatants

One liter of Lactobacilli MRS broth was inoculated with 10 ml of *L. lactis* MM19 or *Ped. acidilactici* MM33 and incubated for 24 h at 35°C. Cell-free supernatant (CFS) was obtained by centrifuging the culture at 6 000 × g for 30 min at 4°C followed by neutralization to pH 6.5 by the addition of 5 mol l⁻¹ NaOH. The resulting CFS was then filtered through a 0.2 µm filter (Sarstedt, Montréal, QC, Canada).

4.5.5. Determination of antimicrobial spectrum and bacteriocin activity assay

Screening of bacteriocin production was performed by the agar well-diffusion assay as described by Schillinger and Lucke (1989). Liquid Lactobacilli MRS agar, 30 ml containing 0.75% agar, was inoculated with 10⁷ CFU ml⁻¹ of one indicator strain, poured into 100 × 15 mm standard Petri dishes and allowed to gel for 30 min at room temperature. Wells of 6 mm in diameter were cut and 80 µl of CFS of the bacteriocin-producing strains were placed into each well. All plates were then incubated at 35°C for 24 h and examined for formation of inhibition zones. Inhibition was scored positive if the width of the clear zone around the well was ≥ 0.5 mm. To quantify the bacteriocin activity, CFS was serially diluted with sterile deionized water and 80 µl of each dilution were added into the wells. *Lact. sakei* was used as the indicator strain because it was thought to be the organism most sensitive to the antimicrobial activity of both bacteriocin-producing LAB. The antimicrobial activity was defined as the reciprocal of the highest dilution which exerted total inhibition of the indicator lawn and was expressed in activity units (AU) per ml⁻¹ (Zamfir *et al.*, 1999). The residual activity was calculated in comparison with neutralized CFS from strain MM19 or MM33 which corresponded to a 100% antimicrobial activity.

4.5.6. Sensitivity of CFS antimicrobial activity to temperature, pH, proteolytic enzymes and gamma-irradiation treatments

The thermostability of the antimicrobial activities were determined by heating neutralized CFS prepared from *L. lactis* MM19 or *Ped. acidilactici* MM33 at 30 to 121°C for 15, 30 or 60 min. The effect of pH on the relative antagonistic activity was determined by adjusting the pH of the CFS to values from 2 to 10 using 5 mol l⁻¹ HCl or NaOH. The activity of each sample was compared to the activity of a CFS at pH 6.5 or 5 for supernatant from *L. lactis* MM19 or *Ped. acidilactici* MM33, respectively. The sensitivities of the antimicrobials to proteases or other agents was tested by incubating neutralized CFS in the presence of 1% α-chymotrypsin, pepsin, pronase E, trypsin, lipase, catalase, Tween-80, Triton X-100, urea, sodium dodecyl sulfate (SDS) or 0.25% proteinase K for 2 h at 35°C. Finally, the γ-irradiation sensitivities of the CFS antimicrobial activities were determined at the Canadian Irradiation Centre (Laval, QC, Canada), with increasing irradiation doses ranging from 0 to 40 kGy, using a Gamacell UC15-A apparatus (MDS-Nordion, Laval, QC, Canada) having a dose rate of 23 kGy h⁻¹. Residual antimicrobial activities were tested using the well-diffusion assay against *Lact. sakei* as described above.

4.5.7. Production studies

The kinetics of bacteriocin production were determined after inoculation of one liter of Lactobacilli MRS broth with a 1% (v/v) solution of *L. lactis* MM19 or *Ped. acidilactici* MM33, followed by an incubation at 35°C under agitation (100 rpm) without pH control. The initial pH of the culture broth was 6.5. Samples of 10 ml were removed from the cultures every 2 h and were analysed for microbial numbers, bacteriocin activity and pH. Bacterial growth was followed by enumeration of bacteria on Lactobacilli MRS agar incubated for 48 h at 35°C.

4.5.8. Size determination

A volume of 20 µl of crude CFSs from *L. lactis* MM19 and *Ped. acidilactici* MM33 were analysed with a NuPAGE 12% Bis-Tris gel kit (InVitrogen, Burlington, ON,

Canada) ran as described by the manufacturer at 200 V constant for 40 min. The molecular weight marker Mark 12 with a size range from 2.5 to 200 kDa kit (Invitrogen) was used. After electrophoresis, the first gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R250 (Invitrogen). A duplicate gel was used for the plate overlay assay. The plate overlay assay was conducted to estimate the molecular weight of the antimicrobial compounds as described by Bhunia *et al.* (1987). Briefly, a non-reduced SDS-PAGE gel pre-washed (sample not heated and without reducing agent) with sterile water was placed onto a plate of Lactobacilli MRS agar and overlayed with Lactobacilli MRS agar containing growing cells of *Lact. sakei* ATCC 15521 at number about 10^6 CFU ml⁻¹. The agar was allowed to solidify, then it was cooled at 4°C for 60 min. After incubation for 18 h at 35°C, the formation of an inhibition zone indicated the position and size of active bacteriocin in the gel.

4.6. Results

4.6.1. Isolation and identification of bacteriocin-producing strains

A total of 111 nonmotile, Gram-positive, catalase and oxidase negative cocci isolates, harvested from two stool samples obtained from a single human male (30 years-old) were first examined for potential inhibitory substances against twelve indicator strains (results not shown). From these 111 colonies, 7 of them were scored positive as they produced clear zones of inhibition against at least one indicator strain on agar media for an overall antimicrobial activity detection rate of 6%. Six of these colonies with bacteria of similar morphology had an identical spectrum of inhibition. One of these and the seventh one with a different spectrum of inhibition were selected and designated MM19 and MM33, respectively. 16S rDNA PCR products from MM19 and MM33 isolates showed 98% and 97% homology with that of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Pediococcus acidilactici*, respectively.

4.6.2. Characterization of the bacteriocins

The inhibitory spectrum of each bacteriocin produced by *L. lactis* MM19 and *Ped. acidilactici* MM33 are presented in Table 4.1. The bacteriocin from *L. lactis* MM19 exhibited inhibitory activity against a broad range of closely related bacteria in the genera *Enterococcus*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Staphylococcus*. The bacteriocin produced by *Ped. acidilactici* MM33 showed a narrower inhibitory spectrum against *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria* and *Pediococcus*. Both bacteriocins were ineffective against all Gram-negative bacteria tested.

The results of the effect of enzymes, detergents and other compounds on the CFS antimicrobial activity against *Lact. sakei* are presented in Table 4.2. Inhibitory activities were significantly decreased after protease treatments. In the case of *Ped. acidilactici* MM33, its antimicrobial activity was completely eliminated by all protease treatments whereas *L. lactis* MM19 showed residual antagonistic activity after trypsin and pepsin treatments. Lipase reduced the antimicrobial activity of *L. lactis* MM19, but no inhibition

of the bacteriocin-containing CFS secreted by *Ped. acidilactici* MM33 was observed. Catalase did not affect the activity of either type of CFS. Detergents doubled the inhibitory activity of the CFS obtained from *Ped. acidilactici* MM33. Urea reduced the activity of the CFS from *L. lactis* MM19 but did not affect the activity of CFS from *Ped. acidilactici* MM33. Appropriate controls were done to verify the antimicrobial potential of each enzyme and other agents assayed during this work, and none demonstrated antimicrobial activity *per se*.

Results of the effects of γ -irradiation on the CFSs are presented in Table 4.3. Bacteriocin activity of *L. lactis* MM19 was greatly reduced when the CFS was irradiated at a dose of 4 kGy, and was completely eliminated by a dose of 16 kGy. The antagonistic activity of the CFS of *Ped. acidilactici* MM33 was much more resistant to γ -irradiation as it showed substantial residual antimicrobial activity after a dose of 12 kGy, and some residual activity was still observed when the CFS was treated with 40 kGy.

The effect of temperature on the antimicrobial activity is shown in Fig. 4.1. *L. lactis* MM19 bacteriocin activity remained unchanged after incubation at 50°C for 60 min. Loss of activity was observed after incubation at 60°C for 30 min or at 70°C for 15 min. At 100°C, the residual antimicrobial activity decreased to 50, 25 and 0% after 15, 30 and 60 min. Heating to 121°C for 15 min completely inactivated the bacteriocin activity of *L. lactis* MM19. For *Ped. acidilactici* MM33, a decreased activity was observed after incubation at 80°C for 60 min, at 90°C for 30 min or at 100°C for 15 min.

The effect of pH on the bacteriocin antimicrobial activity is shown in Fig. 4.2. The bacteriocin secreted by *L. lactis* MM19 was stable after incubation for 2 h in solutions with pH values ranging from 2 to 10. However, its levels of activity were reduced by incubation at pH 9 and 10. The bacteriocin produced by *Ped. acidilactici* MM33 remained fully active at pH 4 and 5, but showed decreased activity at pH 3 and below, and pH 6 and above.

The production of bacteriocins in broth cultures by *L. lactis* MM19 and *Ped. acidilactici* MM33, was maximal after 6 and 10 h, respectively, where the maximum number of bacteria had been attained (Fig. 4.3). Minimum pH values of 4.4 and 4.1 were reached after 10 and 36 h with *L. lactis* MM19 and *Ped. acidilactici* MM33, respectively. Bacteriocins production was maximal in the early stationary phase of growth and appeared to be growth-associated. Antimicrobial activity declined during the late stationary phase, and the *L. lactis* MM19 population rapidly declined after 12 h of incubation.

With SDS-PAGE, smears of proteins were observed in samples from both microorganisms when using Coomassie Brilliant Blue (results not shown). However, inhibitory activities for both supernatants were detected as clear zones of inhibition between 3.5 and 6 kDa after gels were overlaid with *Lact. sakei*-seeded agar (Fig. 4.4).

4.7. Discussion

Numerous bacteriocins are produced by lactococci, including various nisins, lacticins, lactostrepcins, lactococcins and lactocins (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997; Moll *et al.*, 1999; Twomey *et al.*, 2002). Several strains of the *Pediococcus* genera such as *Ped. acidilactici*, *Ped. pentosaceus* and *Ped. parvulus* were found to produce pediocins. Pediocins thus far described have been reviewed by Ray and Miller (2000).

The two bacteriocins produced by the isolated LAB inhibited a wide spectrum of Gram-positive bacteria, including food-borne pathogens. However, they had no effect on any Gram-negative bacteria tested. Only a few bacteriocins, such as pediocin-like bacteriocins produced by non-human strains of pediococci (Jamuna *et al.*, 2004) or human *Lactobacillus salivarius* UCC118 (Dunne *et al.*, 1999) have been shown to inhibit the growth of Gram-negative bacteria. The bacteriocin production reported here was detected on solid media using crude CFS. This contrasts with other studies wherein a concentration step was needed to demonstrate the antimicrobial activities of bacteriocins (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997; Toure *et al.*, 2003).

The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin secreted by *L. lactis* MM19 was relatively wide, affecting many Gram-positive bacteria. This observation is similar to the *L. lactis* ATCC 11454 antimicrobial spectrum reported by Millette *et al.* (2004) using the same indicator strains. Moreover, the nisin-producing *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 was insensitive to the neutralized CFS produced by *L. lactis* MM19. This could be explained by the nisin immunity gene carried by the ATCC bacterial strain. However, it is well-known that nisin can also inhibit *Listeria* spp. (Cai *et al.*, 1997). Here, CFS from *L. lactis* MM19 did not inhibit the *Listeria* spp. tested, which indicates that the bacteriocin from *L. lactis* MM19 was not nisin. In addition, CFS from *L. lactis* MM19 was sensitive to temperatures higher than 70°C, a characteristic that is not consistent with the temperature stability of nisin and other class I or II bacteriocins. Bacteriocin AS-48, produced by *Ent. faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48, is active after heat treatment, and the

activity is pH dependent (Abriouel *et al.*, 2001). However, our study was done using neutralized CFS (pH 6.5) and no relation was established as yet between the pH and temperature stability of these bacteriocins. Lipase treatment reduced the antimicrobial activity of the CFS. It could be hypothesized that fatty acids are involved in the adsorption of the bacteriocin to the bacterial membrane. Lipase treatment of *L. sakei* was therefore realized to verify this assumption, but no reduction of the antimicrobial activity was observed (results not shown) suggesting that the bacteriocin produced by *L. lactis* MM19 could be a lipopeptide. The presence of active lipase during the activity test could have hydrolysed the bacteriocin adsorption site at the surface of the indicator strain resulting in a lowered activity. Experiments are planned to verify this point.

The rapid *L. lactis* MM19 population decrease observed during bacteriocin production studies was believed to be related to bacterial autolytic activity similar to that observed for another bacterial system (Sallami *et al.*, 2004). After 10 h of incubation, the population and bacteriocin concentration were maximal while the pH was relatively low. High population density, low pH or sub-optimal nutrient concentration could be responsible for the induction of autolysis in *L. lactis* MM19. This bacterial strain thus possesses two interesting phenotypes (bacteriocin production and autolytic capacity) that could be suitable in the cheese industry. Indeed, Sallami *et al.*, (2004) concluded that the addition of an autolytic strain of *Lact. bulgaricus* UL12 together with a nisin-producing strain improved the texture of cheese and increased its proteolysis.

The sensitivity to proteolytic enzymes of the bacteriocin secreted by *Ped. acidilactici* MM33 is similar to those of the pediocins SJ-1 (Schved *et al.*, 1993) or AcH/PA-1 (Bhunia *et al.*, 1988). However, the latter peptides like class I and IIa bacteriocins generally, are heat-stable and can tolerate temperatures over 100°C without loss of activity at acidic pH whereas the bacteriocins produced by *L. lactis* MM19 and *Ped. acidilactici* MM33 were not so resistant to heat treatment. The neutral pH (6.5) used during the test could explain the relative heat lability of both these bacteriocins. However, the resistance to γ -irradiation of the bacteriocin from *Ped. acidilactici* MM33

makes it a good candidate to be used in food preservation. Irradiation may be used in combination with a bacteriocin to reduce the D_{10} values of microorganisms responsible for food deterioration and enhance the shelf-life of products (Chiasson *et al.*, 2004; Lacroix and Chiasson, 2004). Finally, the antimicrobial activities of the CFS of *L. lactis* MM19 and *Ped. acidilactici* MM33 were inhibited by proteases but not by catalase, indicating the proteinaceous nature of the antimicrobials. These results in combination with the results from the SDS-PAGE inhibitory assay confirmed that bacteriocins are involved in the antimicrobial activity of CFS.

The antimicrobial compounds secreted by *L. lactis* MM19 or *Ped. acidilactici* MM33 might be useful for treatment of multidrug-resistant staphylococcal, enterococcal or streptococcal infections, including methicillin-resistant *Staph. aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) (Whitney *et al.*, 2000; Diekema *et al.*, 2001). The bacteriocin-producing *L. lactis* MM19 and *Ped. acidilactici* MM33 themselves also might be useful as starter or protective cultures in cheese, fermented sausage or other fermented foods. Finally, utilization of LAB strains that are able to successfully colonize the intestinal tract is a very promising means of preventing enteric infections. Experiments are currently planned to further characterize the bacteriocins produced by the two isolates and determine their effects on pathogenic bacteria.

Acknowledgements

This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council and by Bio-K + Inc. Int. (Laval, Qc, Canada) under a research agreement. The authors are grateful to MDS Nordion for irradiation treatment and to Anik Ruel and Élisa Courois for technical assistance. We sincerely thank Anastasia Nikolakakis for its linguistic assistance. M. Millette is a scholarship recipient of Fondation Armand-Frappier.

Table 4.1. Inhibitory activities against lactic acid bacteria and other indicator microorganisms of neutralized, cell-free supernatants from cultures of *Lactococcus lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33.

Indicator microorganisms	Source*	Medium	Inhibition †	
			MM19	MM33
<i>Enterococcus faecalis</i>	LSPQ 2724	BHI	-	+
<i>Enterococcus faecium</i>	LSPQ 3550	BHI	+	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	BHI	-	-
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	EDL 933	BHI	-	-
<i>Kocuria varians</i>	Our collection	MRS	++	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	ATCC 53103	MRS	+++	+++
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	MRS	++	-
<i>Lactobacillus curvatus</i>	FRDC V32	MRS	++	++
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Our collection	MRS	+++	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 9595	MRS	+++	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	FRDC RW-9595M	MRS	+++	-
<i>Lactobacillus sakei</i>	ATCC 15521	MRS	+++	+++
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 11454	MRS	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> MM19	Our collection	MRS	-	-
<i>Listeria innocua</i>	LSPQ 3285	BHI	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ½ a	HPB 1043	BHI	-	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	HPB 1174	BHI	-	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	HPB 2142	BHI	-	++
<i>Listeria monocytogenes</i> ½ b	HPB 2371	BHI	-	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> ½ b	HPB 2558	BHI	-	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> ½ a	HPB 2569	BHI	-	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> ½ b	HPB 2739	BHI	-	+++
<i>Listeria monocytogenes</i> ½ a	HPB 2812	BHI	-	+++
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Our collection	MRS	++	+
<i>Pediococcus acidilactici</i> MM33	Our collection	MRS	+++	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	BHI	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	FRDC V491	BHI	-	-
<i>Pseudomonas fragi</i>	FRDC V378	BHI	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	FRDC V376	BHI	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i> serotype Typhi	ATCC 19430	BHI	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium	SL1344	BHI	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	Our collection	BHI	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	BHI	++	-

* ATCC - American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; LSPQ - Laboratoire de Santé Publique, Ste-

Anne-de-Bellevue, QC, Canada ; FRDC – Food Research and Development Center, St-Hyacinthe, QC, Canada; HPB - Health Product Branch, Santé Canada.

† +++, diameter of the inhibition zone ≥ 20 mm; ++ : 10-19 mm; + : 7-9 mm; - : no inhibition.

Table 4.2. Effects of various enzymes, detergents and urea on the antimicrobial activities of neutralized cell-free supernatants from cultures of *Lactococcus lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33 against *Lactobacillus sakei* used as indicator strain.

Additive	Residual activity (%) [*]	
	<i>L. lactis</i> MM19	<i>Ped. acidilactici</i> MM33
None	100	100
Pronase E (1%)	0	0
Proteinase K (0.25%)	1.6	0
Pepsin (1%)	12.5	0.8
Trypsin (1%)	50	0.8
α -chymotrypsin (1%)	1.6	0
Catalase (1%)	100	100
Lipase (1%)	25	100
Tween-80 (1%)	100	200
Triton X-100 (1%)	100	200
SDS (1%)	100	200
Urea (1%)	25	100

* Antimicrobial activities of supernatants without additives are 100%. Results are means of three individual assays with a SD less than 5% about the mean.

Table 4.3. Effects of gamma irradiation on the antimicrobial activities of neutralized cell-free supernatants from cultures of *Lactococcus lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33 against *Lactobacillus sakei* used as indicator strain.

Doses (kGy)	Residual activity (%) [*]	
	<i>L. lactis</i> MM19	<i>Ped. acidilactici</i> MM33
0	100	100
4	3.1	100
8	1.2	50
12	0.4	50
16	0	25
20	0	12.5
24	0	12.5
28	0	12.5
32	0	12.5
36	0	12.5
40	0	6.3

* Results are means of three individual assays with a SD less than 5% about the mean.

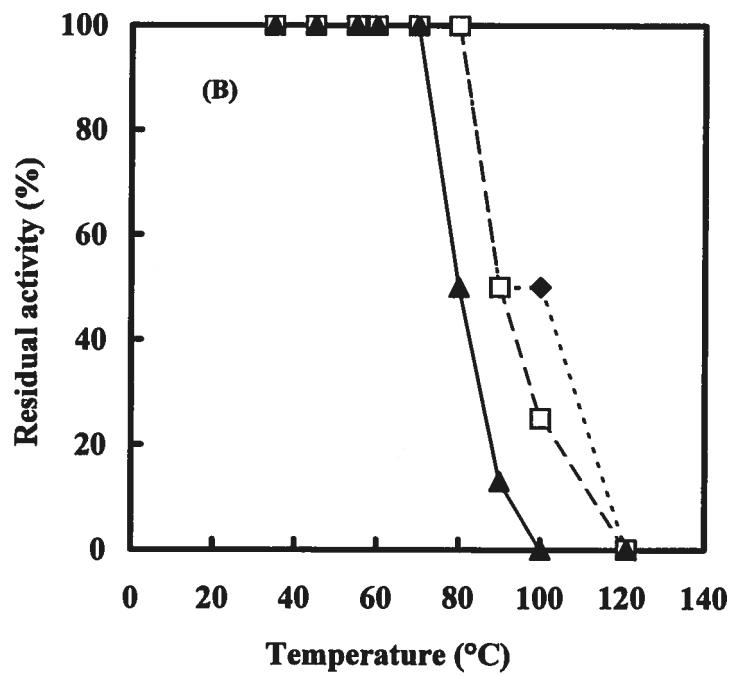
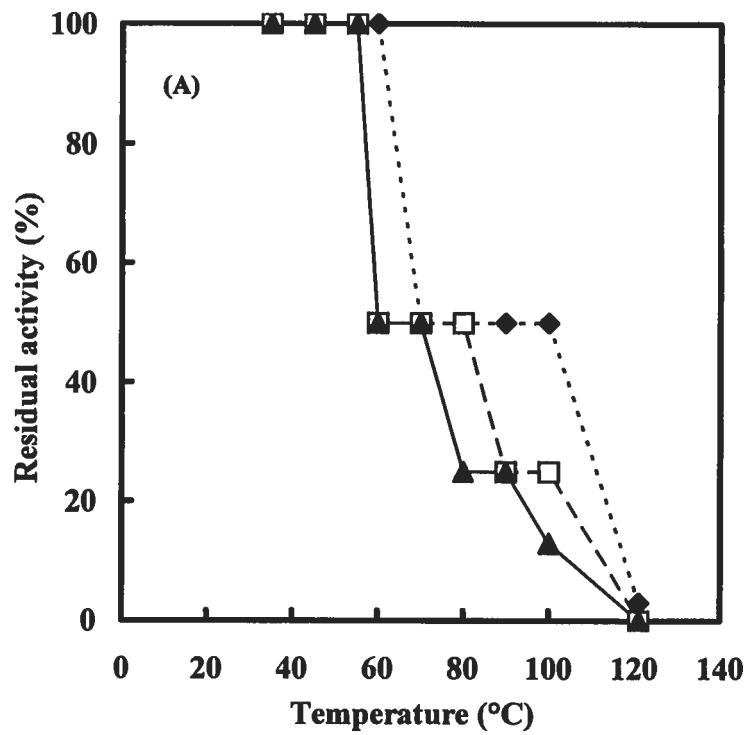


Figure 4.1. Effects of exposure to various temperature for times of 15 min (◆), 30 min (□) or 60 min (▲) on the antimicrobial activity of cell free supernatants from cultures of (A) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM19 or (B) *Pediococcus acidilactici* MM33.

Results are means of three individual assays with a SD less than 5% about the mean.

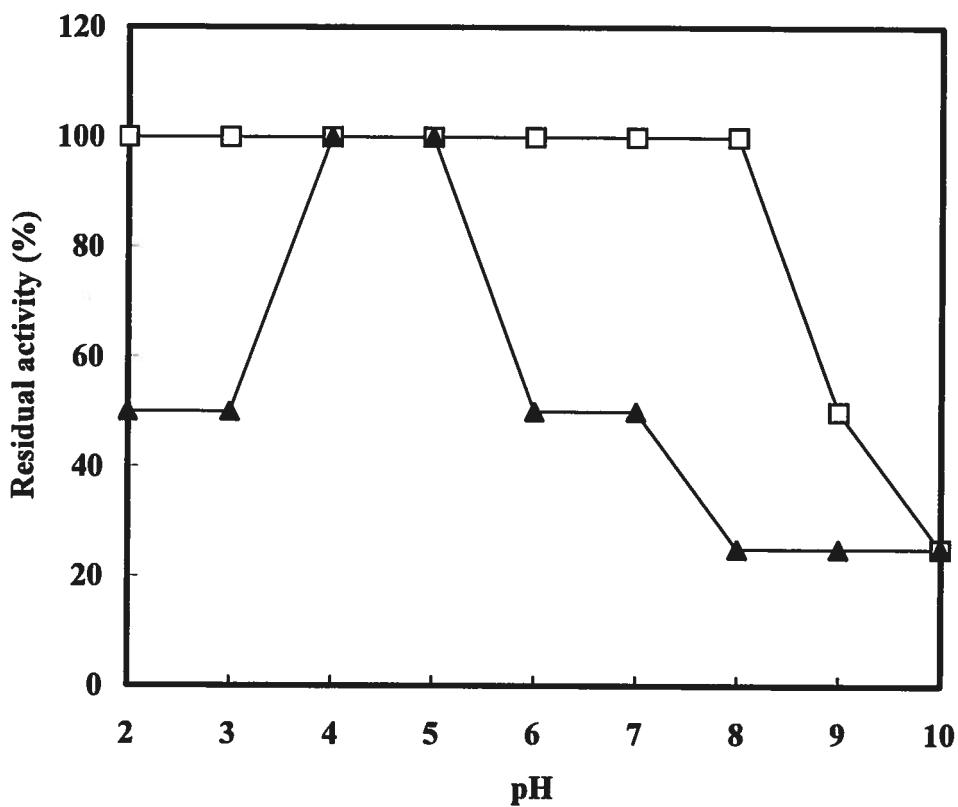


Figure 4.2. Effects of pH on the relative antimicrobial activities of cell free supernatants from cultures of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM19 (□) or *Pediococcus acidilactici* MM33 (▲). Results are means of three individual assays with a SD less than 5% about the mean.

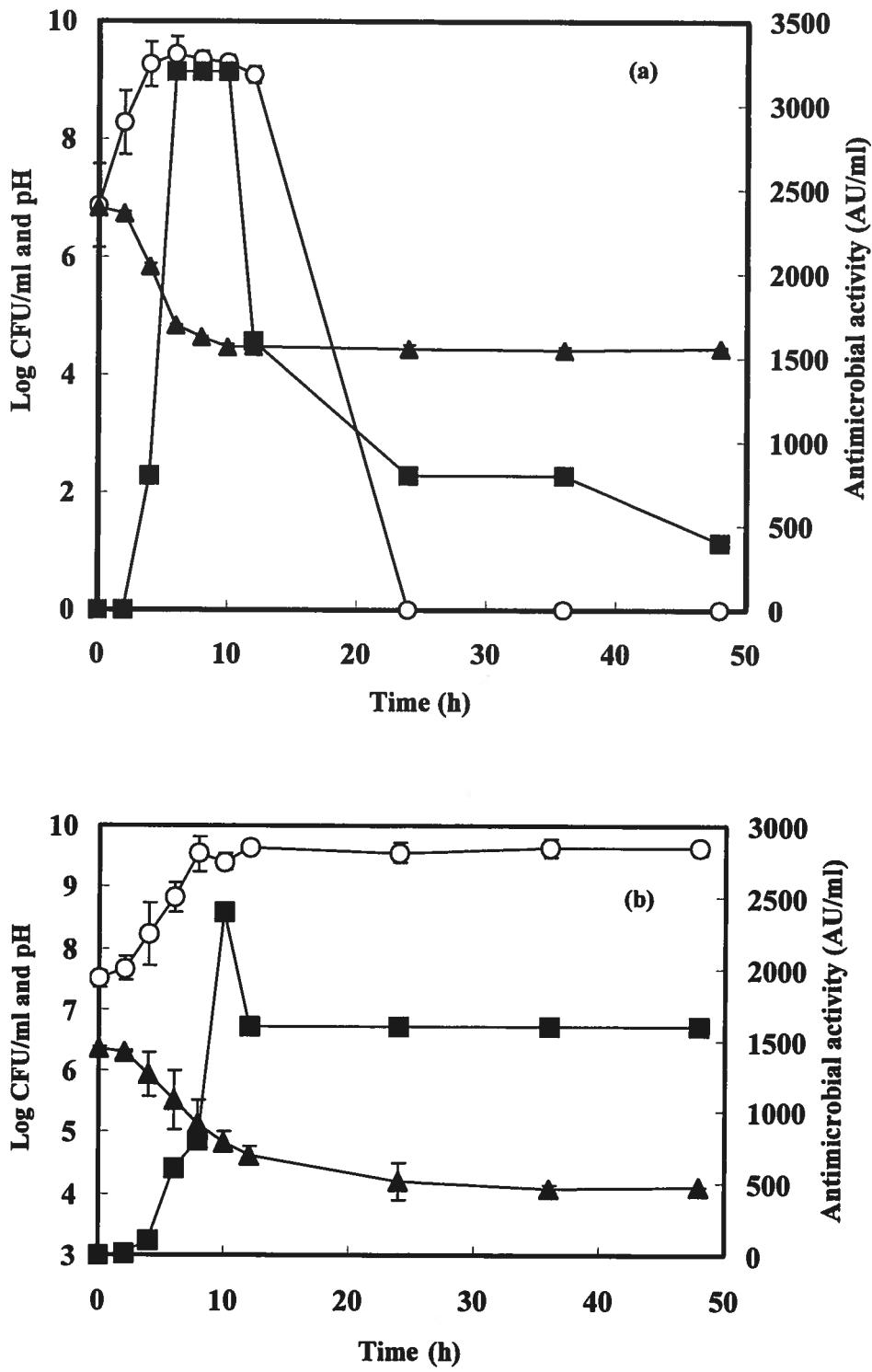


Figure 4.3. Number of bacteria (O), amounts of bacteriocin (■) and pH values (▲) in cultures of (A) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM19 or (B) *Pediococcus acidilactici* MM33 in Lactobacilli MRS broth during growth at 35 °C under aerobic conditions. Results are means of three individual assays with a SD less than 5% about the mean except for the number of bacteria.

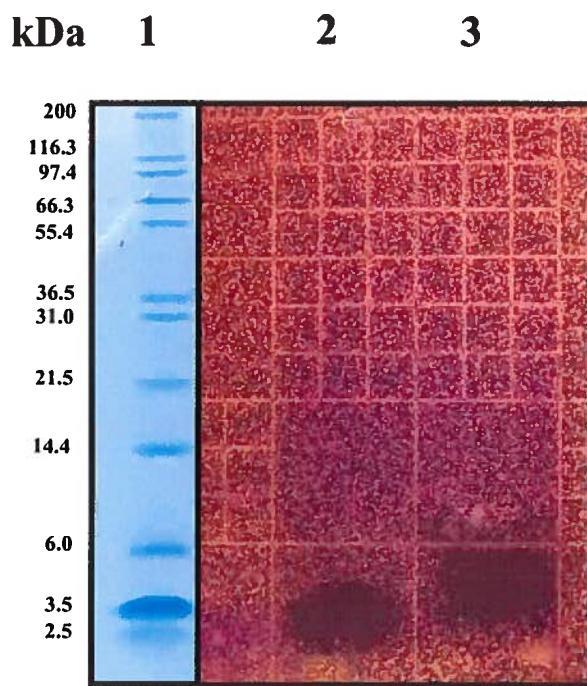


Figure 4.4. SDS-PAGE profiles of the bacteriocins formed in the supernatants of cultures of *Lactococcus lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33. The gel placed onto the Lactobacilli MRS agar was overlaid with Lactobacilli MRS soft agar inoculated with *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 and incubated for 18 h at 35 °C. Inhibition zones formed by active components are shown. Lane 1: Molecular weight marker Mark 12; lane 2: Bacteriocins from *L. lactis* MM19; lane 3: Bacteriocins from *Ped. acidilactici* MM33.

CHAPITRE 5

Publication 4

**Purification and identification of the pediocin produced by
Pediococcus acidilactici MM33, a new human intestinal strain.**

Running title: Human pediocin-producing *P. acidilactici*

Mathieu Millette¹, Claude Dupont², François Shareck², M. T. Ruiz³, Denis Archambault⁴,
Monique Lacroix¹

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Research Laboratories in Sciences Applied to Food,
Canadian Irradiation Centre,
531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7 ;

² INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada,
H7V 1B7 ;

³ Bio-K+ International Inc., 495 Boulevard Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada,
H7V 4A7;

⁴ Université du Québec à Montréal, Département des Sciences Biologiques, C.P.8888,
Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8.

Ce chapitre a été soumis et accepté pour publication le 19 juillet 2007 dans:
Journal of Applied Microbiology

5.1. Contributions des auteurs

J'ai imaginé, mis au point, réalisé toutes les expériences et rédigé le manuscrit scientifique. Le Prof. Claude Dupont a contribué directement au développement de la méthode de purification et m'a formé à l'utilisation d'appareils de chromatographie en phase liquide. Il a participé aux discussions scientifiques et a révisé le manuscrit. Le Prof. François Shareck a participé à l'élaboration des protocoles de biologie moléculaire. Il a participé aux discussions scientifiques et a révisé le manuscrit. La Dr. Marcia T. Ruiz et le Prof. Denis Archambault ont participé aux discussions scientifiques du projet et ont révisé le manuscrit. La Prof. Monique Lacroix était la responsable scientifique et la coordinatrice du projet de recherche. De plus, la Prof. Lacroix a supervisé l'élaboration des protocoles et les discussions scientifiques entourant ce projet. Elle a révisé le manuscrit.

5.2. Résumé en français

Purification de la pédiocine sécrétée par *Pediococcus acidilactici* MM33, une nouvelle souche isolé de l'intestin humain

Pediococcus acidilactici MM33 producteur de bactériiocines a été isolé de l'intestin humain dans nos laboratoires. Afin d'identifier le peptide antimicrobien sécrété dans le surnageant de *P. acidilactici* MM33, la purification de la bactériocine a été réalisée par une chromatographie d'échanges cationiques suivi d'une étape de phase inversée. Les analyses biochimiques et de spectrométrie de masse ont montré que la bactériocine sécrétée était identique à la pédiocine PA-1. Afin de vérifier que *P. acidilactici* MM33 porte le gène de la pédiocine PA-1, l'ADN total de *P. acidilactici* MM33 a été isolé et amplifié avec le gène de structure de la pédiocine PA-1. Le produit de PCR obtenu a été séquencé et la séquence nucléotidique s'est avérée identique à celle de la pédiocine PA-1. Un traitement à la novobiocine de *P. acidilactici* MM33 a résulté en une souche sans plasmide et ayant perdu la capacité de produire une bactériocine. Les épreuves antimicrobiennes et les analyses moléculaires ont confirmé que cette souche était *ped*⁻. Ces expériences ont démontré que l'opéron *ped* est associé à un gène situé sur un plasmide. Les tests antimicrobiens *in vitro* ont révélé que la pédiocine était bactericide contre *Listeria monocytogenes* sérotype ½a et avait une CMI de 200 UA/ml dans du bouillon TSB. *P. acidilactici* MM33 est la première souche productrice de pédiocine isolée de l'intestin humain et pourrait être utilisée comme probiotique pour prévenir et/ou contrôler la colonisation par des pathogènes entériques.

5.3. Abstract

Aims: The aim of this study was to purify and identify the bacteriocin produced by

Pediococcus acidilactici MM33, a strain previously isolated from human gut. **Methods**

and results: Purification of the bacteriocin was performed by cationic exchange

chromatography followed by a reverse phase step. Amino acid sequencing and molecular

weight determination by mass spectrometry analysis showed homology with pediocin

PA-1. To verify if *P. acidilactici* MM33 carried the pediocin PA-1 gene, total DNA was

used to amplify the pediocin gene. The PCR product obtained was then sequenced and

the nucleotide sequence revealed to be identical to that of pediocin PA-1. Treatment of *P.*

acidilactici MM33 with novobiocin resulted in a plasmid-cured strain without

bacteriocin-producing capacity. Antimicrobial assay and molecular analysis demonstrated

that this strain was *ped*⁻ suggesting that the *ped* cluster is plasmid-encoded. Antimicrobial

assay revealed that pediocin was bactericidal against *Listeria monocytogenes*, showing a

MIC of 200 AU/ml. **Conclusion:** A two-step purification procedure was elaborated in

this study. The bacteriocin secreted by the human strain *P. acidilactici* MM33 is carried

on a plasmid and the amino acid sequence is identical to pediocin PA-1.

Significance and impact of the study: *P. acidilactici* MM33 is the first human pediocin-

producing strain reported and could be used as probiotic to prevent enteric pathogens

colonization.

Keywords: Bacteriocin; *Pediococcus acidilactici*; pediocin; antimicrobial peptide

5.4. Introduction

Lactic Acid Bacteria (LAB) bacteriocins are classified into three classes (Drider *et al.* 2006). Class I regroups small (< 5 kDa) ribosomally produced peptides that undergo extensive post-translational modification. This class is further divided into two sub-groups. Class Ia includes elongated, amphipathic, pore-forming lantibiotics (e.g. nisin) and class Ib regroups rigid and globular antimicrobial peptides (e.g. mersacidin). Class II peptides are small (< 10 kDa), membrane-active, unmodified peptides. This class is subdivided into three sub-groups. Class IIa are pediocin-like anti-*Listeria* peptides with their N-terminal part characterized by a YGNGVXC consensus motif. Class IIb bacteriocins require combination of two polypeptides for full antimicrobial activity (e.g. enterocin L50) while class IIc are other bacteriocins (e.g. acidocin B). Class III comprises large, heat labile protein (> 30 kDa) such as helveticin J. Pediocins fall under class IIa bacteriocins. They are produced by foodborne strains of *Pediococcus* spp. such as *P. acidilactici* or *P. pentosaceus* and can be used to prevent foodborne illnesses including listeriosis (Ennahar *et al.* 1999; Rice 2006). Pediocins are bactericidal peptides produced via a plasmid-linked operon. Its antimicrobial activity is resistant to 80°C for up to 60 min, stable at pH ranging from 3 to 9 and in presence of many organic solvents (Ray and Miller 2000). Most pediocin thus far described in the literature were produced by foodborne strain, have an amino acid sequence and a molecular weight (4.6 kDa) that are similar to pediocin PA-1/AcH. However, the pediocins A, P and ACCEL seem unique because they have a molecular weight of about 5.1, 80, and 12.5 kDa respectively (Ray and Miller 2000; Osmanagaoglu *et al.* 2000; Wu *et al.* 2004). It was postulated that pediocin PA-1/AcH needs a mannose permease ($\text{EII}_{\text{t}}^{\text{Man}}$) located on the cytoplasmic membrane of sensitive bacteria in order to cause the release of potassium and other UV-absorbing molecules, the dissipation of the proton motive force and ΔpH and induce rapid depletion of intracellular ATP (Drider *et al.* 2006).

Pediococcus acidilactici MM33 was originally isolated from human stool and it was the first bacteriocin-producing strain of this specie originating from the human gut. The peptide has a high antilisterial activity and is also active against a range of Gram-positive

bacteria, including members of the genera *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria* and *Pediococcus*. This bacteriocin was inactivated by many proteolytic enzymes such as pronase E, proteinase K, pepsin, trypsin and α -chymotrypsin. It was also resistant to 80°C for up to 30 min and was stable at pH ranging from 2 to 7 (Millette *et al.* 2007).

The objectives of this work were to purify and identify the bacteriocin produced by *P. acidilactici* MM33. The molecular weight and the amino acid sequence as well as the plasmid linkage of the bacteriocin production capacity were determined. The time-kill study of the purified bacteriocin evaluated the potential to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes*.

5.5. Material and methods

5.5.1. Bacterial strains and growth conditions

The pediocin-like producer strain *Pediococcus acidilactici* MM33 was previously isolated from human stool (Millette *et al.* 2007). The indicator strain used during antimicrobial activity tests was *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, because this strain was very sensitive to the antimicrobial molecule secreted by *P. acidilactici* MM33 (Millette *et al.*, 2007). *Listeria monocytogenes* HPB 2812 serotype ½a was provided by Health Products and Food Branch of Health Canada (Montréal, QC, Canada) and used for time-kill study of the bacteriocin. The bacterial strains were maintained at -80°C in Lactobacilli MRS media (deMan, Rogosa and Sharpe (MRS); Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for both LAB and brain-heart infusion (BHI; Difco) for *L. monocytogenes* containing 10% glycerol (w/v). Before their utilization, strains were propagated twice in MRS or BHI broth overnight at 37°C without agitation. Soft agar media was prepared by the addition of 0.75% (w/v) agar to examine the bacterial antimicrobial capacity using the well-diffusion assay (Millette *et al.* 2004).

5.5.2. Pediocin purification procedures

The purification of the bacteriocin produced by *P. acidilactici* MM33 was performed using a modified version of the rapid two-step procedure described by Uteng *et al.* (2002). *P. acidilactici* MM33 was first incubated in 10 ml of MRS broth for 18 h at 37°C. This culture was transferred into 500 ml of MRS medium and incubated for 18 h at 37°C. Bacterial cells were then eliminated by a 20 min centrifugation step at 8000 × g at 4°C. The supernatant was vacuum-filtered through a 0.20 µm pore-size nylon filter (Millipore, Nepean, ON, Canada) and served as starting material for the purification procedures (fraction I). The bacterial culture supernatant was loaded directly on a 20-ml HiPrep SP Fast Flow cation-exchange column (GE Healthcare) after equilibration with 50 mmol l⁻¹ acetate buffer, pH 5.0 (starting buffer) at a flow rate of 2.75 ml min⁻¹. After washing the column with 200 ml of starting buffer, the bacteriocin was eluted using a gradient (0-20% in 10 min; 20-30% in 120 min; 30-100% in 15 min) of elution buffer (50 mmol l⁻¹ acetate buffer containing 1 mol l⁻¹ NaCl, pH 5.0) at a flow rate of 2.75 ml min⁻¹.

Fractions were collected and tested using the well-diffusion assay for bacteriocin activity (Millette *et al.* 2007). The active fractions determined by 17 mm or less of inhibition zone following the antimicrobial activity test were pooled (*pool 1*) while the other active fractions (18 mm or more) were pooled (*pool 2*) separately. Pooled fractions were then applied on 2 Sep-Pak Plus cartridges (Waters, Dorval, QC, Canada) in tandem to eliminate salts. This procedure, a modification from Uteng *et al.* (2002), was realized in order to reduce the cost of the pediocin purification. In this way, it eliminates the need for an expensive HPLC system. Cartridges were first equilibrated with 20 ml of 100% acetonitrile (Laboratoire MAT, Beauport, QC, Canada) followed by 10 ml of water. Pooled sample was applied at a flow rate of 2 drops/s and successively washed with 10 ml of 0, 10, 20 and 30 % acetonitrile and final elution was done with 30 ml of 80% acetonitrile. The 30 and 80% acetonitrile fractions were pooled and the solvent evaporated using a Rotavapor (Büchi, Switzerland) at 65°C for 15 min (fraction III). The residual suspension was lyophilized overnight.

5.5.3. Bacteriocin activity assay

Bacteriocin activity was measured using the agar well-diffusion assay as described by Millette *et al.* (2007). To verify whether the inhibition is caused by bacteriocin, evaluations were done as described above, but proteases from *Streptomyces griseus* type XIV (1 mg ml⁻¹; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) were added in the soft agar (Millette *et al.* 2004).

5.5.4. Size determination

Crude or purified cell-free supernatants from *P. acidilactici* MM33 were analysed with a NuPAGE 12% Bis-Tris gel kit (InVitrogen, Burlington, ON, Canada) ran as described by the manufacturer's recommendations at constant voltage (133 V h⁻¹). The molecular weight marker Mark 12 with a size range from 2.5 to 200 kDa kit (InVitrogen) was used. After electrophoresis, one gel was stained using SimplyBlue SafeStain (InVitrogen) as described by the manufacturer. A duplicate gel was used for the plate overlay assay in order to estimate the molecular weight of the bacteriocin (Bhunia *et al.* 1987).

5.5.5. Protein concentration determination

Protein concentration was determined using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) and BSA was used to prepare the standard curve.

5.5.6. Tryptic digestion of bacteriocin

Ten μl of a solution of pediocin ($217 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$) was diluted with $56 \mu\text{l} 25 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NH}_4\text{HCO}_3$ then $10 \mu\text{l}$ of DTT (45 mmol l^{-1}) was added and the solution was incubated at 60°C for 30 min. The solution was allowed to cool at room temperature and was subsequently treated with $10 \mu\text{l}$ iodoacetamide (100 mmol l^{-1}) and then incubated in the dark at room temperature for 30 min. Fourteen μl of $0.1 \text{ }\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ of trypsin was added and the solution was incubated at 37°C for 4 h. The solution was then quenched with $100 \mu\text{l}$ of 2% acetonitrile diluted in water and containing 0.1 % trifluoroacetic acid.

5.5.7. Mass determination by mass spectrometry

Amino acid sequencing and mass determination were done by High-Performance Liquid Chromatography combined with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Liquid chromatography (LC) analyses were performed with a nanoLC system, type Agilent 1100 Series (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA). A gradient of solvent A (5% acetonitrile in water with 0.1% formic acid) and solvent B (90 % acetonitrile in water with 0.1% formic acid) at a flow rate of 0.4 ml min^{-1} was used. The gradient was as follow: a wash step of 5 min with 87% of solvent A was followed with a gradient of 9 min to bring the solvent A to 82%. Then, solvent A was reduced to 50% in 10 min and to 0% in 3 min. Finally, a clean-up step was done during 5 min with 100% solvent B. The column switching system consisted of a trap column (ZORBAX 300 SB-C18 reversed phase, $5 \times 0.3 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ particles size (Agilent Technologies Inc.) and an analytical column (ZORBAX 300 SB-C18 reversed phase, $150 \text{ mm} \times 75 \mu\text{m}$, $3.5 \mu\text{m}$ particle size (Agilent Technologies Inc.). All mass spectra were recorded on a Linear Ion Trap Quadrupole LC/MS/MS Mass Spectrometer (AB Applied Biosystems, MDS SCIEX Instruments, CA, USA) equipped with a nano-electrospray ionization source. The accumulation of MS-MS data was performed with the Analyst software, version 1.4 (AB

Applied Biosystems). Mascot Distiller (Matrix Science, London, UK) was used to create peak lists from MS and MS-MS raw data. Mascot Server (Matrix Science) was used for database searching.

5.5.8. Polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing

The PCR amplification was performed in a 50 µl reaction volume containing 5 µl of 10× PCR reaction buffer plus MgSO₄ (100 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 8.85, 250 mmol l⁻¹ KCl, 50 mmol l⁻¹ (NH₄)₂SO₄; Roche Canada, Laval, QC, Canada), 2 µl of 25 mmol l⁻¹ MgSO₄, 0.05% Tween-20, 4% propionamide, 0.6 µmol l⁻¹ of 3' and 5' end primers, 800 µmol l⁻¹ of deoxynucleotide triphosphate (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada) and 2.5 U of Pwo DNA polymerase (Roche Canada). About one hundred single colonies were picked with a sterile toothpick from the surface of a MRS agar plate and mixed in the PCR solution. A DNA thermo cycler (Biometra, Montreal Biotech, Dorval, QC, Canada) was used to provide the temperature cycles as follow: 94°C for 3 min. Then, 30 cycles at 94°C for 45 s, 50°C for 45 s and 72°C for 1 min were done with the final elongation step at 72°C for 7 min. The primers were designed from pediocin PA-1/AcH structural gene, which were complementary to bp 1076 to 1100 (primer 1) and 1238 to 1264 (primer 2). The restriction sites *Eco*RI and *Kpn*I were added at the 5' end, of primer 1 and primer 2 respectively, for cloning purpose.

Pediocin 5' 3' AAAGAATTGATGAAAAAAATTGAAAAATTAACTG 3'

Pediocin 3' 5' AAAGGTACCCTAGCATTATGATTACCTTGATGTCC 3'

The amplified PCR products were visualized and then purified from a 2% agarose gel using a Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). The nucleotide sequences were determined through the services of Génome Québec (Montréal, QC, Canada).

5.5.9. Plasmid curing

Plasmid curing of *P. acidilactici* MM33 was performed using a modified version of the procedure described by Miller *et al.* (2005) to determine if bacteriocin production

is plasmid linked. Tubes of 4.9 ml of MRS medium containing 2.5 µg ml⁻¹ of novobiocin (Sigma) were inoculated with 50 µl *P. acidilactici* MM33 and incubated for 24 h at 37°C. Inoculums from each tube were then transferred to fresh MRS-novobiocin medium during the subsequent five days. At the end of the treatment period, ten-fold serial dilutions of each tubes were performed in peptone water (0.1%, w/v, Difco) and appropriate dilutions were spread on MRS agar plates and incubated in an anaerobic jar system (BBL GasPak system, Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, USA) at 37°C. After 48 h incubation, 100 bacterial colonies were randomly selected and transferred to MRS agar plates and incubated under anaerobic conditions at 37°C. These isolates were then tested for bacteriocin production using the well-diffusion assay. Proteases were added as a control to confirm the presence of a bacteriocin. A non-bacteriocin-producing colony (*ped*⁻) was isolated, named *P. acidilactici* MM33A, stored at -80°C in glycerol-MRS broth and their plasmid DNA was purified.

5.5.10. Plasmid DNA purification

Colonies of *P. acidilactici* MM33 and MM33A (*ped*⁻) were grown overnight in 10 ml of MRS broth at 37°C. Inoculums from these cultures were subsequently grown in 10 ml of fresh MRS overnight. Thereafter, cells from a sample of 1.5 ml were harvested by centrifugation at 1500 × g for 20 min at 4 °C and the plasmid DNA was isolated using the method of Duan *et al.* (1999). DNA was stored at -20°C until it was examined by a 0.7% agarose gel electrophoresis.

5.5.11. Time-kill studies of pediocin from *P. acidilactici* MM33

Different amounts of purified bacteriocin (0 to 800 AU/ml) were added to cultures of *L. monocytogenes* HPB 2812 serotype ½a in early exponential phase (grown for 6 h) and incubated at 37°C. Bacterial growth was monitored by measuring the bacterial population in a 1-ml sample taken every 2 h of incubation. These samples were serially diluted ten-fold in peptone water (0.1% w/v) (Difco), pour plated in BHI agar and then incubated at 37°C for 24 h. Colonies were counted using Darkfield Quebec Colony Counter (American Optical, Scientific instrument division, Keene, OH, USA).

5.6. Results

The first step to purify the proteinaceous compound secreted by *P. acidilactici* MM33 was a cation exchange chromatography (Figure 5.1). At this stage, two pools were recovered. *Pool 1* containing active fractions with less than 18 mm of inhibition and *Pool 2* containing the active fractions with 18 mm or more of inhibition. About fifty percent of total pediocin activity was recovered after cation-exchange chromatography in Fraction II with a specific activity 725-fold higher than that of the cell-free supernatant (CFS) (Table 5.1). After Sep-Pak separation and rotavapor concentration step, the purification yield was 40% with specific activity 5 725-fold higher than the specific activity of the CFS (Table 5.1). Separation by SDS-PAGE yielded a unique peptide band (black arrow in lane 5) between 3.5 and 6 kDa (Figure 5.2A). This band showed an antimicrobial activity against *Lact. sakei* (Figure 5.2B, lane 5). Homogeneity of the purified bacteriocin was confirmed by staining with silver nitrate, where a single band was observed (not shown) as for the case of Coomassie Blue staining (Figure 5.2A).

The intact protein was then analyzed with the LC-MS system described above. The amino acid sequence of the bacteriocin produced by *P. acidilactici* MM33 was predicted by the Mascot software package from LC-MS data. It comprises 44 amino acid residues and the calculated mass of the pediocin was 4 625 Da. The pediocin solution which was analyzed contained pediocin in its oxidized and non-oxidized forms due to the oxidation of methionine. The experimental mass obtained was 4 626 Da for the non-oxidized form and 4 643 Da for the oxidized form (data not shown). In addition, DNA sequencing of the 188 bp PCR product confirmed that the gene encoding for pediocin of *P. acidilactici* MM33 is identical to *pedA* from *P. acidilactici* PAC1.0 (data not shown).

In order to demonstrate if this human strain harbours the pediocin PA-1/AcH gene, PCR analysis using the known sequence of the structural pediocin PA-1/AcH gene was performed. Two primers complementary to sequences at the 3' and 5' ends of the pediocin PA-1/AcH were used to amplify the potential pediocin gene from total DNA of *P. acidilactici* MM33 or *Lactococcus lactis* ATCC 11454 colonies. A single 188-bp fragment was amplified from DNA of *P. acidilactici* MM33 while no fragment was

amplified from DNA neither of *P. acidilactici* MM33A nor of *L. lactis* ATCC 11454 (data not shown). The PCR product DNA was then sequenced and compared to published database. Results indicated 100% homology with *pedA* gene of *P. acidilactici* PAC1.0 (data not shown).

Plasmid curing was performed in order to determine if the gene encoding the production of pediocin by *P. acidilactici* MM33 is harboured on a plasmid, as reported for other pediocin-like bacteriocins (Ray and Miller 2000). Novobiocin was used as a curing agent since it is known that small concentration of this antibiotic prevent plasmid replication via DNA gyrase antagonism (Hooper *et al.* 1984). After novobiocin treatment of *P. acidilactici* MM33, about a hundred colonies were tested to determine whether they retained their bacteriocin activity. One colony without antimicrobial activity was then isolated and named *P. acidilactici* strain MM33A. Figure 5.3A shows antimicrobial activity of the supernatant produced by *P. acidilactici* MM33 while Figure 5.3C show that the supernatant produced by *P. acidilactici* MM33A did not exert an antimicrobial activity. Controls with protease were done in Figure 3B and 3D to confirm the protein nature of this antimicrobial activity.

The plasmid DNA was then extracted from both strains and analyzed by agarose gel electrophoresis. Results show that the novobiocin-treated *P. acidilactici* MM33A strain lost its plasmid DNA as compared with the plasmid DNA purified from bacteriocin-producing *P. acidilactici* MM33 strain (data not shown).

An exponentially growing culture of the indicator organism *L. monocytogenes* serotype ½a HPB 2812, was treated with purified pediocin produced by *P. acidilactici* MM33 (0-800 arbitrary unit (AU) ml⁻¹) and the cell viability was evaluated during 12 h (Figure 5.4). Results show that the viable counts decreased from 9.14 to 8.7, 6.0, 4.36 and 2.81 log CFU ml⁻¹, two hours after the addition of 100, 200, 400 and 800 AU ml⁻¹ of pediocin. The activity of pediocin produced by *P. acidilactici* MM33 is bactericidal against *L. monocytogenes* cells, causing a decrease of more than 99.9% in viable CFU ml⁻¹ when at least 200 AU ml⁻¹ of pediocin were added into the culture medium.

5.7. Discussion

According to Uteng *et al.* (2002), a rapid two-step purification method was used to purify the bacteriocin secreted in the supernatant of *P. acidilactici* MM33. These authors obtained a yield of 85% after the cation-exchange chromatography, but an increase of 300-fold of specific activity. However, in our study we have selected and pooled only the fractions harbouring the highest antimicrobial activity after the cation-exchange chromatography. Although we obtained a lesser yield, the fraction selection increased the pediocin purity by 725 fold. After our second and last purification step, we obtained a purification factor of 5 725 fold. The difference between 40 and 50.7 % of yield obtained after rotavapor and lyophilisation are not significant. This measure was based on activity determined by the well-diffusion assay. This method generates high standard deviation. This modified method could thus be used to obtain pediocin with a higher level of purity in a faster and cheaper way. Primary structure of the pediocin secreted by *P. acidilactici* MM33 is identical to pediocin PA-1/AcH produced by *P. acidilactici* PAC1.0 (Henderson *et al.* 1992). The results presented in the plate overlay assay are also in agreement with an earlier report of the pediocin PA-1/AcH molecular mass (Henderson *et al.* 1992). Moreover, the nucleotide sequence was identical to that of the pediocin PA-1/AcH, confirming that *P. acidilactici* MM33 harbours the pediocin cluster. The pediocin gene homology combined with the loss of bacteriocin activity of *P. acidilactici* MM33A *ped*⁻ mutant, indicates the plasmid linkage of the pediocin producing gene. The production of pediocin PA-1 is associated with the presence of the 9.4-kbp plasmid pSRQ11 in *P. acidilactici* PAC1.0 (Marugg *et al.* 1992). Bacteriocin immunity and production determinants of *P. pentosaceus* Pep 1 were linked and encoded by 9.0 MDa plasmid, pHD1.0 (Osmanagaoglu *et al.* 2000) while pediocin A, produced by *P. pentosaceus* FBB61, is harboured by a 19 515-bp plasmid, pMD136 (Giacomini *et al.* 2000). However, plasmid DNA purified from *P. acidilactici* MM33 migrates approximately at 8 000-bp on agarose gel electrophoresis. Sequencing studies are needed to confirm the homology of the *pap* operon obtained from our strain as compared to other pediococci. Finally, the pediocin produced by human *P. acidilactici* MM33 demonstrated high anti-listerial capacity that was similar to that of other pediocin-like bacteriocins reported so far (Bhunia *et al.* 1988; Ferchichi *et al.* 2001).

This study demonstrated that pediocin-producing strain of *P. acidilactici* could be recovered from the human intestine. This is the first study to demonstrate that pediocin could be produced by a bacterial strain isolated from human stool. Pediococci are not known to be normal inhabitant of the human intestinal microbiota, but they are naturally found in plant sources and have been used for a long time as starter cultures in meat, plants, fish, cereal and dairy fermentations (Ray and Miller 2000). Many pediococci strains are thus in contact with the human intestine via the ingestion of fermented meal. However, neither the influence of *Pediococcus* sp. on the normal microbiota populations is known or its colonization capacity. Only one *in vitro* study has evaluated the capacity of a pediocin-producing strain to modulate the intestinal microbiota (Piva *et al.* 1995). However, the authors reported no alteration of the normal activity of the caecal microbiota.

In this study, we have purified to homogeneity the bacteriocin secreted in the supernatant of *P. acidilactici* MM33. The mass spectrometry experiments revealed that the bacteriocin has a molecular weight of 4 628 Da with an amino acid sequence identical to pediocin PA-1/AcH. Moreover, nucleotides alignment shows 100% homology with the *papA* gene of the pediocin PA-1/AcH. The bacteriocin production gene of *P. acidilactici* MM33 is located on a plasmid of approximately 8 000 bp. However, molecular biology studies are needed to confirm this information but also to detect differences in the genetic organization of the MM33 operon. *P. acidilactici* MM33 pediocin demonstrated a high anti-listerial potential with a MIC of 200 AU ml⁻¹. All together, these informations allowed us to conclude that *P. acidilactici* MM33 is the first pediocin-producing strain isolated from the human intestine. Experiments are currently in development in our laboratory to evaluate the impact of pediocin-producing strain in healthy and infected mice models.

Acknowledgements

The authors wish to thanks NSERC (Natural Science and Engineering Research Council of Canada: partnership Program) and Bio-K+ International Inc. for their financial support. M. Millette is a scholarship recipient of Foundation Armand-Frappier. Health Products and Food Branch of Health Canada (Montréal, QC, Canada) is acknowledged to have provided us *Listeria* strain.

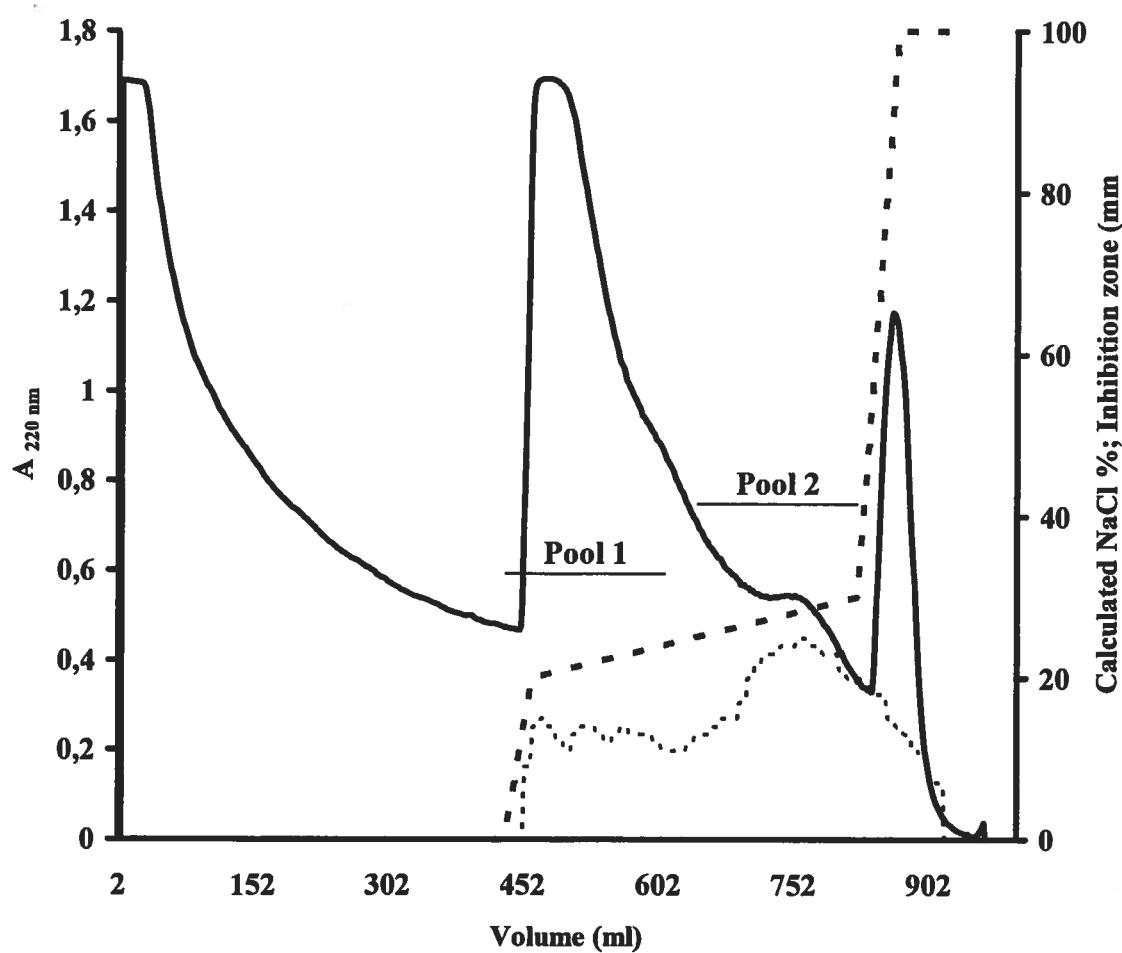


Figure 5.1. Cation-exchange chromatogram of the antimicrobial peptide produced by *Pediococcus acidilactici* MM33. Absorbance at 220 nm (plain line); % NaCl gradient (large dot), and inhibition zone diameter (mm) against *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 (small dot).

Table 5.1. Purification of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33 ($n = 2$)

Purification steps	Volume (ml)	Total activity ($\times 10^5$ AU)	Total protein (mg)	Specific activity (AU mg ⁻¹)	Purification fold	Yield (%)
Culture supernatant	500	12	18 748	64	1.0	100
HiPrep 16/10 SP FF	167	6.08	13.1	46 412	725	50.7
Rotavap	7.8	4.8	1.31	366 412	5 725	40
Freeze-dried fraction	1	6.08	0.26	23 384 62	36 539	50.7

kDa M 1 2 3 4 5 M 1 4 5

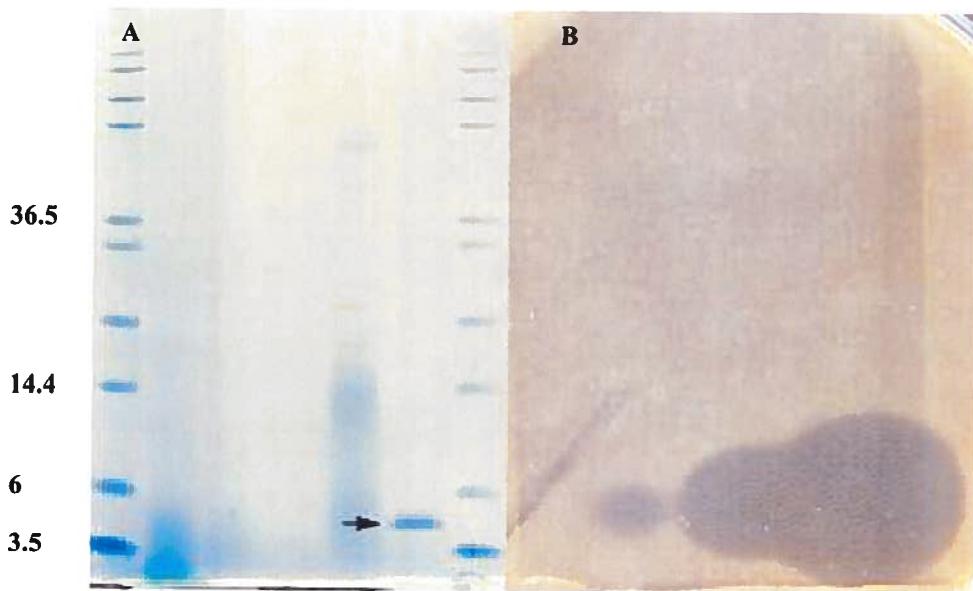


Figure 5.2. (A) SDS-PAGE profile of the fractions recovered along the purification steps of the pediocin secreted by *Pediococcus acidilactici* MM33. The black arrow indicates the band of the purified pediocin. (B) Inhibition zones formed by fractions obtained during pediocin purification and tested against *Lactobacillus sakei* ATCC 15521. Lane M: Molecular weight marker Mark 12 (Invitrogen); lane 1: CFS from *P. acidilactici* MM33 (Fraction I); lane 2: Fraction IIc- pool 1; lane 3: Fraction IIc - pool 2; lane 4: Fraction V- pool 1; lane 5: Fraction V- pool 2.

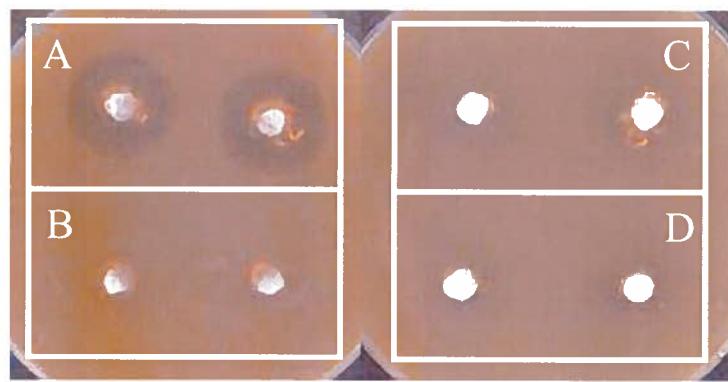


Figure 5.3. Antimicrobial activity of the cell free supernatant produced by *Pediococcus acidilactici* MM33 (box A), *P. acidilactici* MM33A, a *ped*⁻ mutant (box B), *P. acidilactici* MM33 in presence of proteases (box C) and *P. acidilactici* MM33A in presence of proteases (box D). The two wells of each square are duplicate samples.

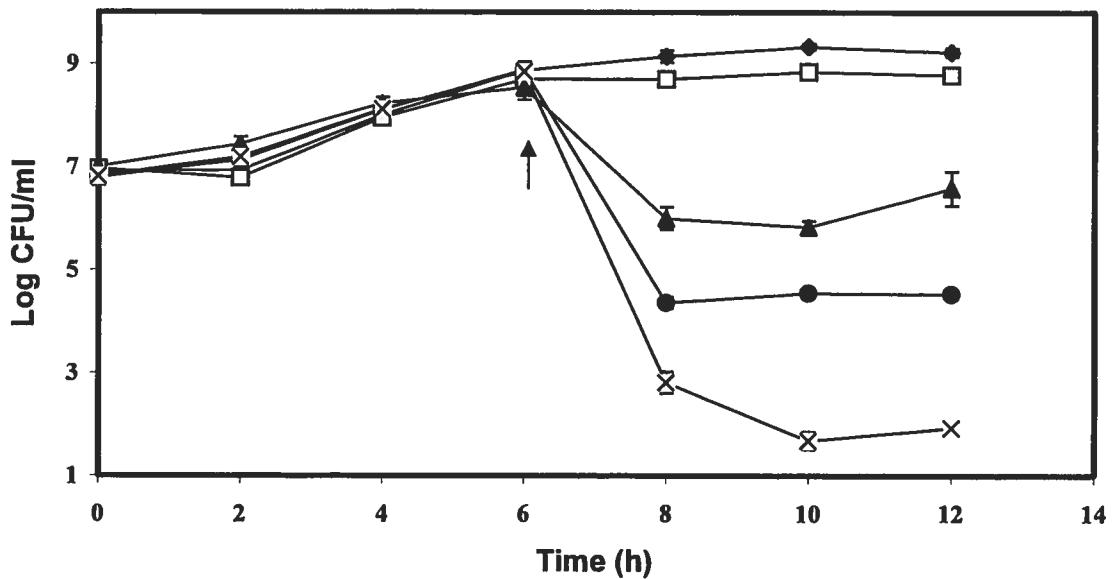


Figure 5.4. *Listeria monocytogenes* HPB 2812 serotype 1/2a growth in tryptic soya broth in presence of: 0 (\square); 100 (\square); 200 (\blacktriangle); 400 (\bullet) and 800 (\times) AU ml^{-1} of purified pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33. The black arrow indicates the moment of the addition of pediocin.

CHAPITRE 6

Publication 5

Capacity of human nisin- and pediocin-producing bacteria to reduce vancomycin-resistant *Enterococcus* intestinal colonization

Running title: Anti-VRE capacity of LAB

Mathieu Millette^a, Claude Dupont^b, François Shareck^b, Gilbert Cornut^a, Denis Archambault^c, Monique Lacroix^a

^a INRS-Institut Armand-Frappier, Research Laboratories in Sciences Applied to Food,
Canadian Irradiation Centre,
531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7 ;

^b INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada,
H7V 1B7 ;

^c Université du Québec à Montréal, Département des Sciences Biologiques, C.P.8888,
Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8.

Ce chapitre a été soumis en décembre 2006 dans *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, mais il a été refusé. À la suite des commentaires de l'éditeur du journal ainsi que des évaluateurs de la thèse, de nombreuses corrections ont été apportées à l'article. Il a été soumis au périodique *Applied and Environmental Microbiology* en août 2007.

6.1. Contributions des auteurs

J'ai imaginé, mis au point, réalisé toutes les expériences et rédigé le manuscrit scientifique. Le Prof. Claude Dupont a participé aux discussions scientifiques et a révisé le manuscrit. Le Prof. François Shareck a participé à l'élaboration des protocoles de biologie moléculaire. Il a participé aux discussions scientifiques et a révisé le manuscrit. Le Prof. Denis Archambault a participé à l'élaboration du protocole experimental, aux discussions scientifiques du projet et a révisé la publication. La Prof. Monique Lacroix était la responsable scientifique et la coordinatrice du projet de recherche. De plus, la Prof. Lacroix a supervisé l'élaboration des protocoles et les discussions scientifiques entourant ce projet. Elle a révisé le manuscrit.

6.2. Résumé en français

Capacité de bactéries productrice de nisine et de pédiocine à réduire la colonisation intestinale d'*Enterococcus* résistant à la vancomycine

Lactococcus lactis subsp. *lactis* MM19 et *Pediococcus acidilactici* MM33 ont été isolés de l'intestin humain dans nos laboratoires. Ils produisent des bactériocines distinctes. Le peptide antimicrobien de *P. acidilactici* MM33 est identique à la pédiocine PA-1/AcH tandis qu'un test de PCR réalisé dans cette étude a démontré que *Lc. lactis* MM19 porte le gène de structure de la nisine Z. Un traitement de 30 min dans une solution gastrique et un autre test cette fois en présence de concentrations croissantes de sels biliaires ont démontré que les deux souches sont tolérantes à l'acidité et résistantes à un stress occasionné par la bile. Le agar spot test a été effectué en utilisant les bactéries vivantes et le test de diffusion radiale dans des puits en utilisant les surnageants de culture neutralisés ont démontré une forte activité antimicrobienne contre une souche clinique d'*Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV). Cette souche d'ERV était sensible à la clindamycine. Des souris colonisées par l'ERV ont été gavées quotidiennement avec *Lc. lactis* MM19, *P. acidilactici* MM33, *P. acidilactici* MM33A (une souche mutante non productrice de pédiocine) ou de la saline durant 16 jours. La densité d'ERV dans le groupe de souris gavées avec *Lc. lactis* MM19 a été réduite de 1.73 et 2.50 log₁₀ ufc/g ($P \leq 0.05$) aux jours 1 et 3 post infection. Dans le groupe de souris traitées avec *P. acidilactici* MM33, une réduction significative de 1.85 log₁₀ ufc/g ($P \leq 0.05$) a été observée au jour 3 post infection. Il n'y avait pas de différence significative ($P > 0.05$) entre le groupe de souris gavées avec la souche *P. acidilactici* MM33A et le témoin saline. C'est la première démonstration que des souches humaines de *Lc. lactis* et *P. acidilactici* productrices de nisine et de pédiocine peuvent réduire la colonisation intestinale par une bactérie résistante aux antibiotiques.

6.3. Abstract

Lactococcus lactis subsp. *lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33 were isolated from human faeces in our laboratory and are known to produce distinct bacteriocins. The antimicrobial peptide of *P. acidilactici* MM33 is identical to pediocin PA-1/AcH while PCR analysis from this study using nisin primers demonstrated that *Lc. lactis* MM19 harbours the nisin Z structural gene. When assayed *in vitro* in a simulated gastric solution for 30 min and in presence of increasing concentrations of bile salts, both lactic acid bacteria (LAB) were acid tolerant and resistant to bile stress. Well-diffusion assay using neutralized cell-free supernatants from *Lc. lactis* MM19 and *P. acidilactici* MM33 demonstrated a strong antimicrobial activity against a clinical isolate of vancomycin-resistant Enterococci (VRE). VRE-colonized mice received intragastric daily administration of *Lc. lactis* MM19, *P. acidilactici* MM33, *P. acidilactici* MM33A (a pediocin mutant that had lost its ability to produce pediocin) or phosphate buffer saline (PBS) for 16 days. The density of VRE in *Lc. lactis* MM19-fed mice group was 1.73 and $2.50 \log_{10}$ CFU/g ($P \leq 0.05$) lower than the PBS group after 1 and 3 days post infection. In the *P. acidilactici* MM33 fed-mice, a significant reduction of $1.85 \log_{10}$ CFU/g ($P \leq 0.05$) was observed 3 days post infection. Undetectable level of VRE was measured after 6 days post-infection for both bacteriocin-producing LAB-treated mice. No significant difference ($P > 0.05$) was observed in mice fed with the pediocin-negative strain as compared to the control group. This is the first demonstration showing that human *Lc. lactis* and *P. acidilactici* nisin- and pediocin-producing strains can reduce intestinal colonization by antibiotic-resistant bacteria.

Keywords: Bacteriocin; *Pediococcus acidilactici*; pediocin; *Lactococcus lactis*; nisin; vancomycin-resistant enterococci

6.4. Introduction

Although vancomycin has been used in human medicine since 1958 (Levine, 2006), the first strain of vancomycin-resistant enterococci (VRE) was isolated in Europe in 1986 (Uttley *et al.*, 1988) and subsequently in 1987 in United States (Sahm *et al.*, 1989). Since then, the proportion of VRE has risen throughout medical centres and makes it a serious clinical problem in many countries (Courvalin, 2006). The dissemination of VRE can lead to clinical isolates resistant to all antibiotics because enterococci have become important nosocomial pathogens and a reservoir for resistance genes. Dissemination of glycopeptides resistance to other pathogenic bacteria, such as *Staphylococcus* and *Streptococcus*, has occurred because there is no barrier to heterospecific expression or gene transfer among Gram-positive cocci (Courvalin, 2006; Rice, 2006). Thus, alternatives to traditional antibiotherapy are needed. To date, few effective therapies are available to prevent and control the intestinal colonization by VRE.

Probiotic bacteria are nutritional supplements of defined and living microorganisms that can alter the intestinal microbiota in order to exert beneficial health effect for the host (Schrenzenmeir et de Vrese, 2001). Many strains of lactic acid bacteria (LAB) are already considered as probiotic (Anukam *et al.*, 2006; Gorbach *et al.*, 1987; Grangette *et al.*, 2005). The mechanisms of action of the antagonistic activity of the LAB against foodborne and clinical pathogens resistant to other antibiotics have been described during *in vitro* studies (Giacometti *et al.*, 2000; Morency *et al.*, 2001; Mota-Meira *et al.*, 2000) or *in vivo* in animal models of infection (Donskey *et al.*, 2001). The antimicrobial molecules involved in the inhibitory activities of LAB are organic acids (Vesterlund *et al.*, 2006), hydrogen peroxide (Ocana *et al.*, 1999) and bacteriocins (Millette *et al.*, 2004; Millette *et al.*, 2007a). Randomized and placebo-controlled human studies have demonstrated that bacteriotherapy using probiotic bacteria can prevent recurrence or reduce the incidence or the symptoms of various gastro-intestinal infections (Sazawal *et al.*, 2006; Van Niel *et al.*, 2002). However, no study demonstrated the implication of bacteriocin-producing bacteria in the prevention of antibiotic-resistant bacteria infections.

Lc. lactis MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33 were originally isolated from human stool and it was the first time that bacteriocin-producing strains of these species were isolated from the human gut (Millette *et al.*, 2007a). The bacteriocin secreted by *P. acidilactici* MM33 was further purified and identified as pediocin PA-1/AcH (Millette *et al.*, 2007b). The bacteriocin synthesized by *Lc. lactis* MM19 is active against a wide spectrum of LAB species but also against vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. It was also inactivated by various proteolytic enzymes such as pronase E, proteinase K, pepsin, trypsin and α -chymotrypsin. However, the antimicrobial activity of the supernatant was resistant to 70°C for up to 15 min and stable at pH ranging from 2 to 8 (Millette *et al.*, 2007a). Thus, it can be hypothesized that the oral administration of bacteriocin-producing strains of LAB decreases the intestinal VRE population in a rodent model.

The first objective was to identify the bacteriocin produced by *Lc. lactis* MM19. This work also evaluated the resistance of both bacteriocin-producing *Lc. lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33 to the gastro-intestinal conditions. Moreover, this study demonstrated the capacity of these bacteriocin-producing strains to modulate intestinal microbiota in healthy mice and their potential to inhibit the growth of vancomycin-resistant enterococci *in vitro* and *in vivo* using a mouse model of VRE intestinal colonization.

6.5. Material and methods

6.5.1. Bacterial strains and growth conditions

Lactococcus lactis subsp. *lactis* MM19 and *Pediococcus acidilactici* MM33 were previously isolated from human stool (Millette *et al.*, 2007a). *P. acidilactici* MM33A, a mutant derived from *P. acidilactici* MM33 that has lost its ability to produce pediocin following a plasmid curing procedure described in detail elsewhere (Millette *et al.*, 2007b), was also used in this study. *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, a well-known probiotic acid and bile tolerant bacteria, was used as a positive control during gastrointestinal experiments. A clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) was provided by the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal microbiology laboratory (CHUM; Montréal, QC, Canada). PCR studies using primers specific to the vancomycin-resistance genes have revealed that this strain is a VanA-type VRE. The bacterial strains were maintained at -80°C in Lactobacilli MRS media (MRS; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for LAB or brain-heart infusion (BHI; Difco) for *E. faecium* containing 10% glycerol (w/v). Before being used, strains were propagated for two consecutive days in MRS or BHI broth overnight at 37°C without agitation. Soft agar media was prepared by the addition of 0.75% (w/v) agar to examine the bacterial antimicrobial capacity using the well-diffusion assay (Millette *et al.*, 2004).

6.5.2. *In vitro* VRE inhibition

An agar well-diffusion assay was performed as described previously (Millette *et al.*, 2007a) to verify the antimicrobial capacity of the neutralized cell-free supernatant (CFS) against a VRE clinical isolate. CFS was obtained by centrifuging the culture at 6000×g for 30 min at 4°C followed by neutralization to pH 6.5 by the addition of 5 M of NaOH. The resulting CFS was then filtered through a 0.2-m filter (Sarstedt, Montréal, QC, Canada). A volume of 30 ml of cooled (45°C) sterile BHI agar, containing 0.75% agar, was inoculated with 10⁷ colony-forming units (CFU)/ml of VRE, poured into a 100 × 15 mm standard Petri dishes and allowed to solidify for 30 min at room temperature. Wells of 6 mm in diameter were cut-out and 80 µl of antimicrobial agent were placed into each well. All plates were then placed at 4°C for 30 min, incubated at 37°C for 24 h

and examined for inhibition zones. Inhibition was scored positive if the width of the clearing zone around the well was \geq 0.5 mm. Antibiotics were also evaluated with this method to ascertain the resistance of the VRE strain. Vancomycin and clindamycin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) were used in concentrations ranging from 0 to 800 μ g/ml. When LAB supernatants were assayed, proteases from *Streptomyces griseus* type XIV (3 mg/ml; Sigma) were added in the soft agar in order to verify whether the inhibition is caused by bacteriocin (Millette *et al.*, 2004).

6.5.3. Polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing of the nisin gene

The PCR amplification was performed as described in Millette *et al.* (2007b). The primers were designed from nisin and pediocin PA-1/AcH structural genes, which were complementary to regions 17 bp upstream (primer 1) and 2 bp downstream (primer 2) of the coding region for nisin (Noonpakdee *et al.*, 2003) and as described in Millette *et al.* (2007b) for pediocin. The restriction sites *Eco*RI and *Kpn*I were added at the 5' end, of primer 1 and primer 2 respectively, for cloning purpose.

Nisin primers:

5' CCGGAATTCTATAAGGAGGCCTCAAAATG 3'

3' CGGGGTACCTACTATCCTTGATTTGGTT 3'

The amplified PCR products were visualized and purified from a 2% agarose gel using a Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and the nucleotide sequences were determined by Génome Québec (Montréal, QC, Canada).

6.5.4. Acid tolerance of LAB

Simulated gastric fluid (SGF) was formulated according to *United States Pharmacopeia* (USP). Briefly, SGF was composed by 3.2 g/l of pepsin (Sigma), 2.0 g/l NaCl and the pH was adjusted to 1.5, 2.0, 2.5 or 3.0 by addition of HCl (5 M). A volume of one ml of overnight MRS broth cultures of LAB were added in 19 ml of SGF for 30 min at 37°C under mild agitation (200 rpm) in a G24 Environmental Incubator Shaker

(New Brunswick Scientific Co. Inc., NJ, USA). After 30 min in gastric solution, 1 ml was collected, mixed in sterile phosphate buffer saline (PBS; pH 7.4) and immediately diluted in sterile peptone water (0.1% p/v) and plated (pour-plate method) on Lactobacilli MRS agar. Plates were incubated under aerobic conditions at 37°C for 48 h. The average number of CFU from triplicate analysis was determined by Darkfield Quebec Colony Counter. A similar process was carried out for bacteria without SGF treatment in order to determine the initial concentration of LAB. *L. rhamnosus* GG was used as a positive control because it is a well-known probiotic bacteria (Succi *et al.*, 2005).

6.5.5. Bile salt tolerance of LAB

The bile salt tolerance of LAB was ascertained in MRS agar containing a commercial preparation of bile salts normally used to inhibit growth of Gram positive bacteria in broth. Bile salts mixture (Sigma B-3426) was added in concentration varying between 0 and 10% with increment of 1% or Bile Salts (LP0055, Oxoid, Nepean, ON, Canada) was tested in concentration from 0 to 24% with increments of 4%. Bile salts containing-MRS agar was then autoclaved for 15 min at 121°C, cooled and finally plated. Overnight MRS broth culture (100 µl of bacteria in the stationary phase of growth) were inoculated on surface of bile salts-containing MRS agar and incubated at 37°C for 72 h under anaerobic conditions. Presence of bacterial lawn indicated a good growth and thus good resistance of bacteria to bile salts while presence of small and isolated colonies indicated a poor resistance to bile salts. Absence of colony indicated that LAB did not tolerate the bile salt concentration assayed. Minimal inhibitory concentration represented the lowest concentration of the bile salts needed to totally inhibit the growth of colonies as judged by visual examination.

6.5.6. Animals

Six- to eight-week-old female C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, St-Constant, QC, Canada) were used for the evaluation of the fecal microbiota modulation experiment while 25-30 g female CF-1 mice (Charles River) were used for the VRE intestinal colonization experiment. Mice were housed between 3 and five per plastic cages and kept under pathogen-free conditions with free access to commercial diet (Lab

diet 5001, Ren's Feed & Supplies, Oakville, ON, Canada) and water. Cages and bedding were changed every two days. This work was approved and supervised by the INRS-Institut Armand-Frappier Animal Care Committee.

6.5.7. Fecal microbial population modulation following ingestion of LAB

Healthy mice received a daily dose of about 10^9 viable bacteria (*Lc. lactis* MM19, *P. acidilactici* MM33 or *P. acidilactici* MM33A) in 100 µl of PBS by intragastric route using a stainless steel feeding needle and a 1-ml syringe. A group of mice received PBS as a negative control. Mice were weighed at days 1, 9, 18 and 27 (day 27 representing 9 days after the end of the feeding treatment) and any sign of physiological or behavioural perturbation were noticed during the experiment. Stool samples were collected before the administration of PBS or LAB (day 1), 9 and 18 days after the beginning of the feeding procedures. Final analysis was done 9 days after the end of the treatment (27th-post feeding day). The stools were collected directly after defecation in a pre-weighted 2-ml sterile plastic tube. These tubes were kept on ice until microbial analysis. Fecal populations of total culturable LAB, *Lactobacillus* spp., anaerobes, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp. and *Enterococcus* spp. were analysed on selective media. This experiment was done twice using a total of ten mice per experimental group.

6.5.8. VRE intestinal colonization experimental model

The experimental model was adapted from Donskey *et al.* (2001). Daily subcutaneous administration of clindamycin (1.4 mg/d) for five days was used to disrupt the intestinal microbiota necessary to induce the VRE infection. Three days after the end of the antimicrobial administration, gastric inoculation of 250 µl of an overnight culture of VRE in BHI broth was used to infect the mice. Approximately 10^8 viable VRE was administered to the mice. Since the beginning of the antibiotic therapy, all groups of LAB-treated mice received once daily 100 µl of 10^{10} CFU/ml of *Lc. lactis* MM19, *P. acidilactici* MM33 or *P. acidilactici* MM33A previously washed twice in sterile PBS. The mice received the LAB until the eighth day after the infection. Bacitracin (Sigma) was administrated orally once daily during three days following the mice infection with VRE as 600 units/d diluted in 100 µl of sterile PBS. This treatment was then discontinued

and replaced by PBS. Stool samples were collected before the antibiotic administration and 1, 3, 6, 8 and 12 days after the VRE infection. Fecal concentrations of total culturable VRE were analyzed using selective media. This experiment was done twice using a total of eight mice per experimental group.

6.5.9. Quantification of stool organisms

The tubes containing fresh stool samples, collected from individual mice, were weighted, so that the weight of the faeces can be deduced. Then, all the faeces were diluted in 1000 µl of sterile saline, homogenized with a pestle, and serially diluted 10-fold in 0.1% peptone water. Finally, 100 µl of each dilution were inoculated on the following media: MRS agar for detection of total lactic acid bacteria (LAB), Rogosa SL agar for selective detection of *Lactobacillus* spp., Reinforced Clostridium Medium (RCM) for quantification of total anaerobic and mesophilic bacteria, Baird-Parker agar (BPA) for selective detection of *Staphylococcus* spp., MacConkey agar for selective enumeration of *Enterobacteriaceae*, Enteroccosel agar for selective quantification of total *Enterococcus* spp. and finally Enteroccosel agar + 20 µg/ml of vancomycin (Sigma) for detection and enumeration of VRE. A volume of 100 µl of the undiluted sample was also plated. MRS, Rogosa and RCM plates were incubated in anaerobic jars at 37°C for 72 h while BPA, MacConkey and both Enteroccosel agar plates were incubated under aerobic conditions at 37°C for 48 h. When negative results were obtained for Enteroccosel agar + 20 µg/ml of vancomycin after 48 h of incubation, the plates were allowed to incubate for another 24 h. Because the weights of fecal specimens varied, the lower limit of the assay for detection of VRE also varied. For statistical purposes, a value in CFU per gram that was based upon the weight of individual specimens was assigned for faeces without microorganisms.

6.5.10. Statistical analysis

Acid resistance and bile salts tolerance experiments were carried out in triplicate ($n = 3$). For each independent replication, three samples were analyzed. Student-t test was done using statistics SPSS program (version 10.0) to determine significant differences of viability between LAB population before and after acid treatment. Finally,

analysis of variance (ANOVA) and a multiple comparison Duncan test were used to compare microbial population in feces of mice fed with various LAB during time and compared to the PBS control group. All significant differences were determined at $P \leq 0.05$.

6.6. Results and discussion

Two primers complementary to sequences occurring proximal to the 3' and 5' ends of the nisin Z and pediocin PA-1 structural genes were used to amplify nisin and pediocin genes from the genomic DNA of *Lc. lactis* MM19 and *P. acidilactici* MM33, respectively. Results demonstrate that a 227-bp fragment was amplified from the genomic DNA of *Lc. lactis* MM19 and a 188-bp fragment was amplified from the genomic DNA of *P. acidilactici* MM33 when pediocin primers were used (data not shown). Both amplified PCR products were sequenced and revealed 100% homology to that of nisin Z for *Lc. lactis* MM19 and pediocin PA-1/AcH for *P. acidilactici* MM33. These results confirm that the gene encoding for nisin of *Lc. lactis* MM19 and pediocin of *P. acidilactici* MM33 are identical to nisA gene (Mulders *et al.*, 1991) and to pedA gene, respectively (Marugg *et al.*, 1992). The hypothesis suggested by Millette *et al.* (2007a) stating that the bacteriocin was different from nisin based on antimicrobial spectrum and on the pH and temperature stability of the supernatant so the previous hypothesis was not confirmed by this study. It could be explained because crude neutralized supernatant was used and it is known that nisin in culture medium was not as heat stable as pure nisin. Moreover, the nisin concentration to inhibit *Listeria monocytogenes* should be higher than the quantity produced in the supernatant of *Lc. lactis* MM19.

Results in Fig. 6.1 demonstrated that the anti-VRE capacity of *Lc. lactis* MM19 and *P. acidilactici* MM33 is caused by nisin and pediocin, respectively. A large inhibition zone of the bacterial growth is related to a high potential of the neutralized cell-free supernatant of LAB cultures to inhibit the growth of the pathogen evaluated. In order to ensure that the inhibition of VRE was caused by bacteriocin, proteases type XIV were added in agar. Following this treatment, no inhibition zone has been observed (Fig. 6.1). These results are important since little information exists about the capacity of bacteriocin-producing bacteria or their purified metabolites to control infections caused by multi-drug resistant Gram-positive bacteria. Severina *et al.* (1998) demonstrated the capacity of pure nisin to decrease the viability of 56 multidrug-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*, 33 *Staphylococcus aureus* and 29 vancomycin-resistant *E.*

faecium and *E. faecalis* isolates. However, stable nisin-resistant mutants were isolated after a few passages in nisin solution. Giacometti *et al.* (2000) studied the addition of nisin and various antibiotics against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). They showed that nisin activity was enhanced in presence of other antibiotics and that no resistance was observed. Brumfitt *et al.* (2002) observed a synergy between nisin and ramoplanin against MRSA and VRE. Finally, Nascimento *et al.* (2006) tested 4 bacteriocins produced by *S. epidermidis* (Pep5, epidermin, epilancin K7 and epicidin 280) and 3 produced by *S. aureus* (aureocins A70, A53 and 215FN) against many MRSA strains or coagulase-negative staphylococci. They concluded that bacteriocins may represent alternative agents to control important nosocomial pathogens. However, to date, no study examined the bacteriocin-producing LAB alone or in combination with other antibiotics to eliminate MRSA or VRE.

Antibiotic resistance of the VanA type-VRE strain was also evaluated and the results showed that the clinical isolate was resistant for all vancomycin concentrations evaluated between 0 to 800 µg/ml while, surprisingly, the VRE strain was very sensitive to clindamycin at a concentration of 2 µg/ml (data not shown). To our knowledge, it is the first report of a VanA-type VRE isolate sensitive to clindamycin. In fact, every other VRE strains reported in the literature demonstrated an intrinsic clindamycin resistance (Murray *et al.*, 1997; Cetinkaya *et al.*, 2000). However, more research is needed in order to elucidate this particularity.

The growth of LAB in MRS containing increasing concentration of bile salts was evaluated in order to verify the bile salt tolerance of both LAB and compare to a well-recognized probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG. The results showed that bile salts mixture (Sigma) tolerance threshold was 4% for all bacteria, while the pediococci grew in MRS containing 20% (w/v) of bile salts (Oxoid) as compared to 16% for *L. rhamnosus* GG and to 12 % for *Lc. lactis* MM19 (Table 6.1). Moreover, results presented in Table 6.2 show that *P. acidilactici* MM33 and *L. rhamnosus* GG survived under an acidic environment during 30 min. No significant difference ($P > 0.05$) was observed between initial microbial population at 0 and 30 min under a pH ≥ 2.5 for *L.*

rhamnosus GG. However, a significant reduction of viability was observed at pH 2 and no viability was detected after 30 min at pH 1.5 for both bacteria. *P. acidilactici* MM33 survived well after an acidic treatment for 30 min at pH 2.5 but a one log decrease was observed as compared to initial enumeration ($P \leq 0.05$). *Lc. lactis* MM19 did not tolerate as well the gastric simulation as seen by the high mortality rates at pH ≤ 2.5 . However, complete survival was observed at pH 3. LAB have been used since a long period time in food fermentation intended for human consumption. Many potential probiotics do not resist, survive or temporarily colonize the intestine. LAB must survive the acidic environment of the stomach in order to reach the gut and modulate the microbiota. Results obtained in this study demonstrated that both LAB completely resists to a simulated gastric fluid at pH ≥ 3 while *P. acidilactici* can tolerate a pH of 2.5. Bile salt tolerance is considered one of the most important attribute required by LAB to survive in the duodenum and the upper small intestine (Saarela *et al.*, 2000). Our study showed that all LAB survived to a bile salt stress but also grew on MRS agar containing 4% of a standardized bile salts mixture (Sigma) or higher concentrations of Bile Salts from Oxoid. These results could be explained by the higher concentration of cholic acid retrieved in the Sigma preparation (not less than 45%). Succi *et al.* (2005) observed a 7 \log_{10} CFU/ml reduction when *L. rhamnosus* GG was placed in acidified MRS (pH 2) after an incubation of 2 h at 37°C while a reduction of approximately 2.5 \log_{10} CFU/ml was measured at pH 3. Subsequently, they transfer the bacterial culture in MRS at pH 7 but containing 2 % of bile salts (Oxoid LP0055) for 5 h at 37°C. *L. rhamnosus* GG showed no loss of viability at the end of the treatment which is in agreement with results obtained in our study.

The influence of bacteriocin-producing LAB ingestion on the fecal microbial populations of healthy C57Bl/6 is shown in Fig. 6.2 to 6.4. The LAB counts in faeces of mice fed with *Lc. lactis* MM19 is higher ($P \leq 0.05$) after 9 and 18 days of feeding. However, after feeding interruption, the level of LAB was similar to its initial count. Ingestion of *P. acidilactici* MM33A, the non pediocin-producing mutant, led to an increase ($P \leq 0.05$) of LAB after 18 days while the pediocin-producing strain did not influence quantitatively the LAB population (Fig. 6.2). *P. acidilactici* MM33 is the only strain that have reduced

significantly the Enterobacteriaceae population in mice faeces after 18 days of feeding (Fig. 6.3). It could be hypothesized that this strain modified the microbial balance in the gut, leading to the reduction of the *Enterobacteriaceae*. Results shown in Fig. 6.4 indicate that MM19 feeding increased significantly ($P \leq 0.05$) the culturable anaerobic population after 9 and 18 days. This increase was maintained after feeding ended. The non pediocin-producing strain increased the anaerobes as long as the feeding last but after feeding ended, the level of anaerobes was similar to its initial count. No reduction was observed for *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp. and *Enterococcus* spp. populations with either bacteriocin-producing bacterium assayed. This study demonstrated that an ingestion of bacteriocin-producing bacteria is well tolerated by C57Bl/6 mice over the course of a three week-feeding trial and can alter quantitatively the balance of colonic bacterial populations. This effect is strain dependent. The nisin-producing strain increased, at least transiently, the total culturable LAB content and the total anaerobes in the faeces of the mice while the pediocin-producing strain did not influence quantitatively these populations. It should be hypothesized that a reorganization of the intestinal microbiota was induced by the bacteria or the nisin production. The administered strains could replace or stimulate the growth of the indigenous *Lactobacillus* strains leading to a variation of the bacterial species but not to a quantitative modification as observed for *P. acidilactici* MM33. Manninen *et al.* (2006) observed that indigenous *L. acidophilus* population in the small intestine of dogs was stimulated following the ingestion of other non-bacteriocin producing species of the *Lactobacillus* genera. However, Bernbom *et al.* (2006) demonstrated that a 2-days ingestion of a nisin-producing and also a non-nisin producing *Lc. lactis* strains increased only the *Bifidobacterium* population in faeces of rat harbouring a human microbiota during the first 8 days but decreased the number of *Enterococcus/Streptococcus* in duodenum, ileum, caecum, and colon samples. Our experiment thus demonstrated that a longer period of ingestion of nisin-producing bacteria could alter other microbial populations in the mice faeces. Culture independent techniques such as DGGE or FISH or real time-PCR should be used to monitor qualitatively and quantitatively the variations in fecal microbial populations during bacteriocin-producing bacteria feeding experiments (Marzotto *et al.*, 2006; Van Houte *et al.*, 2006).

Results presented in Fig. 6.5 show that the VRE densities one day post infection was lower by $1.73 \log_{10}$ CFU/g ($P \leq 0.05$) for the group of *Lc. lactis* MM19-fed mice as compared to the PBS-fed group. Moreover, in comparison with PBS controls, *Lc. lactis* MM19 and *P. acidilactici* MM33-treated mice have significantly lower VRE densities 3 days after the infection ($P \leq 0.05$). The VRE population was reduced by 2.50 and $1.85 \log_{10}$ CFU/g, respectively. Six days after the infection, undetectable level of VRE was measured in *Lc. lactis* MM19 and *P. acidilactici* MM33 treated mice. VRE densities in mice faeces of the group fed with the non pediocin-producing strain were similar to the level measured for controls for the duration of the experiment. Mice treated with bacitracin during three days after the infection have an undetectable level of VRE at day 3. However, the VRE population reappeared when the bacitracin treatment was discontinued. Similar results were observed by Donskey *et al.* (2001) where an increase in VRE densities was reported three days after the end of the bacitracin treatment. The authors hypothesized that the inhibition of the normal microbiota by bacitracin facilitates the recurrence of VRE infection after the treatment ended. It is interesting to note that when the oral administration of the mice with LAB was discontinued (8 days after the infection), no recurrence of the VRE was observed 4 days later. It will be interesting to evaluate the influence of the duration of the bacterial therapy on the clearance of the VRE infection. Although the bacteriocin-producing strains are able to reduce the densities of VRE population following an infection induced by clindamycin, these strains have no effect on the total *Enterococcus* spp. populations enumerated in the mice faeces. One explanation could be that other bacterial species can grow on enterococcosel agar, such as various *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Pediococcus* species evaluated in our laboratory (results not shown). This is the rationale for the utilization of culture-independent techniques to enumerate variations of the intestinal microbiota.

To our knowledge, this is the first clear evidence that bacteriocin-producing strains of LAB reduce the intestinal colonization by VRE in an animal model. The capacity of various probiotics to prevent gastrointestinal infection by *Escherichia coli* O157:H7 (Asahara *et al.*, 2004) or *Listeria monocytogenes* (De Waard *et al.*, 2002) have been

previously demonstrated. However, references to bacteriocin-producing capacity were not demonstrated. Carina Audisio *et al.* (2000) evaluated the preventive and therapeutic effect of the bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* J96 against *Salmonella pullorum* infecting broiler chickens. The chickens fed with LAB before oral challenge with the pathogen survived while chickens treated after died within 4 days. Lauková *et al.* (Lauková *et al.*, 2003) demonstrated the capacity of an enterocin A-producing strain of *E. faecium* to reduce during two days the intestinal colonization of gnotobiotic quails by *S. dusseldorf*. However, in these two studies a non-bacteriocinogenic strain was not used to compare the impact of the bacteriocin gene on the prevention of the infection.

This is the first study reporting the nisin and pediocin-producing strains capability to modulate the intestinal microbiota of healthy mice and to reduce the intestinal colonization of VRE-infected mice. These strains were almost as resistant to acid and bile as *L. rhamnosus* GG, a well-recognized probiotic bacterium. Both LAB supernatants inhibited the growth of a clinical isolate of VRE in vitro. Although additional studies are needed to determine if our results are reproducible to VRE-infected patients, *Lc. lactis* MM19 and *P. acidilactici* MM33 seem good candidates to eradicate or to control intestinal infections caused by multidrug-resistant bacterial pathogens

Acknowledgements

The authors wish to thanks NSERC (Natural Science and Engineering Research Council of Canada: partnership Program) and Bio-K+ International Inc. for their financial support. M. Millette is a scholarship recipient of Foundation Armand-Frappier. The Centre Hospitalier de l'Université de Montréal microbiology laboratory is acknowledged to have provided us the VRE strain.

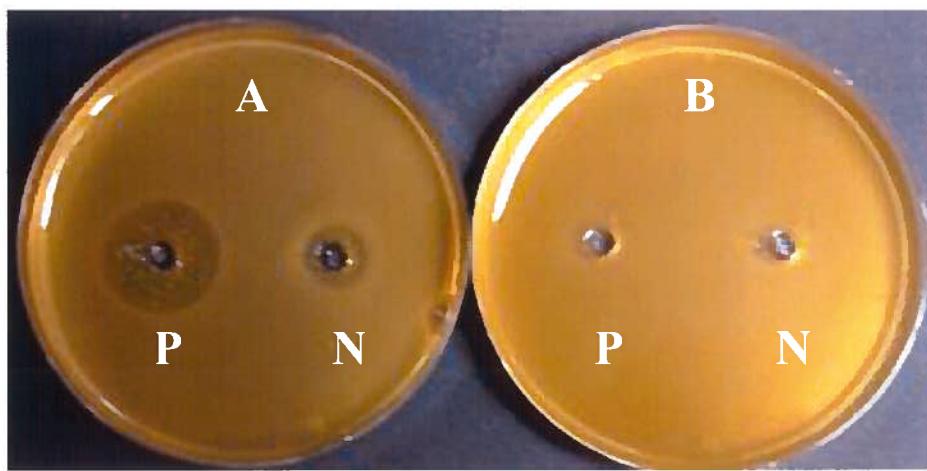


Figure 6.1. Well diffusion assay of neutralized cell-free supernatant from *Lc. lactis* MM19 (N) or from *P. acidilactici* MM33 (P) against a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in BHI agar without proteases (A) or in the presence of 15 U/ml of proteases type XIV from *Streptomyces griseus* (B).

Table 6.1. Maximal concentration tolerated (%) of bile salt by LAB.

Microorganisms	% Bile salts (Oxoid L55)	% Bile salts mixture (Sigma B-3426)
<i>Lc. lactis</i> MM19	12	4
<i>P. acidilactici</i> MM33	20	4
<i>L. rhamnosus</i> GG	16	4

Table 6.2. Survival of LAB after an incubation of 30 min at 37°C in simulated gastric fluid (pH 1.5 to 3.0).

Microorganisms	Time (min)	pH	Log CFU survivor
<i>Lc. lactis</i> MM19	0	-	8.91 ± 0.21 ^{B*}
	30	1.5	< 1
	30	2.0	4.47 ± 0.46 ^A
	30	2.5	4.69 ± 0.71 ^A
<i>P. acidilactici</i> MM33	0	-	9.62 ± 0.10 ^C
	30	1.5	< 1
	30	2.0	4.7 ± 0.33 ^A
	30	2.5	8.62 ± 0.26 ^B
<i>L. rhamnosus</i> GG	0	-	9.10 ± 0.13 ^B
	30	1.5	< 1
	30	2.0	5.33 ± 0.62 ^A
	30	2.5	9.08 ± 0.14 ^B
	30	3.0	9.01 ± 0.13 ^B

*: Different letters indicate a significant variation ($P \leq 0.05$) as compared to the control (0 min) for each LAB assayed.

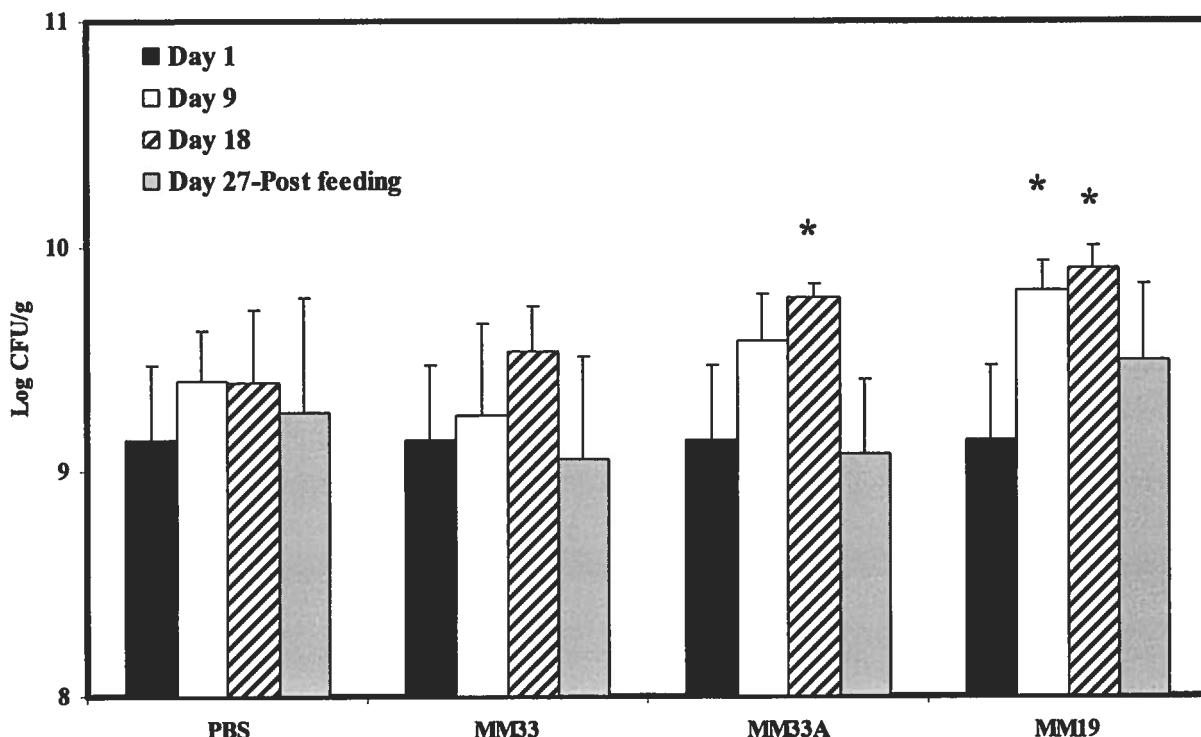


Figure 6.2. Total culturable lactic acid bacteria concentration in feces of C57Bl/6 mice following a daily ingestion of *Lc. lactis* MM19, *P. acidilactici* MM33 or *P. acidilactici* MM33A. An asterisk indicates a significant difference ($P \leq 0.05$) as compared to the bacterial concentration of the Day 1 and the same day of the PBS control. Error bars represent the standard deviation.

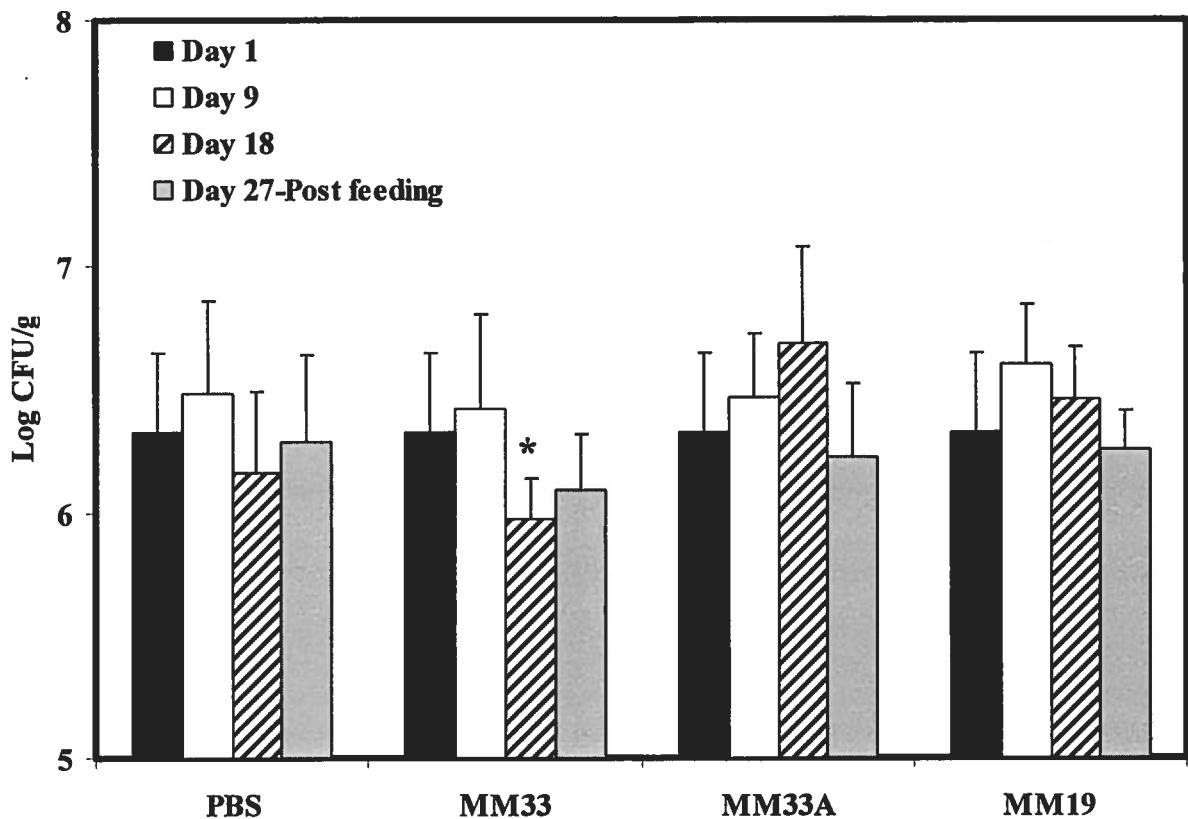


Figure 6.3. Total culturable *Enterobacteriaceae* concentration in feces of C57Bl/6 mice following a daily ingestion of *Lc. lactis* MM19, *P. acidilactici* MM33 or *P. acidilactici* MM33A. An asterisk indicates a significant difference ($P \leq 0.05$) as compared to the bacterial concentration during the Day 1 of the experimental group and the same day of the PBS control. Error bars represent the standard deviation.

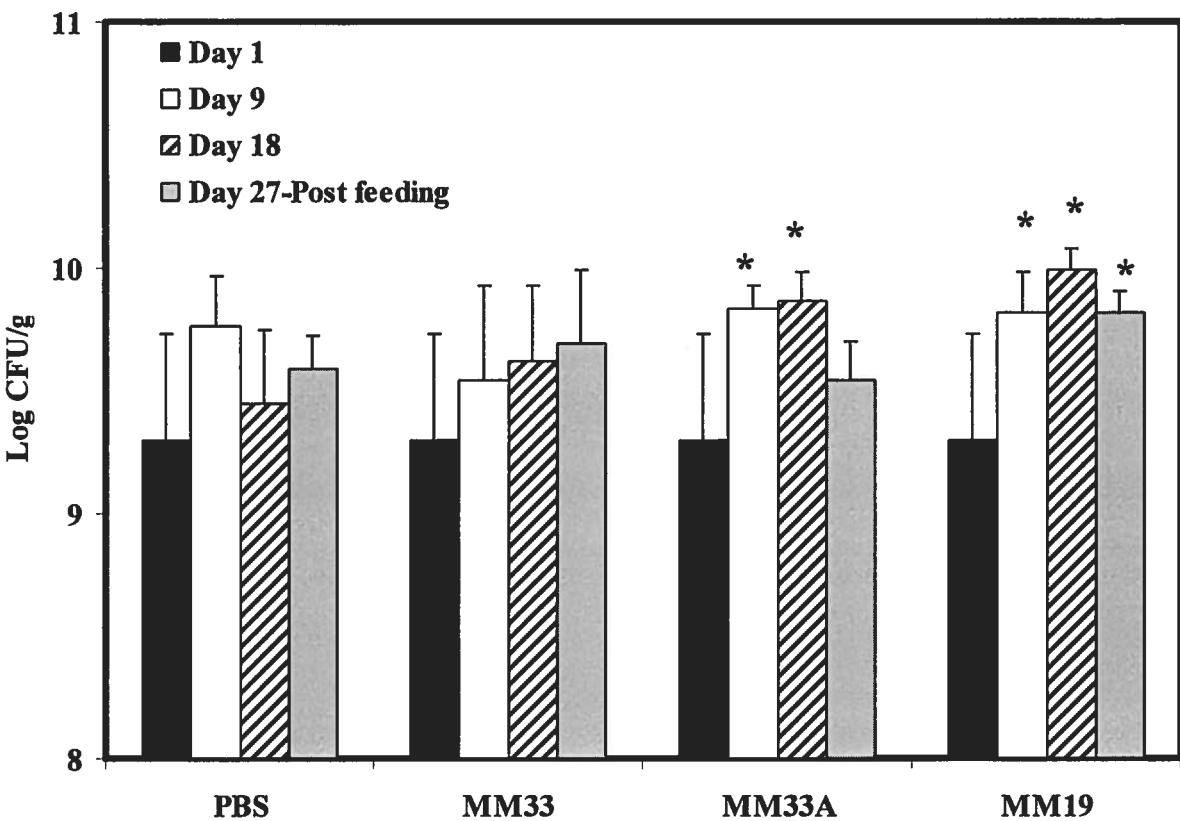


Figure 6.4. Total culturable mesophilic anaerobes concentration in feces of C57Bl/6 mice following a daily ingestion of *Lc. lactis* MM19, *P. acidilactici* MM33 or *P. acidilactici* MM33A. An asterisk indicates a significant difference ($P \leq 0.05$) as compared to the bacterial concentration during the Day 1 of the experimental group and the same day of the PBS control. Error bars represent the standard deviation.

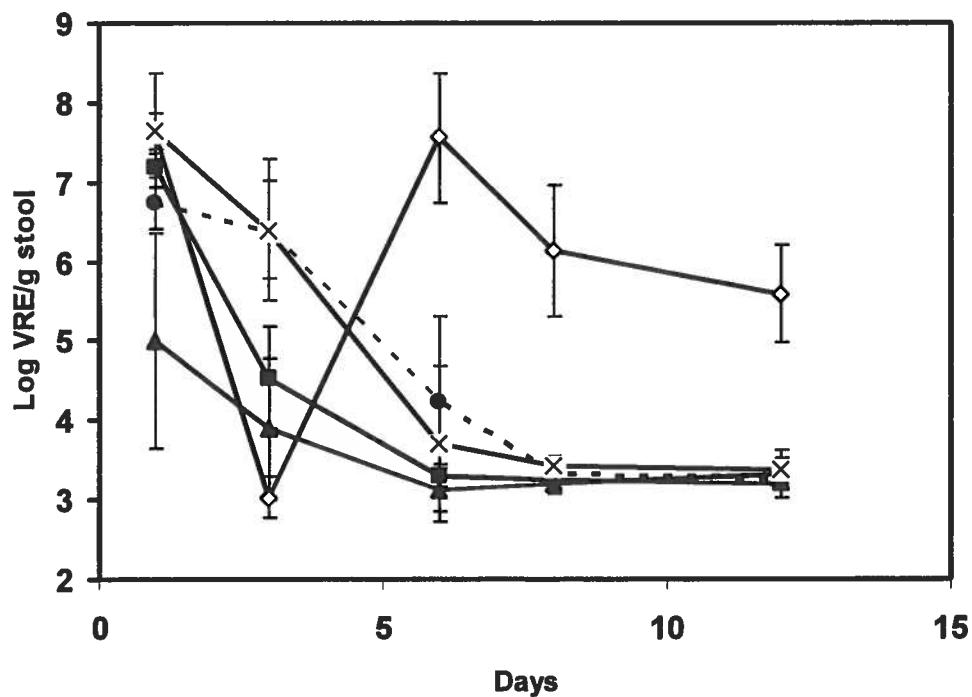


Figure 6.5. Changes in density of total vancomycin-resistant *Enterococcus* in VRE colonized CF-1 mice treated with PBS (---●---), bacitracin (◊), *Lc. lactis* MM19 (▲), *P. acidilactici* MM33 (■) and *P. acidilactici* MM33A (×). The intragastric VRE infection was realized on day 0. The oral administration of bacitracin began the day after the infection and last for three days until it was discontinued and replaced by PBS feeding. The oral administration of LAB and PBS began 7 days before the infection and was discontinued the eighth day after the infection. Error bars represent the standard deviation.

CHAPITRE 7

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Cette étude avait pour objectif global de démontrer l'influence de bactéries lactiques humaines productrices de bactériocines sur le microbiote intestinal afin de développer une nouvelle bactérothérapie qui pourrait prévenir la colonisation intestinale par une bactérie pathogène résistante aux antibiotiques, en l'occurrence l'ERV. Le premier objectif du projet consistait à trouver des BAL humaines possédant une forte activité antimicrobienne tel que démontrée *in vitro* et cette aptitude étant induite par la synthèse et la sécrétion de bactériocines. Au début du projet de doctorat, deux nouveaux probiotiques étaient envisagés. Le premier probiotique était un mélange de deux souches de BAL, *L. acidophilus* et *L. casei*, qui forment un ferment de départ (CL1285) utilisé dans la production d'un lait fermenté et commercialisé par la compagnie Bio-K+ international Inc. Ce lait fermenté lorsqu'ingéré par des individus sous antibiothérapie réduit l'incidence des diarrhées associées à la prise d'antibiotiques (DAA), mais surtout diminue drastiquement l'incidence des diarrhées DAA à *C. difficile*. Le second probiotique était une souche de *L. rhamnosus* RW-9595M, une souche mutante qui produit une très grande concentration d'exopolysaccharides (EPS) et qui a été isolée dans les laboratoires du Dr. Denis Roy au Centre de Recherche et de Développement des Aliments (CRDA) de St-Hyacinthe. Les deux souches provenaient de l'intestin humain et il ne restait qu'à vérifier leur capacité à produire des bactériocines. Les tests *agar spot test* et de diffusion radiale dans des puits ont été effectués en présence ou non de protéases contre une grande diversité de souches microbiennes Gram + et Gram -. Ces deux probiotiques ont démontré un fort potentiel antimicrobien suite au agar spot test principalement contre les bactéries Gram + autant en présence qu'en absence de protéases. Par la suite, les surnageants de culture des deux probiotiques ont été récoltés, filtrés et neutralisés afin d'éliminer l'activité antimicrobienne des acides organiques. Ils furent ensuite analysés avec le test de diffusion radiale dans des puits. Aucune activité antimicrobienne n'a été détectée avec ce test, même lorsque les surnageants de culture étaient concentrés jusqu'à 20 fois. Le probiotique CL1285 ayant démontré une forte activité antimicrobienne contre les pathogènes à l'étude lors de l'agar spot test, il a aussi été utilisé avec un autre test d'inhibition, cette fois en milieu liquide contre *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7, *Salm. Typhimurium*, *List. innocua*, *Ent. faecalis*, *Ent. faecium* et *S. aureus*. Ces résultats sont présentés dans le chapitre 2. Il a été démontré que le CL1285

élimine complètement les bactéries pathogènes (sauf les souches d'entérocoques) en 48 h lorsque le pH de la fermentation n'est pas contrôlé. Cependant, il est intéressant de noter qu'après 24 h de co-culture en présence du CL1285, la population des 5 pathogènes sensibles n'était diminuée que de 1 à 2 log UFC/ml en comparaison avec la mono-culture des bactéries pathogènes. Entre 24 et 48 h d'incubation, une diminution drastique variant entre 5 et 6 log UFC/ml des pathogènes est survenue. L'acidification du milieu de culture est évidemment en majeure partie responsable de cette inhibition totale, mais le phénomène décrit précédemment semblait indiquer la présence d'un autre mécanisme d'action. Afin d'éliminer l'influence de l'abaissement du pH du lait, une deuxième série de fermentations a été effectuée en maintenant le pH à 6,5. Ces résultats sont présentés dans le chapitre 3. Il a été possible de démontrer que, malgré le contrôle du pH, les BAL présentaient une activité antimicrobienne contre certaines souches sensibles. La présence des BAL a ainsi causé une augmentation du temps de génération de toutes les bactéries Gram + étudiées, principalement *S. aureus* et *Ent. faecium*. *E. coli* O157:H7 et *Salm. Typhimurium* ne semblaient pas affectées par les BAL. Par la suite, plusieurs méthodes ont été utilisées sans succès pour tenter de mettre en évidence la contribution de bactériocines dans l'activité antimicrobienne du ferment CL1285. Afin de vérifier et de comprendre les mécanismes de l'activité antimicrobienne du lait fermenté par *L. acidophilus* et *L. casei*, des pots du produit fini ont été centrifugés et la fraction soluble du lait fermenté a été récupérée. Les résultats de l'activité antimicrobienne de cette fraction soluble sont présentés dans le chapitre 3 et montrent que l'acidification du lait fermenté n'est pas le seul mécanisme impliqué. En effet, lorsque le milieu de culture des pathogènes était acidifié à pH 4,5 avec un acide inorganique, une légère inhibition a été observée. L'inhibition était beaucoup plus importante lorsque la fraction soluble a été testée dans les mêmes conditions. Malgré la neutralisation et l'irradiation de cette fraction, une inhibition de la croissance des pathogènes est toujours observée, ce qui indique que plusieurs composés de nature diverse seraient responsables de l'effet antimicrobien du lait fermenté. La mise en évidence et le développement d'une méthode efficace de purification des ces molécules est toujours en cours au laboratoire.

Il fallait répondre à l'hypothèse selon laquelle les BAL humaines productrices de bactériocines influencent la composition du microbiote intestinal. Pour ce faire, 111 colonies bactériennes, provenant des fèces d'un humain adulte en bonne santé physique, ont été isolées sur gélose MRS en condition anaérobique. La capacité antimicrobienne de ces isolats est présentée dans le chapitre 4. De ces 111 colonies, les colonies MM19 et MM33 possédaient une forte activité antimicrobienne contre plusieurs bactéries indicatrices testées. Les spectres d'inhibition des surnageants neutralisés obtenus à partir des 2 souches n'étaient pas similaires. Le surnageant de culture de la colonie MM33 possédait une forte activité antimicrobienne contre les 8 souches de *List. monocytogenes* testées. Sur cette base, les deux bactéries ont été isolées et étudiées. La coloration de Gram a permis de définir que les deux souches étaient des cocci Gram +. D'autres expériences ont montré que les deux souches étaient catalase et oxydase –, anaérobiose facultatives et que MM19 avait la capacité de croître à 5°C et MM33 à 50°C. Les bactéries ont été identifiées par le séquençage de l'ADN qui code pour l'ARN 16S. La colonie MM19 possède 98% d'homologie avec *Lactococcus lactis* sous-espèce *lactis* tandis que la souche MM33 possède 97% d'homologie avec *Pediococcus acidilactici*. Par la suite, l'activité antimicrobienne des deux surnageants a été caractérisée. D'une part, cette activité était sensible à l'action protéolytique de diverses protéases et relativement stable aux traitements thermiques. D'autre part, l'activité antibactérienne de *Lc. lactis* MM19 s'est révélée très sensible à l'irradiation gamma tandis que celle de *P. acidilactici* MM33 n'était réduite que de 50% après un traitement d'irradiation allant jusqu'à 12 kGy. Cette caractéristique pourrait s'avérer très utile pour retarder plus efficacement la détérioration des aliments par traitements combinés impliquant l'irradiation et le composé antimicrobien sécrété par *P. acidilactici* MM33. Le même principe pourrait s'appliquer pour prévenir les contaminations des produits alimentaires par des pathogènes bactériens tel *List. monocytogenes*. Il est important de noter que l'activité antibactérienne dans les surnageants de culture était plus stable à pH acide et inactivée à pH fortement alcalin. Finalement, les surnageants ont subi une migration sur gel de polyacrylamide et les gels obtenus ont été recouverts de gélose contenant une bactérie sensible. Des zones d'inhibition ont été identifiées entre 3,5 et 6,0 kDa. L'ensemble des résultats obtenus confirme ainsi que les molécules antimicrobiennes présentes dans les surnageants de

culture des deux bactéries sont des bactériocines. C'est donc la première démonstration que des souches de *Lc. lactis* et de *P. acidilactici* productrices de bactériocines ont pu être isolées de l'intestin humain. En particulier, cette étude a mis en évidence un phénomène intéressant : lors de la cinétique de production de l'activité antimicrobienne par *Lc. lactis* MM19, la mesure de la population était effectuée en parallèle par des dénombrements sur gélose MRS. La culture a été réalisée dans 1000 ml de MRS à 35°C avec une agitation de 200 rpm. La concentration bactérienne était en croissance normale durant les 12 premières heures, devenant non-détectable après 24, 36 et 48 h d'incubation dans ces mêmes conditions. Il est important de noter que cette étude a été répétée à 3 reprises par des expérimentateurs différents. Il semblerait que la population de *Lc. lactis* MM19, lorsque cultivée dans ces conditions, subit une autolyse, un phénomène relativement peu connu qui serait causé en réponse à un stress. Dans notre cas, l'accumulation des métabolites antimicrobiens dans le milieu, l'acidification ou l'agitation à long terme pourraient être responsables de ce phénomène. La souche *Lc. lactis* MM19 possède donc au moins deux phénotypes intéressants qui pourraient être utiles dans l'industrie fromagère: la production de bactériocines et une capacité autolytique. En effet, Sallami *et al.* (2004) ont démontré que l'ajout d'une souche autolytique de *L. bulgaricus* UL12 avec une bactérie productrice de bactériocines permettait d'améliorer la texture du fromage grâce à l'augmentation de l'activité protéolytique.

Le chapitre 5 présente les conclusions obtenues lors des étapes de purification de la bactériocine synthétisée par *P. acidilactici* MM33. La bactériocine possède une masse de 4 628 Da et est composée de 44 acides aminés qui ont 100% d'homologie avec la pédiocine PA-1/AcH. La séquence nucléotidique codant pour la pédiocine de *P. acidilactici* MM33 est située sur un plasmide et est identique au gène de la pédiocine PA-1/AcH. Dans cette étude, il a été possible de produire une souche mutante, *P. acidilactici* MM33A, ayant perdu la capacité de produire la pédiocine. La bactériocine sécrétée par *P. acidilactici* MM33 possède des caractéristiques identiques à la pédiocine PA-1/AcH qui est sécrétée par de nombreuses souches de pédiocoques. Cependant, c'est la première

étude démontrant l'isolation d'un *P. acidilactici* producteur de pédiocine à partir de l'intestin humain. En effet, toutes les autres bactéries provenaient de divers aliments fermentés. Les pédiocoques ne sont pas considérés comme des membres indigènes du microbiote intestinal humain. Ils sont plutôt isolés de végétaux et ont longtemps été utilisés comme ferment de départ dans la fermentation de viandes, végétaux, poissons, céréales et produits laitiers. Après la consommation de ces produits fermentés, plusieurs souches de *Pediococcus* spp. doivent donc être en contact avec la muqueuse intestinale. Cependant, aucune étude n'a démontré ni l'influence de *Pediococcus* spp. sur les populations microbiennes intestinales, ni sa capacité de colonisation de la muqueuse intestinale. Une seule étude *in vitro* en milieu fermé a évalué la capacité d'une souche productrice de pédiocine à moduler une microflore dite intestinale. Les auteurs n'ont rapporté aucune altération de l'activité normale (Piva *et al.*, 1995). Puisque *P. acidilactici* MM33 a été isolée de l'intestin humain, il est permis de croire que cette souche en particulier a une plus forte capacité de résistance, d'adaptation et d'intégration dans le tractus gastro-intestinal. Elle est donc un outil très intéressant qui permettra de démontrer l'influence probable d'une bactérie productrice de bactériocines sur le microbiote intestinal indigène ou pathogène.

L'influence de BAL humaines productrices de bactériocines sur le microbiote intestinal a ensuite été évaluée et les résultats sont présentés dans le chapitre 6. La publication présentant ces travaux a permis de démontrer que *Lc. lactis* MM19 et *P. acidilactici* MM33 résistent complètement à une solution gastrique à pH ≥ 2.5. Les deux souches ont la capacité de croître sur une gélose MRS contenant jusqu'à 4% de sels biliaires. Il a aussi été démontré que *Lc. lactis* MM19 possède le gène de production de la nisin Z. Par la suite, des souris C57Bl/6 saines ont été gavées quotidiennement pendant 18 jours avec de la saline, *Lc. lactis* MM19, *P. acidilactici* MM33 ou *P. acidilactici* MM33A (chapitre 6). De plus, 3 autres groupes de souris ont été gavés avec les bactéries *L. acidophilus/L. casei*, *L. rhamnosus* ATCC 9595 et *L. rhamnosus* RW-9595M (chapitre 1). Le suivi microbiologique sur géloses sélectives de diverses populations a démontré que l'ingestion de *Lc. lactis* MM19 a augmenté significativement la concentration de

BAL totales et les bactéries anaérobiques totales. Le gavage de souris avec la souche de *P. acidilactici* bactériocinogène a permis de réduire significativement la population d'*Enterobacteriaceae* sans modifier quantitativement les populations de BAL et de bactéries anaérobiques totales. Au contraire, la souche non-bactériocinogène a augmenté les concentrations des BAL et des bactéries anérobiques totales de façon temporaire sans modifier les autres groupes bactériens à l'étude. Ces résultats confirment donc que la consommation régulière de BAL modulent spécifiquement le microbiote intestinal. En fait, chaque souche de BAL semble avoir une influence particulière sur les bactéries indigènes à l'intestin puisque les BAL présentées dans le chapitre 1 sont aussi capables de moduler cet écosystème. Plus particulièrement, la consommation de CL1285 a réduit les concentrations fécales de staphylocoques tout en augmentant les BAL totales. Puisque de nombreuses espèces de bactéries intestinales ne peuvent pas croître sur des géloses et que la sélectivité absolue d'une gélose n'est jamais garantie, l'utilisation des techniques de biologie moléculaire basées sur l'ADN bactérien sera déterminante pour évaluer plus en détail la modulation du microbiote résultant de l'ingestion de BAL.

La dernière étude présentée dans le chapitre 6 a également permis de montrer la capacité des 2 souches de BAL à réduire la colonisation intestinale par une souche d'ERV possédant le gène de résistance à la vancomycine *vanA*. Cet isolat clinique, provenant du laboratoire de microbiologie du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), est fortement résistant à la vancomycine, mais sensible à la clindamycine. C'est une caractéristique très particulière puisqu'il est connu que les souches d'ERV possèdent habituellement une résistance intrinsèque à la clindamycine (Murray *et al.*, 1997; Cetinkaya *et al.*, 2000). Des études génétiques plus approfondies devront être effectuées pour élucider et confirmer ce phénomène. Des souris CF-1 ont reçu une antibiothérapie de 5 jours à la clindamycine afin de perturber la flore intestinale et de permettre la colonisation de l'ERV. À partir du début du traitement antibiotique, les souris ont été gavées quotidiennement avec de la saline, *Lc. lactis* MM19, *P. acidilactici* MM33 ou *P. acidilactici* MM33A. Trois jours après l'antibiothérapie, les souris ont reçu une dose de ERV. La densité d'ERV dans les souris gavées par *Lc. lactis* MM19 a été réduite de 1,73 et 2,50 log UFC/g par rapport au groupe traité avec la saline, 1 et 3 jours

après l'infection respectivement. Le gavage des souris avec la souche productrice de pédiocine a diminué de 1,85 log UFC/g la concentration d'ERV trois jours après l'infection tandis que la souche non-bactériocinogène n'était pas différente du témoin saline pour toute la durée de l'expérience. Les ERV étaient indétectables six jours après l'infection dans les fèces des souris gavées avec *Lc. lactis* MM19 ou *P. acidilactici* MM33 tandis que cet effet n'est survenu que huit après l'infection pour les souris gavées avec du PBS ou la souche non-bactériocinogène *P. acidilactici* MM33A. Les souris traitées avec la bacitracine avaient des niveaux indétectables d'ERV pour la durée des gavages. Lorsque ceux-ci ont été arrêtés, soit 3 jours après l'infection pour ce groupe, une récurrence de l'infection à ERV chez 7 des 8 souris a été notée. Cette récurrence confirme les résultats obtenus par Donskey *et al.* (2001). Les surnageants de culture filtrées et neutralisés ont démontré une forte activité antimicrobienne dans les tests de diffusion dans des puits. Il apparaît donc que le traitement des souris avec *Lc. lactis* MM19 a réduit la colonisation intestinale d'ERV tandis que *P. acidilactici* MM33 a diminué la charge pathogénique une fois l'implantation effectuée. La production de bactériocines semble donc être une propriété importante afin d'inhiber l'ERV *in vivo*. L'ingestion de souches de BAL humaines a permis de moduler le microbiote intestinal de souris saines et a réduit la colonisation intestinale chez des souris infectées par l'ERV. Ces souches semblent être de bonnes candidates pour prévenir ou traiter des infections intestinales causées par une bactérie résistante à la vancomycine. D'autres travaux de recherche seront encore nécessaires afin de valider ces résultats. D'une part, il sera important de tester la capacité antimicrobienne des bactéries et de leurs bactériocines purifiées contre une grande variété de souches d'ERV possédant les autres gènes de résistance à la vancomycine *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, la CMI de chaque bactériocine ou de leurs combinaisons devra être réalisée afin de prévenir le phénomène de résistance aux bactériocines qui apparaissait assez facilement lorsque la pédiocine a été utilisée lors des épreuves antimicrobiennes. Il serait également intéressant d'étudier les modifications structurales et génétiques chez des souches d'ERV résistantes à la pédiocine. Des analyses d'électrophorèse à 2-dimensions permettraient de visualiser les changements qui se produisent dans les protéines membranaires tandis que la variation des ratios d'acides gras membranaires pourrait être évaluée par chromatographie en phase gazeuse. Enfin, une autre avenue de

recherche consisterait en la mise au point d'une méthode spécifique permettant de quantifier ou de démontrer la synthèse des bactériocines par les souches directement dans l'intestin.

Selon les résultats présentés dans le chapitre 6, il est aussi possible de remarquer que *P. acidilactici* MM33 survit relativement bien à un pH ≥ 2.5 et aux sels biliaires. En fait, *P. acidilactici* MM33 semble beaucoup mieux supporter ces conditions drastiques que les souches de pédiocoques présentées dans l'étude de Casey *et al.* (2004). En effet, ces auteurs ont isolé une souche qui croît sur une gélose MRS ne contenant que 2% de sels biliaires. Cependant, *Lc. lactis* MM19 semble plus affecté par le fluide gastrique à un pH < 3. Il est bien connu que ce genre bactérien résiste mal au pH acide (Kimoto *et al.*, 2000). En effet, la souche de *Lc. lactis* utilisée dans l'étude de Hartke *et al.* (1996) est inhibée à un pH de 3.9 tandis que plusieurs autres souches de cette espèce ne tolèrent ni l'acidité ni les sels biliaires (Kimoto *et al.*, 2000; Kimoto *et al.*, 2003). Dans une étude de Kimoto *et al.* (2003), les auteurs ont administré oralement à des souris une souche de *Lactococcus* résistante et une autre sensible à l'acidité et aux sels biliaires (à la suite des résultats obtenus lors de tests *in vitro*). Ils ont dénombré une grande quantité des deux souches dans les fèces de la majorité des souris, signe que les deux bactéries ont résisté au transit gastro-intestinal. Les tests *in vitro* de résistance aux conditions qui règnent dans le tractus intestinal sont importants pour faire une pré-sélection des souches à potentiel probiotique, mais à la lueur des résultats obtenus au chapitre 6 et dans la publication de Kimoto *et al.* (2003), il s'avère très important de confirmer les données en réalisant des études *in vivo* chez les animaux. Le support d'administration joue aussi un rôle important dans la survie des BAL au transit gastro-intestinal, ce dernier pouvant tamponner l'acidité gastrique augmentant ainsi les chances de survie du probiotique. En ce sens, le lait fermenté commercial qui a fait l'objet des chapitres 2 et 3 de cette thèse, présente peut-être une caractéristique majeure qu'il serait intéressant de vérifier lors de futures études chez les souris.

Pour conclure, ce projet de doctorat aura permis d'isoler deux souches humaines productrices de nisine et de pédiocine. Ces bactéries, à fort potentiel probiotique,

pourraient être utilisées dans la fabrication d'un produit nutraceutique ou ingrédient fonctionnel dédié à la prévention des infections gastro-intestinales causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques. De très nombreuses perspectives de recherche sont maintenant ouvertes. En premier lieu, il sera très important de caractériser les souches nouvellement isolées et de les comparer avec d'autres souches de *Lactococcus* et de *Pediococcus* afin d'en connaître les similitudes et les différences. Le séquençage du plasmide de *P. acidilactici* MM33 permettra de vérifier le fonctionnement de l'opéron *ped* et de possiblement découvrir des modifications par rapport aux plasmides d'autres souches productrices de pédiocine. Le séquençage des génomes des deux bactéries permettra de vérifier l'absence de gènes de virulence, de résistance aux antibiotiques ou des molécules d'adhésion intestinale, mais aussi il sera possible d'approfondir la connaissance des mécanismes contrôlant la production des bactériocines ou impliqués dans la résistance au transit gastro-intestinal. Ensuite, le développement de sondes moléculaires spécifiques à ces deux souches et couplées à la protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*) permettront de quantifier et de visualiser la progression des bactéries dans les diverses sections de l'intestin animal et humain. Une autre voie de développement consisterait à établir la dose-réponse dans le modèle d'infection à ERV. De plus, le même modèle pourrait servir à déterminer la formule optimale d'administration des probiotiques (sous forme fraîche ou en capsule de poudre lyophilisée) ainsi que le nombre de gavage quotidien idéal, ce qui permettrait de mettre au point une méthodologie anti-infectieuse qui pourrait ultérieurement être appliquée à des sujets humains.

Bibliographie

- ABEE, T., L. Krockel et C. Hill. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. Food Microbiology, vol.28. p. 169-185.
- ABREU, M. T., M. Fukata et M. Arditi. 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. The Journal of Immunology, vol. 174. p. 4453-4460.
- ABRIOUEL, H., E. Valdivia, A. Galvez et M. Maqueda. 2001. Influence of physico-chemical factors on the oligomerization and biological activity of bacteriocin AS-48. Current Microbiology, vol. 42. p. 89-95.
- ADOLFSSON, O., S. N. Meydani et R. M. Russell. 2004. Yogurt and gut function. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 80 p. 245-56.
- AGERBAEK, M., L. U. Gerdes et B. Richelsen. 1995. Hypocholesterolaemic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. European Journal of Clinical Nutrition, vol. 49. p. 346-352.
- AGERBETH, B. et G. H. Gudmundsson. 2006. Host antimicrobial defence peptides in human disease. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 306. p. 67-90.
- AGERHOLM-LARSEN, L., A. Raben, N. Haulrik, A. S. Hansen, M. Manders et A. Astrup. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. European Journal of Clinical Nutrition, vol. 54. p. 288-297.
- AGUIRRE, M. et M. D. Collins. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. Journal of Applied Microbiology, vol. 75. p. 95-107.
- AHRI, K., J. Crociani, J. Ballongue et F. Schneider. 1995. Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. Letters in Applied Microbiology, vol. 21. p. 149-151.
- ALDRIDGE, P. D., M. A. Gray, B. H. Hirst et C. M. Khan. 2005. Who's talking to whom? Epithelial-bacterial pathogen interactions. Molecular Microbiology, vol. 55. p. 655-663.
- ALI, D., C. Lacroix, D. Thuault, C. M. Bourgeois et R. E. Simard. 1995. Characterization of diacetin B, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* UL720. Canadian Journal of Microbiology, vol. 41. p. 832-841.
- ALLISON, G. E., R. W. Worobo, M. E. Stiles et T. R. Klaenhammer. 1995. Heterologous expression of the lacticin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. Applied and Environmental Microbiology, vol. 61. p. 1371-1377.
- ALTEKRUSE, S. F., B. B. Timbo, J. C. Mowbray, N. H. Bean et M. E. Potter. 1998. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary

manufacturing practices protect consumers. Journal of Food Protection, vol. 61. p. 1405-1407.

ALTSCHUL, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers et D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, vol. 215. p. 403-410.

ANDERSON, J. W. et S. E. Gilliland. 1999. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. Journal of the American College of Nutrition, vol. 18. p. 43-50.

ANONYMUS. 2002. *Dans: Current protocols in protein science* eds COLIGAN, J. E., B. M. Dunn, D. W. Speicher et P. T. Wingfield. pp. 10.5.6-10.5.8. USA: John Wiley & Sons, Inc.

ANUKAM, K., E. Osazuwa, I. Ahonkhai, M. Ngwu, G. Osemene, A. W. Bruce et G. Reid. 2006. Augmentation of antimicrobial metronidazole therapy of bacterial vaginosis with oral probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14: randomized, double-blind, placebo controlled trial. Microbes and Infection, vol. 8. p. 1450-1454.

ARMUZZI, A., F. Cremonini, V. Ojetto, F. Bartolozzi, F. Canducci, M. Candelli, L. Santarelli, G. Cammarota, A. de Lorenzo, P. Pola, G. Gasbarrini et A. Gasbarrini. 2001a. Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy: a pilot study. Digestion, vol. 63. p. 1-7.

ARMUZZI, A., F. Cremonini, F. Bartolozzi, F. Canducci, M. Candelli, V. Ojetto, G. Cammarota, M. Anti, A. de Lorenzo, P. Pola, G. Gasbarrini et A. Gasbarrini. 2001b. The effect of oral administration of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, vol. 15. p. 163-169.

ARVOLA, T., K. Laiho, S. Torkkeli, H. Mykkanen, S. Salminen, L. Maunula et E. Isolauri. 1999. Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. Pediatrics, vol. 104. p. e64.

ASAHARA, T., K. Shimizu, K. Nomoto, T. Hamabata, A. Ozawa et Y. Takeda. 2004. Probiotic Bifidobacteria protect mice from lethal infection with shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Infection and Immunity, vol. 72. p. 2240-2247

ASAO, T., Y. Kumeda, T. Kawai, T. Shibata, H. Oda, K. Haruki, H. Nakazawa et S. Kozaki. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. Epidemiology and Infection, vol. 130. p. 33-40.

ASHAR, M. N. et J. B. Prajapati. 2000. Verification of hypocholesterolemic effect of fermented milk on human subjects with different cholesterol levels. Folia Microbiologica, vol. 45. p. 263-268.

AUCKEN, H. M., M. Ganner, S. Murchan, B. D. Cookson et A. P. Johnson. 2002. A new UK strain of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-17) resistant to multiple antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 50. p. 171-175.

AXELSSON, L. T. 1993. Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Dans: Lactic acid bacteria*. Salminen, S. et A von Wright (eds) Marcel Dekker: USA. p. 1-64.

BAREFOOT, S. F. et T. R. Klaenhammer. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 45. p. 1808-1815.

BARTOLONI, A., A. Mantella, B. P. Goldstein, R. Dei, M. Benedetti, S. Sbaragli et F. Paradisi. 2004. *In-vitro* activity of nisin against clinical isolates of *Clostridium difficile*. Journal of Chemotherapy, vol. 16. p. 119-121.

BAUER, R. et L. M. T. Dicks. 2005. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. International Journal of Food Microbiology, vol. 101. p. 201-216.

BAUER, R., M. L. Chikindas et M. L. T. Dicks. 2005. Purification, partial amino acid sequence and mode of action of pediocin PD-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. International Journal of Food Microbiology, vol. 101. p. 17-27.

BAUER, E., B. A. Williams, H. Smidt, M. W. Verstegen et R. Mosenthin. 2006. Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. Current Issues in Intestinal Microbiology, vol. 7. p. 35-51.

BEAUSOLEIL, M., N. A. Fortier, S. Guénette, A. L'Écuyer, A. Savoie, K. Weiss, L. Lachaîne et M. Franco. 2004. Effect of a *Lactobacillus acidophilus* and *casei*-fermented milk in the primary prevention of antibiotic-associated diarrhea (lactic trial): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. American College of Gastroenterology; 69th Annual Scientific Meeting and Post-Graduate Course. Orlando, Florida.

BEGLEY, M., C. Hill et C. G. M. Gahan. 2006. Bile salt hydrolase activity in humans. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72. p. 1729-1738.

BENKERROUM, N., H. Oubel et L. B. Mimoun. 2002. Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in yogurt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter. Journal of Food Protection, vol. 65. p. 799-805.

BENNO, Y. et T. Mitsuoka. 1992. Impact of *Bifidobacterium longum* on human fecal microflora. Microbiology and Immunology, vol. 36. p. 683-694.

BERGER-BACHI, B. 2002. Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. International Journal of Medical Microbiology, vol. 292. p. 27-35.

BERJEAUD, J. -M. et Y. Cenatiempo. 2004. Purification of antilisterial bacteriocins. Methods in Molecular Biology, vol. 268. p. 225-233.

BERNBOM, N., T. R. Licht, C. H. Brogren, B. Jelle, A. H. Johansen, I. Badiola, F. K. Vogensen et B. Norrung. 2006. Effects of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota: role of nisin. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72. p. 239-244.

BHUNIA, A. K., M. C. Johnson et B. Ray. 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Industrial Microbiology, vol. 2. p. 319-322.

BHUNIA, A. K., M. C. Johnson et B. Ray. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. Journal of Applied Bacteriology, vol. 65. p. 261-268.

BHUNIA, A. K., M. C. Johnson, B. Ray et N. Kalchayanand. 1991. Mode of action of pediocine AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strain. Journal of Applied Microbiology, vol. 70. p. 25-33.

BJARNASON, I. 1994. Intestinal permeability. Gut, vol. 35 (supplement 1). p. S18-S22.

BLACK, F.T. et al. 1989. Prophylactic Efficacy of Lactobacilli on Traveler's Diarrhea, Traveler Medicine, vol. 7, p. 333-335.

BOGDANOVICH, T., D. Esel, L.M. Kelly, B. Bozdogan, K. Credito, G. Lin, K. Smith, L.M. Ednie, D.B. Hoellman et P.C. Appelbaum. 2005. Antistaphylococcal activity of DX-619, a new des-F(6)-quinolone, compared to those of other agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 49. p. 3325-3323.

BOURLIOUX, P., B. Koletzko, F. Guarner et V. Braesco. 2003. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone symposium "The intelligent intestine," held in Paris, June 14, 2002. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 78. p. 675-683.

BRADY, L. J., D. D. Gallaher et F. F. Busta. 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. Journal of Nutrition, vol. 130. p. 410S-414S.

BRANDTZAEG, P. 2003. Role of the secretory antibodies in the defence against infections. International Journal of Medical Microbiology, vol. 293. p. 3-15.

BRIAND, V., P. Buffet, S. Genty, K. Lacombe, N. Godineau, J. Salomon, E. Vandemelbrouck, P. Ralaimazava, C. Goujon, S. Matheron, A. Fontanet et O. Bouchaud.

2006. Absence of efficacy of nonviable *Lactobacillus acidophilus* for the prevention of traveler's diarrhea: a randomized, double-blind, controlled study. Clinical Infectious Diseases, vol. 43. p. 1170-1175.

BRÖTZ, H., G. Bierbaum, K. Leopold, P. E. Reynolds et H. G. Sahl. 1998. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 42. p. 154-160.

BRUMFITT, W., M. R. Salton et J. M. Hamilton-Miller. 2002. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 50. p. 731-734.

BRUNSER, O., G. Figueroa, M. Gotteland, E. Haschke-Becher, C. Magliola, F. Rochat, S. Cruchet, R. Palframan, G. Gibson, F. Chauffard et F. Haschke. 2006. Effects of probiotic or prebiotic supplemented milk formulas on fecal microbiota composition of infants. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, vol. 15. p. 368-376.

BUYDENS, P. et S. Debeuckelaere. 1996. Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. Scandinavian Journal of Gastroenterology, vol. 31. p. 887-891.

BYRNE, C. M., P. O'Kiely, D. J. Bolton, J. J. Sheridan, D. A. McDowell et L. S. Blair. 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during silage fermentation. Journal of Food Protection, vol. 65. p. 1854-1860.

CAI, Y., L. -K. Ng et J. M. Farber. 1997. Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean-sprouts. Journal of Applied Microbiology, vol. 83. p. 499-507.

CAMILLERI, M. 2005. Probiotics and irritable bowel syndrome: rationale, putative mechanisms, and evidence of clinical efficacy. Journal of Clinical Gastroenterology, vol. 40. p. 264-269.

CAN, M., B. A. Beşirbellioglu, I. Y. Avci, C. M. Beker et A. Paşa. Prophylactic *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a prospective study. Medical Science Monitor, vol. 12. p. I19-I22.

CARINA AUDISIO, M., G. Oliver et M. C. Apella. 2000. Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella Pullorum*. Journal of Food Protection, vol. 63. p. 1333-1337.

CAROLISSEN-MACKAY, V., G. Arendse et J. W. Hastings. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. International Journal of Food Microbiology, vol. 34. p. 1-16.

CASEY, P. G., G. D. Casey, G. E. Gardiner, M. Tangney, C. Stanton, R. P. Ross, C. Hill et G. F. Fitzgerald. 2004. Isolation and characterization of anti-*Salmonella* lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. Letters in Applied Microbiology, vol. 39. p. 431-438.

CASSONE, M., P. Serra, F. Mondello, A. Girolamo, S. Scafetti, E. Pistella et M. Venditti. 2003. Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. Journal of Clinical Microbiology, vol. 41. p. 5340-5343.

(CDC) Center for Disease Control and Prevention. 1993. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin-United States, 1989-1993. Morbidity and Mortality Weekly Reports, vol. 42. p. 597-599.

CETINKAYA, Y., P. Falk et C. G. Mayhall. 2000. Vancomycin resistant enterococci. Clinical Microbiology Reviews, vol. 13. p. 686-707.

CHAMPAGNE, C.P. 1998 Production de fermentations lactiques dans l'industrie laitière. La Fondation des Gouverneurs et Edisem (ed), Sainte-Hyacinthe, Canada.

CHANDAN, R. C. 1999. Enhancing market value of milk by adding cultures. Journal of Dairy Science, vol. 82. p. 2245-2256.

CHAPOY, P. 1985. Treatment of acute infantile diarrhea: controlled trial of *Saccharomyces boulardii*. Annales de Pédiatrie (Paris), vol. 32. p. 561-563.

CHARTERIS, W. P., P. M. Kelly, L. Morelli et J. K. Collins. 1998. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, vol. 84. p. 759-768.

CHARTERIS, W. P., P. M. Kelly, L. Morelli et J. K. Collins. 2000. Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt-tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolates. Journal of Food Protection, vol. 63. p. 1369-1376.

CHATTERJEE, C., M. Paul, L. Xie et W. A. van der Donk. 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. Chemical Reviews, vol. 105. p. 633-683.

CHEN, R. M., J. J. Wu, S. C. Lee, A. H. Huang et H. M. Wu. 1999. Increase of intestinal *Bifidobacterium* and suppression of coliform bacteria with short-term yogurt ingestion. Journal of Dairy Science, vol. 82. p. 2308-2314.

CHIASSON, F., J. Borsa, B. Ouattara et M. Lacroix. 2004. Radiosensitization of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* in ground beef. Journal of Food Protection, vol. 67. p. 1157-1162.

CHOI, H.-J., C. -I. Cheigh, S. B. Kim et Y. -R. Pyun. 2000. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. Journal of Applied Microbiology, vol. 88. p. 563-571.

CHUMCHALOVA, J., J. Stiles, J. Josephsen et M. Plockova. 2004. Characterization and purification of Acidocin CH5, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* CH5. Journal of Applied Microbiology, vol. 96. p. 1082-1089.

CHUNG, K. T., J. S. Dickson et J. D. Crouse. 1989. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. Applied and Environmental Microbiology, vol. 55. p. 1329-1333.

CINQUIN, C., G. Le Blay, I. Fliss et C. Lacroix. 2006. Comparative effects of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and fructo-oligosaccharides on infant gut microbiota tested in an in vitro colonic model with immobilized cells. FEMS Microbiology Ecology, vol. 57. p. 226-238.

CLEMENTS, M. L., M. M. Levine, P. A. Ristaino, V. E. Daya et T. P. Hughes. 1983. Exogenous lactobacilli fed to man - their fate and ability to prevent diarrheal disease. Progress in Food and Nutrition Science, vol. 7. p. 29-37.

CODY, S. H., S. L. Abbott, A. A. Marfin, B. Schulz, P. Wagner, K. Robbins, J. C. Mohle-Boetani, et D. J. Vugia. 1999. Two outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* serotype typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Northern California. Journal of American Medical Association, vol. 281. p. 1805-1810.

COLGAN, S. P., R. M. Hershberg, G. T. Furuta R. S. Blumberg. 1999. Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 96. p. 13938-13943.

COLOMBEL, J. F., A. Cortot, C. Neut et C. Romond. 1987. Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin-induced gastrointestinal effects. Lancet, vol. 2. p. 43.

COMITÉ SUR LES INFECTIONS NOSOCOMIALES DU QUÉBEC (CINQ). 2006. Mesures de prévention et de contrôle des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la

méthicilline (SARM) au Québec, 2^{ème} édition. Institut National de Santé Publique du Québec, 109 pages.

CONLY, J. M., K. Stein, L. Worobetz et S. Ruthledge-Harding. 1994. The contribution of vitamin K2 (menaquinones) produced by the intestinal microflora to human nutritional requirements for vitamin K. American Journal of Gastroenterology, vol. 89. p. 915-923.

CONLY, J. 2002. Antimicrobial resistance in Canada. Canadian Medical Association Journal, vol. 167. p. 885-891.

COOPER, R.A., P.C. Molan et K.G. Harding. 2002. The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. Journal of Applied Microbiology, vol. 93. p. 857-863.

CORR, S. C., Y. Li, C. U. Riedel, P. W. O'Toole, C. Hill et C. G. Gahan. 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 104. p. 7617-7621,

CORREA, N. B., L. A. Peret Filho, F. J. Penna, F. M. Lima et J. R. Nicoli. 2005. Randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. Journal of Clinical Gastroenterology, vol. 39. p. 385-389.

COURVALIN, P. 2006. Vancomycin-resistance in Gram-positive cocci. Clinical Infectious Diseases, vol. 42 (supplement 1). p. S25-S34.

CREMONINI, F., S. Di Caro, M. Covino, A. Armuzzi, M. Gabrielli, L. Santarelli, E. C. Nista, G. Cammarota, G. Gasbarrini et A. Gasbarrini. 2002. Effect of different probiotic preparations on anti-*Helicobacter pylori* therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. American Journal of Gastroenterology, vol. 97. p. 2744-2749.

CRUCHET, S., M. C. Obregon, G. Salazar, E. Diaz et M. Gotteland. 2003. Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* Lal on *Helicobacter pylori* colonization in children. Nutrition, vol. 19. p. 716-721.

CUTTER, C. N. et G. R. Siragusa. 1998. Incorporation of nisin in a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. Letters in Applied Microbiology, vol. 27. p. 19-23.

DAESCHEL, M. A. et T. R. Klaenhammer. 1985. Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Applied and Environmental Microbiology, vol. 50. 1538-1541.

DALTON, C. B., C. C. Austin, J. Sobel, P. S. Hayes, W. F. Bibb, L. M. Graves, B. Swaminathan, M. E. Proctor et P. M. Griffin. 1997. An outbreak of gastroenteritis and

fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. New England Journal of Medicine, vol. 336. p. 100-105.

DE BUYSER, M. L., B. Dufour, M. Maire et V. Lafarge. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. International Journal of Food Microbiology, vol. 67. p. 1-17.

DE DIOS POZO-OLANO, J., J. H. Warram, R. G. Gomez et M. G. Cavazos. 1978. Effect of a lactobacilli preparation on traveler's diarrhea. A randomized, double blind clinical trial. Gastroenterology, vol. 74. p. 829-830.

DE ROISSART, H. et F. M. Luquet (Eds). 1994. Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques. Vol. 2. Ed. Lorica, Uriage, 614 pages.

DE SMET, I., P. de Boever et W. Verstraete. 1998. Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. British Journal of Nutrition, vol. 79. p. 185-194.

DELLAGLIO, F., H. de Roissard, S. Torriani, M. C. Curk et D. Janssens. 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Dans : *Bactéries lactiques*. Vol 1. H. De Roissard et F. M. Luquet (ed.). Lorica: Uriage. p. 25-116.

DELVES-BROUGHTON, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. Food Technology, vol. 44. p. 100-117.

DE ROOS, N. M., G. Schouten et M. B. Katan. 1999. Yoghurt enriched with *Lactobacillus acidophilus* does not lower blood lipids in healthy men and women with normal to borderline high serum cholesterol levels. European Journal of Clinical Nutrition, vol. 53. p. 277-280.

DE ROOS, N. M. et M. B. Katan. 2000. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis : a review of papers published between 1988 and 1998. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 71. p. 405-411.

DE VOS, W. M., O. P. Kuipers, J. R. Van der Meer et R. J. Siezen. 1995. Micro Review Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. Molecular Microbiology, Vol. 17. p. 427-437.

DE VRESE, A. Stegelmann, B. Richter, S. Fenselau, C. Laue et J. Schrenzeimeir. 2001. Probiotics- compensation for lactase insufficiency. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73 (supplement). p. 421S-429S.

DE WAARD, R., J. Garssen, G. C. A. M. Bokken et J. G. Vos. 2002. Antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strain Shirota against gastrointestinal infection by *Listeria monocytogenes* in rats. International Journal of Food Microbiology, vol. 73. p. 93-100.

DE WAARD, R., E. Claassen, G. C. A. M. Bokken, B. Buiting, J. Garssen et J. G. Vos. 2003. 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. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, vol. 10. p. 59-65.

DIEKEMA, D. J., M. A. Pfaller, F. J. Schmitz, J. Smayevsky, J. Bell, R. N. Jones et M. Beach, M.; SENTRY Participants Group. 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clinical Infectious Diseases, vol. 32 (supplement 2). p. S114-132.

DIEP, D. B., L. Godager, D. Drede et I. F. Nes. 2006. Data mining and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. Microbiology, vol. 152. p. 1649-1659.

DONSKEY, C. J., J. A. Hanrahan, R. A. Hutton et L. B. Rice. 1999. Effect of parenteral antibiotic administration on persistence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in the mouse gastrointestinal tract. Journal of Infectious Diseases, vol. 180. p. 384-390.

DONSKEY, C. J., C. K. Hoyen, S. M. Das, S. Farmer, M. Dery et R. A. Bonomo. 2001. Effect of oral *Bacillus coagulans* administration on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized mice. Letters in Applied Microbiology, vol. 33. p. 84-88.

DRIDER, D., G. Fimland, Y. Héchard, L. M. McMullen et H. Prévost. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 70. p. 564-582.

DRISKO, J. A., C. K. Giles et B. J. Bischoff. 2003. Probiotics in health maintenance and disease prevention. Alternative Medicine Reviews, vol. 8. p. 143-155.

DUAN, K., N. W. Dunn et W. S. Kim. 1999. Rapid plasmid DNA isolation from *Lactococcus lactis* using overnight cultures. Biotechnology Techniques, vol. 13. p. 519-521.

DUNNE, C., L. Murphy, S. Flynn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morrissey, G. Thornton, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E. M. Quigley, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan et J. K. Collins. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. Antonie Van Leeuwenhoek, vol. 76. p. 279-292.

ECKMANN, L., W. F. Stenson, T. C. Savidge, D. C. Lowe, K. E. Barrett, J. Fierer, J. R. Smith et M. F. Kagnoff. 1997. Role of intestinal epithelial cells in the host secretory

response to infection by invasive bacteria. Bacterial entry induces epithelial prostaglandin h synthase-2 expression and prostaglandin E2 and F2 alpha production. Journal of Clinical Investigation, vol. 100. p. 296-309.

EIJSINK, V. G. H., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Havarstein, H. Holo et I. F. Nes. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. Antonie van Leeuwenhoek, vol. 81. p. 639-654.

EL-NEZAMI, H. S. et J. T. Ahokas. 1998. Lactic acid bacteria: an approach for detoxification of aflatoxins. Dans: *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, second edition. Salminen, S. et A. von Wright (Eds). Marcel Dekker, Inc., New York, USA. p. 359-367.

ELOTMANI, F., A. M. Revol-Junelles, O. Assobhei et J. B. Millière. 2002. Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raib, a Moroccan traditional fermented milk. Current Microbiology, vol. 44. p. 10-17.

ELPHICK, D. A. et Y. R. Mahida. 2005. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. Gut, vol. 54. p. 1802-1809.

EL-SHENAWY, M. A. et E. H. Marth. 1990. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of gluconic acid and during preparation of cottage cheesecurd using gluconic acid. Journal of Dairy Science, vol. 73. p. 1429-1438.

ENNAHAR, S., K. Sonomoto et A. Ishisaki. 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 87. p. 705-716.

ERDEVE, O., U. Tiras et Y. Dallar. 2004. The probiotic effect of *Saccharomyces boulardii* in a pediatric age group. Journal of Tropical Pediatrics, vol. 50. p. 234-236.

ERIKSSON, K., B. Carlsson, U. Forsum et P. G. Larsson. 2005. A double-blind treatment study of bacterial vaginosis with normal vaginal lactobacilli after an open treatment with vaginal clindamycin ovules. Acta Dermato-Venerologica, vol. 85. p. 42-46.

FAO/WHO experts. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Cordoba, Argentine, 1-4 octobre 2001, 34 pages.

FAO/WHO experts. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Canada, 30 avril – 1 mai, 2002, 11 pages.

FAO/WHO experts. 2006. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. World Health Organization and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, 56 pages.

FEORD, J. 2002. Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. Antonie van Leeuwenhoek, vol. 82. p. 353-360.

FERCHICHI, M., J. Frere, K. Mabrouk et M. Manai. 2001. Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product. FEMS Microbiology Letters, vol. 205. p. 49-55.

FIALA, E. S. 1975. Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1, 2-dimethylhydrazine. Cancer, vol. 36. p. 2407-2412.

FIGLER, M., G. Mózsik, B. Schaffer, B. Gasztónyi, P. Ács, B. Szili, R. Rab et S. Szakáli. 2006. Effect of special Hungarian probiotic on faecal microflora. World Journal of Gastroenterology, vol. 12. p. 1129-1132.

FITZGERALD, R. J., R. E. Morhart, C. Marquez et B. O. Adams. 1986. Inhibition of caries in hamsters treated with staphylococcin 1580. Infection and Immunity, vol. 54. p. 288-290.

FLEMMING, A. Penicillin. Présentation lors de la remise de prix Nobel, 11 décembre 1945. *Dans :* Nobel e-museum, disponible: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf. (accédé le 11 décembre 2006).

FLYNN, S., D. van Sinderen, G. M. Thornton, H. Holo, I. F. Nes et J. K. Collins. 2002. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. Microbiology, 148. p. 973-984.

FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, vol. 66. p. 365-378.

FURNESS, J.B., W.A. Kunze et N. Clerc. 1999. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut II. The intestine as a sensory organ : neural, endocrine, and immune responses. American Journal of Physiology, vol. 277. p. G922-G928.

GALVIN, M., C. Hill et R. P. Ross. 1999. Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. Letters in Applied Microbiology, vol. 28. p. 355-358.

GAO, Y., M. J. Van Belkum et M. E. Stiles. 1999. The outer membrane of gram-negative bacteria inhibits antibacterial activity of brochocin-C. Applied and Environmental Microbiology, vol. 65. p. 4329-4333.

GAON, D., H. Garcia, L. Winter, N. Rodriguez, R. Quintas, S. N. Gonzalez et G. Oliver. 2003. Effect of *Lactobacillus* strains and *Saccharomyces boulardii* on persistent diarrhea in children. Medicina (Buenos Aires), vol. 63. p. 293-298.

GÄNZLE, M. G., C. Hertel, J. M. B. M. Van der Vossen et W. P. Hammes. 1999. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. International Journal of Food Microbiology, vol. 48. p. 21-35.

GARRIDO, D., A. Suau, P. Pochart, S. Cruchet et M. Gotteland. 2005. Modulation of the fecal microbiota by the intake of a *Lactobacillus johnsonii* La1-containing product in human volunteers. FEMS Microbiology Letters, vol. 248. p. 249-256.

GHRAIRI, T., M. Manai, J. M. Berjeaud et J. Frere. 2004. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. Journal of Applied Microbiology, vol. 97. p. 621-628.

GHRAIRI, T., J. Frere, J. M. Berjeaud et M. Manai. 2005. Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese. International Journal of Food Microbiology, vol. 105. p. 389-398.

GIACOMETTI, A., O. Cirioni, F. Barchiesi et G. Scalise. 2000. In-vitro activity and killing effect of polycationic peptides on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, vol. 38. p. 115-118.

GIACOMINI, A., A. Squartini et N. P. Nuti. 2000. Nucleotide sequence and analysis of plasmid pMD136 from *Pediococcus pentosaceus* FBB61 (ATCC43200) involved in pediocin A production. Plasmid, vol. 43. p. 111-122.

GLASS, R. I., U. D. Parashar, J. S. Bresee, R. Turcios, T. K. Fischer, M. A. Widdowson, B. Jiang et J. R. Gentsch. 2006. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. Lancet, vol. 368. p. 323-332.

GOH, S., C. Newman, M. Knowles, F. J. Bolton, V. Hollyoak, S. Richards, P. Daley, D. Counter, H. R. Smith et N. Keppie. 2002. *E. coli* O157 phage type 21/28 outbreak in North Cumbria associated with pasteurized milk. Epidemiology and Infection, vol. 129. p. 451-457.

GOLDIN, B. R. et S. L. Gorbach. 1984. Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics and *Lactobacillus*: decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes and glucuronides. Journal of the National Cancer Institute, vol. 73. p. 689-695.

GOLDIN, B. R., S. L. Gorbach, M. Saxelin, S. Barakat, L. Gualtieri et S. Salminen. 1992. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. Digestive Diseases and Sciences, vol. 37. p. 121-128.

GONZALEZ, C. F. et B. S. Kunka. 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 53. p. 2534-2538.

GONZALEZ, S. N., M. C. Apella, N. C. Romero, M. E. N. De Macias et G. Oliver. 1993. Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains used in fermented milk. Journal of Food Protection, vol. 56. p. 773-776.

GOOSSENS, D. A. M., D. M. A. E. Jonkers, M. G. V. M. Russell, E. E. Stobberingh et R. W. Stockbrügger. 2006. The effect of a probiotic drink with *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition in faeces and mucosal biopsies of rectum and ascending colon. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, vol. 23. p. 255-263.

GORBACH, S. L., T. W. Chang et B. Goldin. 1987. Successfull treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. Lancet, vol. 2. p. 1519.

GOTTELAND, M., L. Poliak, S. Cruchet et O. Brunser. 2005. Effect of regular ingestion of *Saccharomyces boulardii* plus inulin or *Lactobacillus acidophilus* LB in children colonized by *Helicobacter pylori*. Acta Paediatrica, vol. 94. p. 1747-1751.

GOTZ, V., J. A. Romankiewicz, J. Moss et H. W. Murray. 1979. Prophylaxis against ampicillin-associated diarrhea with a lactobacillus preparation. American Journal of Hospital Pharmacy, vol. 36. p. 754-757.

GRANGETTE, C., S. Nutten, E. Palumbo, S. Morath, C. Hermann, J. Dewulf, B. Pot, T. Hartung, P. Hols et A. Mercenier. 2005. Enhanced anti-inflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 102. p. 10321-10326.

GREANY, K. A., J. A. Nettleton, K. E. Wangen, W. Thomas et M. S. Kurzer. 2004. Probiotic consumption does not enhance the cholesterol-lowering effect of soy in postmenopausal women. Journal of Nutrition, vol. 134. p. 3277- 3283.

GRILL, J. P., C. Manginot-Dürr, F. Schneider et J. Ballongue. 1995. Bifidobacteria and probiotic effects: action of *Bifidobacterium* species on conjugated bile salts. Current Microbiology, vol. 31. p. 23-27.

GRUNDMANN, H., M. Aires-de-Sousa, J.Boyce et E. Tiemersma. 2006. Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. Lancet, vol. 368. p. 874-885.

GUANDALINI, S., L. Pensabene, M. A. Zikri, J. A. Dias, L. G. Casali, H. Hoekstra, S. Kolacek, K. Massar, D. Micetic-Turk, A. Papadopoulou, J. S. de Sousa, B. Sandhu, H. Szajewska et Z. Weizman. 2000. *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 30. p. 54-60

GUARINO, A., R. B. Canani, M. I. Spagnuolo, F. Albano et L. di Benedetto. 1997. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 25. p. 516-519.

GUARNER, F. et J. R. Malagelada. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*, vol. 361. p. 512-519.

GUINANE, C. M., P. D. Cotter, C. Hill et R. P. Ross. 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 98. p. 1316-1325.

GULMEZ, M. et A. Guven. 2003. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in different yogurt and kefir combinations as prefermentation contaminant. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 95. p. 631-636.

GUSILS, C., O. Oppezzo, R. Pizarro et S. Gonzalez. 2003. Adhesion of probiotic lactobacilli to chick intestinal mucus. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 49. p. 472-478.

HANDWERGER, S., B. Raucher, D. Altarac, J. Monka, S. Marchione, K. V. Singh, B. E. Murray, J. Wolff et B. Walters. 1993. Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 16. p. 750-755.

HARTEMINK., R. et F. M. Rombouts. 1999. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli, and total anaerobes from faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 36. p. 181-192.

HARTKE, A., S. Bouche, J. C. Giard, A. Benachour, P. Boutibonnes et Y. Auffray. 1996. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Current Microbiology*, vol. 33. p. 194-199.

HE, F., A. C. Ouwehand, E. Isolauri, M. Hosoda, Y. Benno et S. Salminen. 2001. Differences in composition and mucosal adhesion of Bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors. *Current Microbiology*, vol. 43. P. 351-354.

HEIKKILA, M. P. et P. E. Saris. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 95. p. 471-478.

HELLER, K. J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73 (supplement 2). p. 374S-379S.

HEMMI, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda et S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature, vol. 408. p. 740-745.

HENDERSON, J. T., A. L. Chopko et P. D. van Wassenaar. 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. Archives in Biochemistry and Biophysics, vol. 295. p. 5-12.

HEYMAN, M., A. M. Crain-Denoyelle, G. Corthier, J. L. Morgat et J. F. Desjeux. 1986. Postnatal development of protein absorption in conventional and germ-free mice. American Journal of Physiology, vol. 251. p. G256-G231.

HILTON, E., P. Kolakowski, C. Singer et M. Smith. 1997. Efficacy of *Lactobacillus GG* as a diarrheal preventive in travelers. Journal of Travel Medicine, vol. 4. p. 41-43.

HIRAYAMA, K. et J. Rafter. 1999. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention : mechanistic considerations. Antonie van Leeuwenhoek, vol. 76. p. 391-394.

HIRAYAMA, K. et J. Rafter. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. Microbes and Infection, vol. 2. p. 681-686.

HOLO, H., Ø. Nilssen et I. F. Nes. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. Journal of Bacteriology, vol. 173. p. 3879-3887.

HOLZAPFEL, W. H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger et J. H. J. Huis in't Veld. 1998. Overview of gut flora and probiotics. International Journal of Food Microbiology, vol. 41. p. 85-101.

HOOKER, K. D. et J. T. DiPiro. 1988. Effect of antimicrobial therapy on bowel flora. Clinical Pharmacology, vol. 12. p. 878-888.

HOOPER, D. C., J. S. Wolfson, G. L. McHugh, M. D. Swartz, C. Tung et M. N. Swartz. 1984. Elimination of plasmid pMG110 from *Escherichia coli* by novobiocin and other inhibitors of DNA gyrase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 25. p. 586-590.

HORN, N., S. Swindell, H. Dodd et M. Gasson. 1991. Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. Molecular and General Genetics, vol. 228. p. 129-135.

HUNGIN, A. P., P. J. Whorwell, J. Tack et M. Mearin. 2003. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, vol. 17. p. 643-650.

ISHIBASHI, N. et S. Yamazaki. 2001. Probiotics and safety. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73 (supplement 2). p. 465S-470S.

ISOLAURI, E., M. Juntunen, T. Rautanen, P. Sillanaukee et T. Koivula. 1991. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. Pediatrics, vol. 88. p. 90-97.

ISOLAURI, E., M. Kaila, H. Mykkanen, W. H. Ling et S. Salminen. 1994. Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. Digestive Diseases and Sciences, vol. 39. p. 2595-2600.

ISOLAURI, E., Y. Sütas, P. Kankanpää, H. Arvilommi et S. Salminen. 2001. Probiotics : effects on immunity. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73 (supplement). p. 444S-450S.

ISOLAURI, E., S. Salminen et A. C. Ouwehand. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, vol. 18. p. 299-313.

JACK, R. W., J. R. Tagg et B. Ray. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiological Reviews, vol. 59. p. 171-200.

JACKSON, M. S., A. R. Bird et A. L. McOrist. 2002. Comparison of two selective media for the detection and enumeration of *Lactobacilli* in human faeces. Journal of Microbiological Methods, vol. 51. p. 313-321.

JACOB, F., A. Lwoff, A. Siminovitch et E. Wollman. 1953. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. Annales de l'Institut Pasteur (Paris), vol. 84. p. 222– 224.

JAMUNA, M. et K. Jeevaratnam. 2004. Isolation and partial characterization of bacteriocins from *Pediococcus* species. Applied Microbial Cell Physiology, vol. 65. p. 433-439.

JIMÉNEZ-DÍAZ, R., R. M. Ríos-Sánchez, M. Desmazeaud, J. L. Ruiz-Barba et J. C. Piard. 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. Applied and Environmental Microbiology, vol. 59. p. 1416-1424.

JOERGER, M. C. et T. R. Klaenhammer. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. Journal of Bacteriology, vol. 167. p. 439-446.

JUNG, H. C., L. Eckmann, S. K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska et M. F. Kagnoff. 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. Journal of Clinical Investigation, vol. 95. p. 55-65.

KAILA, M., E. Isolauri, E. Soppi, E. Virtanen, S. Laine et H. Arvilommi. 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. Pediatric Research, vol. 32. p. 141-144.

KAILA, M., E. Isolauri, M. Saxelin, H. Arvilommi et T. Vesikari. 1995. Viable versus inactivated *Lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhoea. Archives of Disease in Childhood, vol. 72. p. 51-53.

KALLMAN, J., E. Kihlstrom, L. Sjoberg et J. Schollin. 1997. Increase of staphylococci in neonatal septicaemia: a fourteen-year study. Acta Paediatrica, vol. 86. p. 533-538.

KATELARIS, P. H., I. Salam et M. J. Farthing. 1995. Lactobacilli to prevent traveler's diarrhea? New England Journal of Medicine, vol. 333. p. 1360-1361.

KAUR, K., L. C. Andrew, D. S. Wishart et J. C. Vanderschueren. 2004. Dynamic relationships among type IIa bacteriocins: temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic α -helix as a receptor-binding region. Biochemistry, vol. 43. p. 9009-9020.

KAWAMOTO, S., J. Shima, R. Sato, T. Eguchi, S. Ohmomo, J. Shibato, N. Horikoshi, K. Takeshita et T. Sameshima. 2002. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. Applied and Environmental Microbiology, vol. 68. p. 3830-3840.

KAWASE, M., H. Hashimoto, M. Hosoda, H. Morita et A. Hosono. 2000. Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. Journal of Dairy Science, vol. 83. p. 255-263.

KERNBAUM, S., J. M. Costa, F. Delatour, F. Faurisson, C. Girod, P. Kamoun et B. Rouveix. 1998. Dictionnaire de médecine. Médecine/Sciences Flammarion, Paris. p. 1030.

KIESSLING, G., J. Schneider et G. Jahreis. 2002. Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. European Journal of Clinical Nutrition, vol. 56. p. 843-849.

KIM, D. H et Y. H. Jin. 2001. Intestinal bacterial β -glucuronidase activity of patients with colon cancer. Archives of Pharmacal Research, vol. 24. p. S64-S67.

KIM, Y. S., M. J. Kim, P. Kim et J. H. Kim. 2006. Cloning and production of a novel bacteriocin, lactococcin K, from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MY23. Biotechnology Letters, vol. 28. p. 357-362.

KIMOTO, H., S. Ohmomo, M. Nomura, M. Kobayashi et T. Okamoto. 2000. *In vitro* studies on probiotic properties of lactococci. Milchwissenschaft, vol. 55. p. 245–249.

KIMOTO, H., M. Nomura, M. Kobayashi, K. Mizumachi et T. Okamoto. 2003. Survival of lactococci during passage through mouse digestive tract. Canadian Journal of Microbiology, vol. 49. p. 707-711.

KINGAMKONO, R., E. Sjogren et U. Svanberg. 1999. Enteropathogenic bacteria in fecal swabs of young children fed on lactic acid-fermented cereal gruels. Epidemiology and Infection, vol. 122. p. 23-32.

KLAINER, A. S., S. Gorbach et L. Weinstein. 1967. Studies of intestinal microflora. VI. Effect of X irradiation on the fecal microflora of the rat. Journal of Bacteriology, vol. 94. p. 378-382.

KLARE, I., C. Konstabel, D. Badstuber, G. Werner et W. Witte. 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. International Journal of Food Microbiology, vol. 88. p. 269-290.

KLAUTMAN, M.E. et T.L. Chang. 2006. Defensins in innate antiviral immunity. Nature Reviews in Immunology, vol. 6. p. 447-456.

KLEEREBEZEM, M. et J. Hugenholtz. 2003 Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. Current Opinions in Biotechnology, vol. 14. p. 232-237.

KOCH, S., M. Hufnagel, C. Theilacker et J. Huebner. 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic and prophylactic possibilities. Vaccine, vol. 22. p. 822-830.

KOLLARITSCH, H., H. Hols, P. Grobara et G. Wiedermann. 1993. Prophylaxe der reisediarrhöe mit *Saccharomyces boulardii* [Prevention of travelers' diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: results of a placebo-controlled double-blind study]. Fortschr Med, vol. 11. p. 153-156.

KONTIOKARI, T., K. Sundqvist, M. Nuutinen, T. Pokka, M. Koskela et M. Uhari. 2001. Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and *Lactobacillus GG* drink for the prevention of urinary tract infections in women. British Medical Journal, vol. 322. p. 1571.

KOTOWSKA, M., P. Albrecht et H. Szajewska. 2005. *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, vol. 21. p. 583-590.

KRUSZEWSKA, D., H. G. Sahl, G. Bierbaum, U. Pag, S. O. Hynes et A. Ljungh. 2004. Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. Journal of Antimicrobial chemotherapy, vol. 54. p. 648-653.

LABBÉ, N., P. Juteau, S. Parent et R. Villemur. 2003. Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the Montreal Biodome, Canada. Microbes Ecology, vol. 46. p. 12-21.

LACROIX, M. et F. Chiasson. 2004. The influence of MAP condition and active compounds on the radiosensitization of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* present in chicken breast. Radiation Physic and Chemistry, vol. 71. p. 67-70.

LA ROSA, M., G. Bottaro, N. Gulino, F. Gambuzza, F. Di Forti, G. Ini et E. Tornambe. 2003. Prevention of antibiotic-associated diarrhea with *Lactobacillus sporogens* and fructo-oligosaccharides in children. A multicentric double-blind vs placebo study. Minerva Pediatrica, vol. 55. p. 447-452.

LAUKOVÁ, A., P. Guba, R. Nemcová et Z. Vasilková. 2003. Reduction of *Salmonella* in gnotobiotic Japanese quails caused by the enterocin A-producing EK13 strain of *Enterococcus faecium*. Veterinary Research Communication, vol. 27, p. 275-280.

LEBLANC, J., G. C. Matar, J. C. Valdez, J. Leblanc et G. Perdigon. 2002. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. Journal of Dairy Science, vol. 85. p. 2733-2742.

LEBLANC, J., I. Fliss et C. Matar. 2004. Induction of a humoral response following an *Escherichia coli* O157:H7 infection with an immunomodulatory peptidic fraction derived from *Lactobacillus helveticus*-fermented milk. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, vol. 11. p. 1171-1181.

LEE, Y. K. et S. Salminen. 1995. The coming of age of probiotics. Trends in Food Science and Technology, vol. 6. p. 241-245.

LEE, S. M. et W. K. Lee. 2000. Inhibitory effects of lactic acid bacteria (LAB) on the azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions. Journal of Microbiology, vol. 38. p. 169-175.

LEE, Y. K., K. Nomoto, S. Salminen et S. L. Gorbach. 1999. Handbook of probiotics. John Wiley & Sons, Toronto, Canada, 211 pages.

LEE, S. Y., K. M. Yun, J. Fellman et D. H. Kang. 2002. Inhibition of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in mung bean sprouts by chemical treatment. Journal of Food Protection, vol. 65. p. 1088-1092.

LEE, Y. J., W. K. Yu et T. R. Heo. 2003. Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species

isolated from healthy infant faeces. International Journal of Antimicrobial Agents, vol. 21. p. 340-346.

LEER, R. J., J. M. van der Vossen, M. van Giezen, J. M. van Noort et P. H. Pouwels. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Microbiology, vol. 141. p. 1629-1635.

LE TIEN, C., M. Millette, M. A. Mateescu et M. Lacroix 2004. Modified alginate and chitosan for lactic acid bacteria immobilization. Biotechnology and Applied Biochemistry, vol. 39 p. 347-354.

LEVINE, D. P. 2006. Vancomycin. Clinical Infectious Diseases, vol. 42. p. S5-S12.

LEWIS, S. J. et S. Burmeister. 2005. A double-blind placebo-controlled study of the effects of *Lactobacillus acidophilus* on plasma lipids. European Journal of Clinical Nutrition, vol. 59. p. 776-780.

LEY, R. E., D. A. Peterson et J. I. Gordon. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell, vol. 124. p. 837-848.

LIÉVIN-LE MOAL, V. et A. L. Servin. 2006. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. Clinical Microbiology Reviews, vol. 19. p. 315-337.

LIMDI, J. K., C. O'Neill et J. McLaughlin. 2006. Do probiotics have a therapeutic role in gastroenterology? World Journal in Gastroenterology, vol. 12. p. 5447-5457.

LIN, S. Y., J.W. Ayres, W. Winkler, et al. 1989. *Lactobacillus* effects on cholesterol: *in vitro* and *in vivo* results. Journal of Dairy Research, vol. 72. p. 2885-2899.

LINSALATA, M., F. Russo, P. Berloco, M. L. Caruso, G. D. Matteo, M. G. Cifone, C. D. Simone, E. Ierardi et A. Di Leo. 2004. The influence of *Lactobacillus brevis* on ornithine decarboxylase activity and polyamine profiles in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. Helicobacter, vol. 9. p. 165-172.

LIONETTI, E., V. L. Miniello, S. P. Castellaneta, A. M. Magista, A. de Canio, G. Maurogiovanni, E. Ierardi, L. Cavallo et R. Francavilla. 2006. *Lactobacillus reuteri* therapy to reduce side-effects during anti-*Helicobacter pylori* treatment in children: a randomized placebo controlled trial. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, vol. 24. p. 1461-1468.

LIVERMORE, D. M. et N. Woodford. 2006. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends in Microbiology, vol. 14. p. 413-420.

LIU, W. et J. N. Hansen. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 56. p. 2551-2558.

LOPEZ, F. E., P. A. Vincent, A. M. Zenoff, R. A. Salomón et R. N. Farias. 2007. Efficacy of microcin J25 in biomatrices and in a mouse model of *Salmonella* infection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 59. p. 676-680.

LUQUET, F.M. et G. Corrieu (Eds). 2005. Bactéries lactiques et probiotiques. Tec & Doc Lavoisier, Paris, 307 pages.

MACK, D. R., S. Michail, S. Wei, L. McDougall et M. A. Hollingsworth. 1999. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. American Journal of Physiology, vol. 276. p. G941-950.

MAHONEY, M. et A. Henriksson. 2003. The effect of processed meat and meat starter cultures on gastrointestinal colonization and virulence of *Listeria monocytogenes* in mice. International Journal of Food Microbiology, vol. 84. p. 255-261.

MAJAMAA, H., E. Isolauri, M. Saxelin et T. Vesikari. 1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, vol. 20. p. 333-338.

MANGIANTE, G., G. Colucci, P. Canepari, C. Bassi, N. Nicoli, A. Casaril, P. Marinello, C. Signoretto et S. Bengmark. 2001. *Lactobacillus plantarum* reduces infection of pancreatic necrosis in experimental acute pancreatitis. Digestive Surgery, vol. 18. p. 47-50.

MANN, G. V. et A. Spoerry. 1974. Studies of a surfactant and cholesterolemia in the Maasai. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 27. p. 464-469.

MANNINEN, T. J. K., M. L. Rinkinen, S. S. Beasley et P. E. J. Saris. 2006. Alteration of the canine small-intestinal lactic acid bacterium microbiota by feeding of potential probiotics. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72. p. 6539-6543.

MANTE, E. S., E. Sakyi-Dawson et W. K. Amoa-Awua. 2003. Antimicrobial interactions of microbial species involved in the fermentation of cassava dough into agbelima with particular reference to the inhibitory effect of lactic acid bacteria on enteric pathogens. International Journal of Food Microbiology, vol. 89. p. 41-50.

MARE, L., G. M. Wolfaardt et L. M. Dicks. 2006. Adhesion of *Lactobacillus plantarum* 423 and *Lactobacillus salivarius* 241 to the intestinal tract of piglets, as recorded with fluorescent in situ hybridization (FISH), and production of plantaricin 423 by cells colonized to the ileum. Journal of Applied Microbiology, vol. 100. p. 838-845.

MARUGG, J. D., C. F. Gonzalez, B. S. Kunka, A. M. Ledebour, M. J. Pucci, M. Y. Toonen, S. A. Walker, L. C. Zoetmulder et P. A. Vandenberghe. 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. Applied and Environmental Microbiology, vol. 58. p. 2360-2367.

MARTEAU, P., B. Flourie, P. Pochart, C. Chastang, J. F. Desjeux et J. C. Rambaud. 1990. Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an *in vivo* study in lactase-deficient humans. British Journal of Nutrition, vol. 64. p. 71-79.

MARTEAU, P., M. Minekus, R. Havenaar et J. H. J. Huis In't Held. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. Journal of Dairy Science, vol. 80. p. 1031-1037.

MARTEAU, P.R., M. de Vrese, C. J. Cellier et J. Schrezenmeir. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73 (supplement). p. 430S-436S.

MARTEAU, P., E. Cuillerier, S. Meance, M. F. Gerhardt, A. Myara, M. Bouvier, C. Bouley, F. Tondu, G. Bommelaer et J. C. Grimaud. 2002. *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, vol. 16. p. 587-593.

MARTIN, N. I., T. Sprules, M. R. Carpenter, P. D. Cotter, C. Hill, R. P. Ross et J. C. Vedera. 2004. Structural characterization of lacticin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. Biochemistry, vol. 43. p. 3049-3056.

MARTONE, W. J. 1998. Spread of vancomycin-resistant enterococci: why did it happen in the United States? Infection Control and Hospital Epidemiology, vol. 19. p. 539-545.

MARTINEZ, B., M. Fernandez, J. E. Suarez et A. Rodriguez. 1999. Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid encoded bicistronic operon. Microbiology, vol. 145. p. 3155-3161.

MARTINEZ, J.L. et F. Baquero. 2002. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenecity, epidemicity and antibiotic resistance. Clinical Microbiology Reviews, vol. 15. p. 647-679.

MARUGG, J. D., C. F. Gonzalez, B. S. Kunka, A. M. Ledebot, M. J. Pucci, M. Y. Toonen, S. A. Walker, L. C. Zoetmulder et P. A. Vandenbergh. 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. Applied and Environmental Microbiology, vol. 58. p. 2360-2367.

MARZOTTO, M., C. Maffei, T. Paternoster, R. Ferrario, L. Rizzotti, M. Pellegrino, F. Dellaglio et S. Torriani. 2006. *Lactobacillus paracasei* A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. Research in Microbiology, vol. 157. p. 857-866.

MASTRETTA, E., P. Longo, A. Laccisaglia, L. Balbo, R. Russo, A. Mazzaccara et P. Gianino. 2002. Effect of *Lactobacillus* GG and breast-feeding in the prevention of rotavirus nosocomial infection. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, vol. 35. p. 527-531.

MAYER, L., D. Eisenhardt, P. Salomon, W. Bauer, R. Plous et L. Piccinini. 1991. Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. Gastroenterology, vol. 100. p. 3-12.

MAYER, L. 2000. Epithelial cell antigen presentation. Current Opinion in Gastroenterology, vol. 16. p. 531-535.

MAZANEC, M. B., C. L. Coudret et D. R. Fletcher. 1995. Intracellular neutralization of influenza virus by immunoglobulin A anti-hemagglutinin monoclonal antibodies. Journal of Virology, vol. 69. p. 1339-1343.

MCFARLAND, L. V., C. M. Surawicz, R. N. Greenberg, R. Fekety, G. W. Elmer, K. A. Moyer, S. A. Melcher, K. E. Bowen, J. L. Cox, Z. Noorani et al. 1994. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. Journal of American Medical Association, vol. 271. p. 1913-1918.

MCFARLAND, L. V., C. M. Surawicz, R. N. Greenberg, G. W. Elmer, K. A. Moyer, S. A. Melcher, K. E. Bowen et J. L. Cox. 1995. Prevention of beta-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. American Journal of Gastroenterology, vol. 90. p. 439-448.

MCFARLAND, L. V. 1998. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea. Digestive Diseases, vol. 16. p. 292-307.

MEAD, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin et R. V. Tauxe. 1999. Food-Related Illness and Death in the United States. Emerging Infectious Diseases, vol. 5. p. 607-625.

MESLIN, J. C. et E. Sacquet. 1984. Effects of microflora on the dimension of the enterocyte microvilli in the rat. Reproduction, Nutrition, Development, vol. 24. p. 307-314.

MILLER, K. W., P. Ray, T. Steinmetz, T. Hanekamp et B. Ray. 2005. Gene organization and sequences of pediocin AcH/PA-1 production operons in *Pediococcus* and *Lactobacillus* plasmids. Letters in Applied Microbiology, vol. 40. p. 56-62.

MILLETTE, M., W. Smoragiewicz et M. Lacroix. 2004. Antimicrobial potential of immobilized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 against selected bacteria. Journal of Food Protection, vol. 67. p. 1184-1189.

MILLETTE, M., C. Dupont, D. Archambault et M. Lacroix. 2007a. Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. Journal of Applied Microbiology, vol. 102. p. 274-282.

MILLETTE, C. Dupont, D. Archambault et M. Lacroix. 2007b. Pediocin purification from *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain. Accepté pour publication dans Journal in Applied Microbiology le 19 juillet 2007.

MODI, K. M., M. L. Chikindas et T. J. Montville. 2000. Sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* to heat and the synergistic action of heat and nisin. Letters in Applied Microbiology, vol. 30. p. 249-253.

MOHAN, R., C. Koebnick, J. Schildt, S. Schmidt, M. Mueller, M. Possner, M. Radke et M. Blaut. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. Journal of Microbiology, vol. 44. p. 4025-4031.

MOLL, G. N., W. N. Konings et A. J. M. Driessen. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. Antonie Van Leeuwenhoek, vol. 76. p. 185-198.

MONK, J. D., L. R. Beuchat et A. K. Hathcox. 1996. Inhibitory effects of sucrose monolaurate, alone and in combination with organic acids, on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Bacteriology, vol. 81. p. 7-18.

MONTALTO, M., V. Curigliano, L. Santoro, M. Vastola, G. Cammarota, R. Manna, A. Gasbarrini et G. Gasbarrini. 2006. Management and treatment of lactose malabsorption. World Journal of Gastroenterology, vol. 12. p. 187-191.

MORENCY, H., M. Mota-Meira, G. LaPointe, C. Lacroix et M. C. Lavoie. 2001. Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. Canadian Journal of Microbiology, vol. 47. p. 322-331.

MOTA-MEIRA, M., G. Lapointe, C. Lacroix et M. C. Lavoie. 2000. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 44. p. 24-29.

MULDERS, J. W., I. J. Boerrigter, H. S. Rollema, R. J. Siezen et W. M. de Vos. 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. European Journal of Biochemistry, vol. 201. p. 581-584.

MURRAY, B. E. 1997. Vancomycin-resistant enterococci. American Journal of Medicine, vol. 101. p. 284-293.

MYLLYLUOMA, E., T. Ahlroos, L. Veijola, H. Rautelin, S. Tynkkynen et R. Korpela. 2006. Effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment and probiotic supplementation on intestinal microbiota. International Journal of Antimicrobial Agents, epub ahead of print.

NAABER, P., I. Smidt, J. Stsepetova, T. Brilene, H. Annuk et M. Mikelsaar. 2004. Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal *Lactobacillus* species. Journal of Medical Microbiology, vol. 53. p. 551-554.

NAIDU, A. S. et R. A. Clemens. 2000. Probiotics *dans* Natural food antimicrobial systems. CRC Press, New York.

NAKAMURA, J., Y. Kubota, M. Miyaoka, T. Saitoh, F. Mizuno et Y. Benno. 2002. Comparison of four microbial enzymes in Clostridia and Bacteroides isolated from human feces. Microbiology and Immunology, vol. 46. p. 487-490.

NARUSZEWICZ, M., M. L. Johansson, D. Zapolska-Downar et H. Bukowska. 2002. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 76. p. 1249-1255.

NASCIMENTO, J. S., H. Ceotto, S. B. Nascimento, M. Giambiagi-deMarval, K. R. N. Santos et M. C. F. Bastos. 2006. Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant bacteria. Letters in Applied Microbiology, vol. 42. p. 215-221.

NELSON, R. 2003. Antibiotic development pipeline runs dry. Lancet, vol. 362. p. 1726-1727.

NES, I. F. et O. Johnsborg. 2004. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. Current Opinions in Biotechnology, vol. 15. p. 100-104.

NETHERWOOD, T., H. J. Gilbert, D. S. Parker et A. G. O'Donnell. 1999. Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology, vol. 65. p. 5134-5138.

NETTLES, C. G. et S. F. Barefoot. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. Journal of Food Protection, vol. 56. p. 338-356.

NIESS, J. H., S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B. A. McCormick, J. M. Vyas, M. Boes, H. L. Ploegh, J. G. Fox, D. R. Littman et H. C. Reinecker. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. Science, vol. 307. p. 254-258

NIKOSKELAINEN, S., S. Salminen, G. Bylund et A. C. Ouwehand. 2001. Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. Applied and Environmental Microbiology, vol. 67. p. 2430-2435.

NISSEN-MEYER, J., H. Holo, L. S. Havarstein, K. Sletten et I. F. Nes. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. Journal of Bacteriology, vol. 174. p. 5686-5692.

NISTA, E. C., M. Candelli, F. Cremonini, I. A. Cazzato, M. A. Zocco, F. Franceschi, G. Cammarota, G. Gasbarrini et A. Gasbarrini. 2004. *Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, vol. 20. p. 1181-1188.

National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report. Data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. American Journal of Infectious Control, vol. 32. p. 470-485.

NOBAEK, S., M. L. Johansson, G. Molin, S. Ahrne et B. Jeppsson. 2000. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. American Journal of Gastroenterology, vol. 95. p. 1231-1238.

NOONPAKDEE, W., C. Santivarangkna, P. Jumriangrit, K. Sonomoto et S. Panyim. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. International Journal of Food Microbiology, vol. 81. p. 137-145.

NORD, C. E., A. Lidbeck, K. Orrhage et S. Sjostedt. 1997. Oral supplementation with lactic acid-producing bacteria during intake of clindamycin. Clinical Microbiology and Infection, vol. 3. p. 124-132.

OCANA, V. S., A. A. Pesce de Ruiz Holgado et M. E. Nader-Macias. 1999. Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. Current Microbiology, vol. 38. p. 279-284.

OGWARO, B. A., H. Gibson, M. Whitehead et D. J. Hill. 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in traditional African yoghurt fermentation. International Journal of Food Microbiology, vol. 79. p. 105-112.

OKSANEN, P. J., S. Salminen, M. Saxelin, P. Hamalainen, A. Ihantola-Vormisto, L. Muurasniemi-Isoviita, S. Nikkari, T. Oksanen, I. Porsti, E. Salminen et al. 1990. Prevention of travelers' diarrhea by *Lactobacillus GG*. Annals of Medicine, vol. 22. p. 53-56.

OLASUPO, N. A., U. Schillinger, C. M. Franz et W. H. Holzapfel. 1994. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from 'wara'-a fermented skim cow milk product from West Africa. Letters in Applied Microbiology, vol. 19. p. 438-441.

OLASUPO, N. A., D. K. Olukoya et S. A. Odunfa. 1995. Studies on bacteriocinogenic *Lactobacillus* isolates from selected Nigerian fermented foods. Journal of Basic Microbiology, vol. 35. p. 319-324.

O'MAHONY, L., M. Feeney, S. O'Halloran, L. Murphy, B. Kiely, J. Fitzgibbon, G. Lee, G. O'Sullivan, F. Shanahan et J. K. Collins. 2001. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, vol. 15. p. 1219-1225.

O'MAHONY, L., J. McCarthy, P. Kelly, G. Hurley, F. Luo, K. Chen, G. C. O'Sullivan, B. Kiely, J. K. Collins, F. Shanahan et E. M. Quigley. 2005. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome : symptom responses and relationship to cytokine profile. Gastroenterology, vol. 128. p. 541-551.

OMS. 2001. Stratégie mondiale OMS pour la maîtrise de la résistance aux antibiotiques. Organisation Mondiale de la Santé, 12 pages.

OSMANAĞAOĞLU, O., Y. Beyatlı, U. Gündüz et S. C. Sacilik. 2000. Analysis of the genetic determinant for production of the pediocin P of *Pediococcus pentosaceus* Pep1. Journal of Basic Microbiology, vol. 40. p. 233-241.

OSWALD, I. P. 2006. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of pig intestine. Veterinary Research, vol. 37. p. 359-368.

OUSSALAH, M. S. Caillet et M. Lacroix. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, vol. 69. p. 1046-1055.

OUWEHAND, A. C., P. V. Kirjavainen, C. Shortt et S. Salminen. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. International Dairy Journal, vol. 9. p. 43-52.

OUWEHAND, A. C., S. Salminen et E. Isolauri. 2002. Probiotics : an overview of beneficial effects. Antonie van Leeuwenhoek, vol. 82. p. 279-289.

OUWEHAND, A. C., B. B. Salvadori, R. Fondén, G. Mogensen, S. Salminen et R. Sellars. 2003. Health effect of probiotics and culture-containing dairy products in humans. International Dairy Federation (IDF), Brussels, #380. p. 4-19.

PANT, A. R., S. M. Graham, S. J. Allen, S. Harikul, A. Sabchareon, L. Cuevas et C. A. Hart. 1996. *Lactobacillus* GG and acute diarrhoea in young children in the tropics. Journal of Tropical Pediatrics, vol. 42. p. 162-165.

PERDIGON, G., R. Fuller et R. Raya. 2001. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. Current Issues in Intestinal Microbiology, vol. 2. p. 27-42.

PERDIGON, G., M. Locascio, M. Medici, A. Pesce de Ruiz Holgado et G. Oliver. 2003. Interaction of Bifidobacteria with the gut and their influence in the immune function. Biocell, vol. 27. p. 1-9.

PHUAPRADIT, P., W. Varavithya, K. Vathanophas, R. Sangchai, A. Podhipak, U. Suthutvoravut, S. Nopchinda, V. Chantraruksa et F. Haschke. 1999. Reduction of rotavirus infection in children receiving bifidobacteria-supplemented formula. Journal of Medical Association of Thailand, vol. 82 (supplement 1). p. S43-S48.

PITT, W. M., T. J. Harden et R. R. Hull. 2000. Behavior of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk during fermentation with lactic acid bacteria. Journal of Food Protection, vol. 63. p. 916-920.

PIVA, A., E. Meola et A. Panciroli. 1995. Effect of *Pediococcus pentosaceus* FBB61, pediocin A producer strain, in caecal fermentations. Journal of Applied Bacteriology, vol. 78. p. 616-620.

PLUMMER, S., M. A. Weaver, J. C. Harris, P. Dee et J. Hunter. 2004. *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. International Microbiology, vol. 7. p. 59-62.

POCHART, P., P. Marteau, Y. Bouhnik, I. Goderel, P. Bourlioux et J. C. Rambaud. 1992. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 55. p. 78-80.

PREScott, L. M., J. P. Harley et D. A. Klein. 2003. Les bactéries: les Gram-positives pauvres en GC. Dans: *Microbiologie*, 2^e éd. française. Prescott, L. M., J. P. Harley, D. A. Klein (eds). De Boeck Université, Bruxelles, Belgique, p. 517-535.

RAFTER, J. 2002. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. British Journal of Nutrition, vol. 88 (supplement 1). p. S89-S94.

RASTALL, R. A. 2004. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. Journal of Nutrition, vol. 134. p. 2022S-2026S.

RAY, B. et K. W. Miller. 2000. Pediocin. *Dans*: Natural Food Antimicrobial Systems. Naidu, A. S., (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. p. 525-566.

RAZA, S., S. M. Graham, S. J. Allen, S. Sultana, L. Cuevas et C. A. Hart. 1995. *Lactobacillus* GG promotes recovery from acute nonbloody diarrhea in Pakistan. Pediatric Infectious Disease Journal, vol. 14. p. 107-111.

REDDY, B. S., J. H. Weisburger, T. Narisawa et F. L. Wynder. 1974. Colon carcinogenesis in germ free with 1, 2-dimethylhydrazine and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Cancer Research, vol. 34. p. 2368-2372.

REID, G. 2001. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. American Journal of Clinical Infection, vol. 73 (supplement 2). p. 437S-443S.

REID, G., A. W. Bruce, N. Fraser et C. Heinemann. 2001. Oral probiotics can resolve urogenital infections. FEMS Immunology and Medical Microbiology, vol. 30. p. 49-52.

REID, G. et J. Burton. 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes and Infection, vol. 4. p. 319-324.

REID, G., D. Charbonneau, J. Erb, B. Kochanowski, D. Beuerman, R. Poehner et A. W. Bruce. 2003a. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. FEMS Immunology and Medical Microbiology, vol. 35. p. 131-134.

REID, G., J. Sass, M.T. Sebulsky et J.K. McCormick. 2003b. Potential uses of probiotics in clinical practice. Clinical Microbioly Reviews, vol. 16. p. 658-672.

REID, G., J. Burton et E. Devillard. 2004. The rationale for probiotics in female urogenital healthcare. Medscape General Medicine, vol. 6. p. 49.

REINECKER, H. C. et D. K. Podolski. 1995. Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma c chain of the interleukin 2 receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 92. p. 8353-8357.

RICE, L. B. 2006. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. American Journal of Medicine, vol. 119. p. S11-S19.

RICHELSEN, B., K. Kristensen et S. B. Pedersen. 1996. Long-term (6 months) effect of a new fermented milk product on the level of plasma lipoproteins--a placebo-controlled and double blind study. European Journal of Clinical Nutrition, vol. 50. p. 811-815.

- RILEY, M. A. et D. M. Gordon. 1999. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. Trends in Microbiology, vol. 7. p. 129-133.
- RILEY, M. A. et J. E. Wertz. 2002. Bacteriocins : evolution, ecology and application. Annual Reviews in Microbiology, vol. 56. p. 117-137.
- RINCE, A., A. Dufour, S. Le Pogam, D. Thuault, C. M. Bourgeois et J. P. Le Pennec. 1994. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of lactococcin DR, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 60. p. 1652-1657.
- ROGER, M., M. C. Faucher, P. Forest, P. St-Antoine et F. Coutlee. 1999. Evaluation of a vanA-specific PCR assay for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during a hospital outbreak. Journal of Clinical Microbiology, vol. 37. p. 3348-3349.
- ROGLER, G. et T. Andus. 1998. Cytokines in inflammatory bowel disease. World Journal of Surgery, vol. 22. p. 382-389.
- ROLFE, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. Journal of Nutrition, vol. 130. p. S396-S402.
- ROITT, I., J. Brostoff et D. Male (Eds). 2002. Immunologie, 3^{ème} édition. De Boeck Université, Bruxelles. 480 pages.
- ROSENFELDT, V., K. F. Michaelsen, M. Jakobsen, C. N. Larsen, P. L. Moller, P. Pedersen, M. Tvede, H. Weyrehter, N. H. Valerius et A. Paerregaard. 2002. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. Pediatric Infectious Diseases Journal, vol. 21. p. 411-416.
- ROSSLAND, E., G. I. Andersen Borge, T. Langsrud et T. Sorhaug. 2003. Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. International Journal of Food Microbiology, vol. 89. p. 205-212.
- ROWLAND, I. R., C. J. Rumney, J. T. Coutts et L. C. Lievense. 1998. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. Carcinogenesis, vol. 19. p. 281-285.
- ROY, P. H. 1997. Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'œuvre chez les bactéries. Médecine/Sciences, vol. 13. p. 927-933.
- RUBIN, H. E. et F. Vaughan. 1979. Elucidation of the inhibitory factors of yogurt against *Salmonella typhimurium*. Journal of Dairy Science, vol. 62. p. 1873-1879.

RUSSELL, J. B. et H. C. Mantovani. 2002. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, vol. 4. p. 347-355.

SAARELA, M., G. Morgensen, R. Fondén, J. Mättö et T. Mattila-Sandholm. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology, vol. 84. p. 197-215.

SAHM, D. F., J. Kissinger, J. S. Gilmore, P. R. Murray, R. Mulder, J. Solliday et B. Clarke. 1989. *In vitro* susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 33. p. 1588-1591.

SAITO Y., Y. Hamanaka, K. Saito, S. Takizawa et Y. Benno. 2002. Stability of species composition of fecal bifidobacteria in human subjects during fermented milk administration. Current Microbiology, vol. 44. p. 368-373.

SAKAMOTO, I., M. Igarashi, K. Kimura, A. Takagi, T. Miwa et Y. Koga. 2001. Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 47. p. 709-710.

SALAZAR-LINDO, E., P. Miranda-Langschwager, M. Campos-Sanchez, E. Chea-Woo et R. B. Sack. 2004. *Lactobacillus casei* strain GG in the treatment of infants with acute watery diarrhea: a randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial. BMC Pediatrics, vol. 4. p. 18.

SALLAMI, L., E. E. Kheadr, I. Fliss et J. C. Vuillemar. 2004 Impact of autolytic, proteolytic, and nisin-producing adjunct cultures on biochemical and textural properties of cheddar cheese. Journal of Dairy Science, vol. 87. p. 1585-1594.

SAZAWAL, S., G. Hiremath, U. Dhingra, P. Malik, S. Deb et R. E. Black. 2006. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. Lancet Infectious Diseases, vol. 6. p. 374-382.

SCANNELL, A. G. M., C. Hill, D. J. Buckley et E. K. Arendt. 1997. Determination of the influence of organic acids and nisin on shelf-life and microbiological safety aspects of fresh pork. Journal of Applied Microbiology, vol. 83. p. 407-412.

SCHAACK, M. M. et E. H. Marth. 1988. Survival of *Listeria monocytogenes* in refrigerated cultured milks and yogurt. Journal of Food Protection, vol. 51. p. 848-852.

SCHAAFSMA, G., W. J. Meuling, W. van Dokkum et C. Bouley. 1998. Effects of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. European Journal of Clinical Nutrition, vol. 52. p. 436-440.

SCHEINBACH, S. 1998. Probiotics: functionality and commercial status. Biotechnology Advances, vol. 16. p. 581-608.

SCHILLINGER, U. et F. K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology, vol. 55. p. 1901-1906.

SCHREZENMEIR, J. et M. de Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics - approaching a definition. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73 (supplement 2). p. 361S-364S.

SCHVED, F., A. Lalazer, Y. Henis et B. J. Juven. 1993. Purification, partial characterization and plasmid linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. Journal of Applied Microbiology, vol. 74. p. 67-77.

SEKI, H., M. Shiohara, T. Matsumura, N. Miyagawa, M. Tanaka, A. Komiyama et S. Kurata. 2003. Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI. Pediatrics International, vol. 45. p. 85-90.

ŞENGÜL, M., B. Aslím, G. Uçar, N. Yücel, S. İşık, H. Bozkurt, Z. Sakaoğulları et F. Atalay. 2005. Effects of exopolysaccharide-producing probiotic strains on experimental colitis in rats. Diseases of the Colon and Rectum, vol. 45. p. 250-258.

SERVIN, A. L. et M. H. Coconnier. 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. Best Practices in Research and Clinical Gastroenterology, vol. 17. p. 741-754.

SEVERINA, E., A. Severin et A. Tomasz. 1998. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 41. p. 341-347.

SHAH, N. P. 2000. Effects of milk-derived peptides: an overview. British Journal of Nutrition, vol. 84 (suppl. 1). p. S3-S10.

SHANAHAN, F. 2002. The host-microbe interface within the gut. Best Practices in Research and Clinical Gastroenterology, vol. 16. p. 915-931.

SHEU, B. S., J. J. Wu, C. Y. Lo, H. W. Wu, J. H. Chen, Y. S. Lin et M. D. Lin. 2002. Impact of supplement with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori*. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, vol. 16. p. 1669-1675.

SHEU, B. S., C. H. Chen, A. W. Kao, S. T. Wang, Y. J. Yang, H. B. Yang et J. J. Wu. 2006. Pretreatment with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt can improve the efficacy of quadruple therapy in eradicating residual *Helicobacter pylori* infection after failed triple therapy. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 83. p. 864-869.

SHI, H. N. et A. Walker. 2004. Bacterial colonization and the development of intestinal defences. Canadian Journal of Gastroenterology, vol. 18. p. 493-500.

SHIMBO, I., T. Yamaguchi, T. Odaka, K. Nakajima, A. Koide, H. Koyama et H. Saisho. 2005. Effect of *Clostridium butyricum* on fecal flora in *Helicobacter pylori* eradication therapy. World Journal of Gastroenterology, vol. 11. p. 7520-7524.

SHIMOSATO, T., H. Kitazawa, S. Katoh, M. Tohno, I. D. Iliev, C. Nagasawa, T. Kimura, Y. Kawai et T. Saito. 2005. Augmentation of TH-1 type response by immunoactive AT oligonucleotide from lactic acid bacteria via Toll-like receptor 9 signaling. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 326. p. 782-787.

SHORNIKOVA, A. V., E. Isolauri, L. Burkanova, S. Lukovnikova et T. Vesikari. 1997a. A trial in the Karelian Republic of oral rehydration and *Lactobacillus GG* for treatment of acute diarrhoea. Acta Paediatrica, vol. 86. p. 460-465.

SHORNIKOVA, A. V., I. A. Casas, E. Isolauri, H. Mykkanen et T. Vesikari. 1997b. *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, vol. 24. p. 399-404.

SIITONEN, S., H. Vapaatalo, S. Salminen, A. Gordin, M. Saxelin, R. Wikberg et A. L. Kirkkola. 1990. Effect of *Lactobacillus GG* yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. Annals of Medicine, vol. 22. p. 57-59.

SILLANPAA, J. 2001. Tissue-adherence in lactic acid bacteria: identification and characterization of the collagen-binding S-layer protein of *Lactobacillus crispatus*. Thèse de doctorat présenté comme exigence partielle pour l'obtention du diplôme Ph. D., Université d'Helsinki, Finlande.

SILVA, M., N. V. Jacobus, C. Deneke et S. L. Gorbach. 1987. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 31. p. 1231-1233.

SIRAGUSA, G. R., C. N. Cutter et J. L. Willet. 1999. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. Food Microbiology, vol. 16. p. 229-235.

SOUGIOULTZIS, S., S. Simeonidis, K. R. Bhaskar, X. Chen, P. M. Anton, S. Keates, C. Pothoulakis et C. P. Kelly. 2006. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-

inflammatory factor that inhibits NF- κ B-mediated IL-8 gene expression. Biochemical and Biophysical Research Communications, sous presse.

SPLECHTNA, B., T. H. Nguyen, M. Steinbock, K. D. Kulbe, W. Lorenz et D. Haltrich. 2006. Production of probiotic galacto-oligosaccharides from lactose using beta-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. Journal of agricultural and Food Chemistry, vol. 54. p. 4999-5006.

SPURGEON, D., 2006. Preventable infections are out of control in Canadian hospitals. British Journal of Medicine, vol. 330. p. 748.

STANTON, C., G. Gardiner, H. Meehan, K. Collins, G. Fitzgerald, P. B. Lynch et R. P. Ross. 2001. Market potential for probiotics. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73 (supplement 2). p. 476S-483S.

STEIDLER, L., W. Hans, L. Schotte, S. Neirynck, F. Obermeier, W. Falk, W. Fiers et E. Remaut. 2000. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. Science, vol. 289. p. 1352-1355.

STEVENS, K. A., B. W. Sheldon, N. A. Klapes et T. R. Klaenhammer. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. Applied and Environmental Microbiology, vol. 57. p. 3613-3615.

STIEFEL, U., N.J. Pultz, M.S. Helfand et C.J. Donskey. 2004. Efficacy of oral ramoplanin for inhibition of intestinal colonization by vancomycin-resistant Enterococci in mice. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 48. p. 2144-2148.

ST-ONGE, M. P., E. R. Farnworth, T. Savard, D. Chabot, A. Mafu et P. J. Jones. 2002. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. BMC Complementary and Alternative Medicine, vol. 2. p. 1.

SUCCI, M., P. Tremonte, A. Reale, E. Sorrentino, L. Grazia, S. Pacifico et R. Coppola. 2005. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. FEMS Microbiology Letters, vol. 244. p. 129-137.

SURAWICZ, C. M., G. W. Elmer, P. Speelman, L. V. McFarland, J. Chinn et G. van Belle. 1989. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. Gastroenterology, vol. 96. p. 981-988.

SURAWICZ, C. M., L. V. McFarland, R. N. Greenberg, M. Rubin, R. Fekety, M. E. Mulligan, R. J. Garcia, S. Brandmarker, K. Bowen, D. Borjal et G. W. Elmer. 2000. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. Clinical Infectious Diseases, vol. 31. p. 1012-1017.

SYKORA, J., K. Valeckova, J. Amlerova, K. Siala, P. Dedek, S. Watkins, J. Varvarovska, F. Stozicky, P. Pazdiora et J. Schwarz. Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 and the eradication of *H. pylori* in children: a prospective randomized double-blind study. Journal of Clinical Gastroenterology, vol. 39. p. 692-698.

SZAJEWSKA, H., M. Kotowska, J. Z. Mrukowicz, M. Armanska et W. Mikolajczyk. 2001. Efficacy of *Lactobacillus GG* in prevention of nosocomial diarrhea in infants. Journal of Pediatrics, vol. 138. p. 361-365.

SZYMANSKI, H., J. Pejcz, M. Jawien, A. Chmielarczyk, M. Strus et P. B. Heczko. 2006. Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three *Lactobacillus rhamnosus* strains--a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, vol. 23. p. 247-253.

TAHARA, T., M. Oshimura, C. Umezawa et K. Kanatani. 1996. Isolation, partial characterization, and mode of action of Acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. Applied and Environmental Microbiology, vol. 62. p. 892-897.

TAKAHASHI, T., A. Kushiro, K. Nomoto, K. Uchida, M. Morotomi, T. Yokokura et H. Akaza. 2001. Antitumor effects of the intravesical instillation of heat killed cells of the *Lactobacillus casei* strain Shirota on the murine orthotopic bladder tumor MBT-2. Journal of Urology, vol. 166. p. 2506-2511.

TAKETO, M. M. 2006. Mouse models of gastrointestinal tumors. Cancer Science, vol. 97. p. 355-361.

TAMBOLI, C.P., C. Caucheteux, A. Cortot, J. F. Colombel et P. Desreumaux. 2003. Probiotics in inflammatory bowel disease : a critical review, Best Practice and Research Clinical Gastroenterology, vol. 17. p. 805-820.

TANNOCK, G. W., K. Munro, H. J. M. Harmsen, G. W. Welling, J. Smart et P. K. Gopal. 2000. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. Applied and Environmental Microbiology, vol. 66. p. 2578-2588.

TANNOCK, G. W. 2002. Exploring the relationships between intestinal microflora and inflammatory conditions of the human bowel and spine. Antonie van Leeuwenhoek, vol. 81. p. 529-535.

TAYLOR, G. R. J. et C. M. Williams. 1998. Effects of probiotics and prebiotics on blood lipids. British Journal of Nutrition, vol. 80 (supplement 2). p. S225-S230.

TOURE, R., E. Kheadr, C. Lacroix, O. Moroni et I. Fliss. 2003. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology, vol. 95. p. 1058-1069.

TRUELSTRUP HANSEN, L., P. M. Allan-Wojtas, Y. L. Jin et A. T. Paulson. 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiology, vol. 19. p. 35-45.

TSUKAHARA, T., H. Koyama, M. Okada et K. Ushida. 2002. Stimulation of butyrate production by gluconic acid in batch culture of pig cecal digesta and identification of butyrate-producing bacteria. Journal of Nutrition, vol. 132. p. 2229-2234.

TUOMOLA, E., R. Crittenden, M. Playne, E. Isolauri et S. Salminen. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73 (supplement 2). p. 393S-398S.

TURCOTTE, C., C. Lacroix, E. Kheadr, L. Grignon et I. Fliss. 2004. A rapid microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. International Journal of Food Microbiology, vol. 90. p. 283-293.

TURSI, A., G. Brandimarte, G. M. Giorgetti et M. E. Modeo. 2004. Effect of *Lactobacillus casei* supplementation on the effectiveness and tolerability of a new second-line 10-day quadruple therapy after failure of a first attempt to cure *Helicobacter pylori* infection. Medical Science Monitor, vol. 10. p. CR662-CR666.

TWOMEY, D. P., A. I. Wheelock, J. Flynn, W. J. Meaney, C. Hill et R. P. Ross. 2000. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. Journal of Dairy Science, vol. 83. p. 1981-1988.

TWOMEY, D., R. P. Ross, M. Ryan, B. Meaney et C. Hill. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. Antonie Van Leeuwenhoek, vol. 82. p. 165-185.

USMAN et A. Hosono. 2001. Hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus gasseri* SBT0270 in rats fed a cholesterol-enriched diet. Journal of Dairy Research, vol. 68. p. 617-624.

UTENG, M., H. H. Hauge, I. Brondz, J. Nissen-Meyer et G. Fimland. 2002. Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic peptides from complex culture medium. Applied and Environmental Microbiology, vol. 68. p. 952-956.

POL, I. E. et E. J. Smid. 1999. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, vol. 29. p. 166-170.

VAINER, B., T. Horn et O. H. Nielsen. 2006. Colonic epithelial cell expression of ICAM-1 relates to loss of surface continuity: a comparative study of inflammatory bowel disease and colonic neoplasms. Scandinavian Journal of Gastroenterology, vol. 41. p. 318-325.

VAN BELKUM, M. J., J. Kok et G. Venema. 1992. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of lcnB, a third bacteriocin determinant from the Lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. Applied and Environmental Microbiology, vol. 58. p. 572-577.

VANDERHOOF, J. A., D. B. Whitney, D. L. Antonson, T. L. Hanner, J. V. Lupo et R. J. Young. 1999. *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. Journal of Pediatrics, vol. 135. p. 564-568.

VAN HOUTTE, T., V. De Preter, E. De Brandt, K. Verbeke, J. Swings et G. Huys. 2006. Molecular monitoring of the fecal microbiota of healthy human subjects during administration of lactulose and *Saccharomyces boulardii*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72. p. 5990-5997.

VAN NIEL, C. W., C. Feudtner, M. M. Garrison, and D. A. Christakis. 2002. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. Pediatrics, vol. 109. p. 678-684.

VERDU, E. F. et S. M. Collins. 2004. Irritable bowel syndrome, Best Practice and Research Clinical Gastroenterology, vol. 18. p. 315-321.

VESTERLUND, S., M. Karp, S. Salminen et A. C. Ouwehand. 2006. *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. Microbiology, vol. 152. p. 1819-1826.

VIGNOLO, G. M., F. Suriani, A. Pesce de Ruiz Holgado et G. Oliver. 1993. Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. Journal of Applied Bacteriology, vol. 75. p. 344-349.

VINDEROLA, G., G. Perdigón, J. Duarte, E. Farnworth et C. Matar. 2006. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity. Cytokine, vol. 36. p. 254-260.

WAGNER, R. D., C. Pierson, T. Wagner, M. Dohnalek, M. Hilty et E. Balish. 2000. Probiotic effects of feeding heat-killed *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* to *Candida albicans*-colonized immunodeficient mice. Journal of Food Protection, vol. 63. p. 638-644.

WANG, K. Y., S. N. Li, C. S. Liu, D. S. Perng, Y. C. Su, D. C. Wu, C. M. Jan, C. H. Lai, T. N. Wang et W. M. Wang. 2004. Effects of ingesting *Lactobacillus*- and

Bifidobacterium-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 80. p. 737-741.

WELMAN, A. D. et I. S. Maddox. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria : perspectives and challenges. Trends in Biotechnology, vol. 21. p. 269-274.

WEWALKA, G., A. Stary, B. Bosse, H. E. Duerr et K. Reimer. 2002. Efficacy of povidone-iodine vaginal suppositories in the treatment of bacterial vaginosis. Dermatology, vol. 204 (supplement). p. 79-85.

WHITNEY, C. G., M. M. Farley, J. Hadler, L. H. Harrison, C. Lexau, A. Reingold, L. Lefkowitz, P. R. Cieslak, M. Cetron, E. R. Zell, J. H. Jorgensen et A. Schuchat. 2000. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. New England Journal of Medicine, vol. 343. p. 1917-1924.

WILDERDYKE, M. R., D. A. Smith et M. M. Brashears. 2004. Isolation, identification, and selection of lactic acid bacteria from alfalfa sprouts for competitive inhibition of foodborne pathogens. Journal of Food Protection, vol. 67. p. 947-951.

WIRAMAN, R. E., N. A. Klesse, R. W. Jack et J. R. Tagg. 2006. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72. p. 1148-1156.

WISTROM, J., S. R. Norrby, E. B. Myhre, S. Erickson, G. Grandstrom, L. Lagergren, G. Englund, C. E. Nord et B. Svenungsson. 2001. Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 47. p. 43-50.

WITSELL, D. L., C. G. Garrett, W. G. Yarbrough, S. P. Dorrestein, A. F. Drake et M. C. Weissler. 1995. Effect of *Lactobacillus acidophilus* on antibiotic-associated gastrointestinal morbidity: a prospective randomized trial. Journal of Otolaryngology, vol. 24. p. 230-234.

WOLLOSKI, I., G. Rechkemmer et B. L. Pool-Zobel. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 73 (supplement). p. 451S-455S.

WONG, J. M., R. de Souza, C. W. Kendall, A. Emam et D. J. Jenkins. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. Journal of Clinical Gastroenterology, vol. 40. p. 235-243.

WU, C. W., L. J. Yin et S. T. Jiang. 2004. Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 52. p. 1146-1151.

WULLT, M., M. L. Hagslatt et I. Odenholt. 2003. *Lactobacillus plantarum* 299v for the treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a double-blind, placebo-controlled trial. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, vol. 35. p. 365-367.

WUNDERLICH, P. F., L. Braun, I. Fumagalli, V. D'Apuzzo, F. Heim, M. Karly, R. Lodi, G. Politta, F. Vonbank et L. Zeltner. 1989. Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. Journal of International Medical Research, vol. 17. p. 333-338.

XIAO, J. Z., S. Kondo, N. Takahashi, K. Miyaji, K. Oshida, A. Hiramatsu, K. Iwatsuki, S. Kokubo et A. Hosono. 2003. Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. Journal of Dairy Science, vol. 86. p. 2452-2461.

YAMANO, T., H. Iino, M. Takada, S. Blum, F. Rochat et Y. Fukushima. 2006. Improvement of the human intestinal flora by ingestion of the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* La1. British Journal in Nutrition, vol. 95. p. 303-312.

YAMAZAKI, K., A. Tsunoda, M. Sibusawa, Y. Tsunoda, M. Kusano, K. Fukuchi, M. Yamanaka, M. Kushima, K. Nomoto et M. Morotomi. 2000. The effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* strain shirota on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci and colon cancer in the rat. Oncology Reports, vol. 7. p. 977-982.

YANG, K., W. Edelmann, K. Fan, K. Lau, V. R. Kolli, R. Fodde, P. Meera Khan, R. Kucherlapati et M. Lipkin. 1997. A mouse model of human familial adenomatous polyposis. Journal of Explorative Zoology, vol. 277. p. 245-254.

YASUI, H., K. Shida, T. Matsuzaki et T. Yokokura. 1999. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, vol. 76. p. 383-389.

YATES, J. 2005. Traveller's diarrhea. American Family Physician, vol. 71. p. 2095-2100.

YOUNG, V. B. et T. M. Schmidt. 2004. Antibiotic-associated diarrhea accompanied by large-scale alterations in the composition of the fecal microbiota. Journal of Clinical Microbiology, vol. 42. p. 1203-1206.

ZAMFIR, M., R. Callewaert, P. C. Cornea, L. Savu, I. Vatafu et L. De Vuyst. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. Journal of Applied Microbiology, vol. 87. p. 923-931.

ZENDO, T., M. Fukao, K. Ueda, T. Higuchi, J. Nakayama et K. Sonomoto. 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, vol. 67. p. 1616-1619.

ZENDO, T., S. Koga, Y. Shigeri, J. Nakayama et K. Sonomoto. 2006. Lactococcin Q, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72. p. 3383-3389.

ZHU, W. M., W. Liu et D. Q. Wu. 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. Journal of Applied Microbiology, vol. 88. p. 877-886.

ZOETENDAL, E. G., A. D. Akkermans et W. M. De Vos. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. Applied and Environmental Microbiology, vol. 54. p.3854-3859.

ZOETENDAL, E. G., E. E. Vaughan et W. M. de Vos. 2006. Microreview: a microbial world within us. Molecular Microbiology, vol. 59. p. 1639-1650.

ANNEXE I- Biographie

ARTICLES RÉCENTS

1. Turgis, M., J. Borsa, **M. Millette**, S. Salmiéri et M. Lacroix. 2007. Effect of selected plant essential oils or their constituents and modified atmosphere packaging on the radiosensitivity of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhi in ground beef. Accepté pour publication le 12 octobre 2007 dans *Journal of Food Protection*.
2. **Millette, M.**, C. Dupont, F. Shareck, G. Cornut, D. Archambault and M. Lacroix. 2007. Capacity of nisin and pediocin-producing bacteria to reduce vancomycin-resistant Enterococcus intestinal colonization. Soumis septembre 2007 à *Applied and Environmental Microbiology*.
3. **Millette, M.**, F. M. Luquet and M. Lacroix. 2007. Characterization of *Lactobacillus* strains with high probiotic potential. Soumis août 2007 à *Le Lait*.
4. **Millette, M.**, C. Dupont, F. Shareck, M. T. Ruiz, D. Archambault and M. Lacroix. 2007. Pediocin purification from *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain. Accepté pour publication le 19 juillet 2007 dans *Journal of Applied Microbiology*.
5. **Millette, M.**, F. M. Luquet and M. Lacroix. 2007. In vitro growth control of selected pathogens by a *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei*-fermented milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 44:314-319.
6. **Millette, M.**, C. Le Tien, W. Smoragiewicz and M. Lacroix. 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control* 18:878-884.
7. **Millette, M.**, C. Dupont, D. Archambault and M. Lacroix. 2007. Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. *J. Appl. Microbiol.* 102:274-282.
8. Caillet, S., **M. Millette**, S. Salmiéri and M. Lacroix. 2006. Combined effects of antimicrobial coating, modified atmosphere packaging, and gamma irradiation on *Listeria innocua* present in ready-to-use carrots (*Daucus carota*). *J. Food Prot.* 69: 80-85.
9. Caillet, S., **M. Millette**, M. Turgis, S. Salmiéri and M. Lacroix. 2006. Influence of antimicrobial compounds and modified atmosphere packaging on radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* present in ready-to-use carrots (*Daucus carota*). *J. Food Prot.* 69: 221-227.
10. **Millette, M.**, W. Smoragiewicz and M. Lacroix. 2004. Antimicrobial potential of encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 against selected bacteria. *J. Food Prot.* 67: 1184-1189.
11. Le Tien, C., **M. Millette**, M.-A. Mateescu and M. Lacroix. 2004. Survival of lactic acid bacteria encapsulated in functionalized alginate. *Biotechnol Appl. Biochem.* 39: 110-118.
12. Le Tien, C., **M. Millette**, M. Lacroix and M.-A. Mateescu. 2004. Modified alginate matrices for the immobilization of bioactive agents. *Biotechnol Appl. Biochem.* 39: 189-198.

PRÉSENTATIONS ORALES ET ÉCRITES

1. **Millette, M.**, D. Archambault and M. Lacroix. Assessment of the capacity of various probiotics to influence the faecal microbiota in C57BL/6 mice. Poster présenté au 4^{ème} Symposium International de Montréal: La santé par les probiotiques vers des effets prometteurs, 26-27 octobre 2006, Montréal, Qc, Canada. (**Récipiendaire d'un prix dans le concours du meilleur poster**).
2. **Millette, M.**, C. Dupont, F. Shareck, D. Archambault and M. Lacroix. Purification and identification of the pediocin produced by human intestinal *Pediococcus acidilactici* MM33. Poster présenté à la Conférence conjointe ICSTA/AAC, 28-30 mai 2006, Montréal, Qc, Canada.
3. Turgis, M., J. Borsa, **M. Millette**, S. Salmiéri and M. Lacroix. 2006. Radiosensitization of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhi* in ground beef in presence of essential oils or their main constituents. Poster présenté à la Conférence conjointe ICSTA/AAC, 28-30 mai 2006, Montréal, Qc, Canada.
4. **Millette, M.**, A. Ruel, D. Archambault, C. Dupont and M. Lacroix. Partial characterization of two bacteriocins produced by new human *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc* strains. Poster présenté au 3^{ème} Symposium International de Montréal sur les Probiotiques (La santé par les probiotiques: applications dans ce 3^{ème} millénaire), 28-29 octobre 2004, Montréal, Qc, Canada.
5. **Millette, M.** F.M. Luquet and M. Lacroix. Novel probiotic preparation CL1285 to eliminate enteropathogens. Poster présenté au 3^{ème} Symposium International de Montréal sur les Probiotiques (La santé par les probiotiques: applications dans ce 3^{ème} millénaire), 28-29 octobre 2004, Montréal, Qc, Canada.
6. **Millette, M.**, C. Bleau, J.P. Laverdure, R. Savard, L. Lamontagne, M.-A. Mateescu and M. lacroix. Propriétés immunomodulatrices de bactéries probiotiques immobilisées et de ses métabolites. Présentation orale au 72^{ème} congrès annuel de L'ACFAS, 10-14 mai 2004, Montréal, Qc, Canada.
7. **Millette, M.**, C. Bleau, J.P. Laverdure, R. Savard, L. Lamontagne and M. Lacroix. Immunomodulatory properties of immobilized probiotic bacteria and its metabolites. Présentation orale à First Conference on Natural Health Products, 22-24 février 2004, Montréal, Qc, canada.
8. **Millette, M.**, D. Archambault, M.-A. Mateescu and M. Lacroix. Inhibition of enteropathogens by the novel probiotic preparation CL1285. Poster présenté à First Conference on Natural Health Products, 22-24 février 2004, Montréal, Qc, canada.
9. Bleau, C., A. Monges, J.P. Laverdure, M. Lacroix, **M. Millette**, R. Savard and L. Lamontagne. Immunomodulating properties of exopolysaccharides from a high variant of *Lactobacillus rhamnosus*. Présentation orale à First Conference on Natural Health Products, 22-24 février 2004, Montréal, Qc, canada.
10. Le Tien, C., **M. Millette**, M.-A. Mateescu and M. Lacroix. Survival of lactic acid bacteria in functionalized alginate. 30th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, 20-23 juillet 2003, Glasgow, Écosse.
11. **Millette, M.**, M. Lacroix, D. Archambault, L. Lamontagne and D. Roy. Antipathogen and immunostimulatory potential of probiotic lactic acid bacteria. Poster présenté à la 53^{ème} Conférence de la Société Canadienne de Microbiologie, juin 2003, Laval, Qc, Canada.

12. **Millette, M.** Protection des probiotiques par immobilisation dans des biomolécules marines. Présentation orale à la 1^{ère} Conférence sur les biomolécules marines, novembre 2002, Rimouski, Qc, Canada.
13. **Millette, M.**, C. Le Tien, M. Lacroix, M.-A. Mateescu, D. Archambault and D. Roy. Survival of lactic acid bacteria encapsulated in functionalized alginate and chitosan. Poster présenté au 2^{ème} Symposium International sur les Probiotiques, 24-25 octobre 2002, Montréal, Qc, Canada.
14. **Millette, M.**, M. Lacroix and W. Smoragiewicz. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 to control the growth of *Staphylococcus aureus* in ground beef. Poster présenté au 2^{ème} Symposium International sur les Probiotiques, 24-25 octobre 2002, Montréal, Qc, Canada.
15. **Millette, M.**, B. Ouattara, W. Smoragiewicz and M. Lacroix. Antimicrobial potential of encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 against selected bacteria. Poster présenté à la 51^{ème} Conférence de la Société Canadienne de Microbiologie, 9-13 juin 2001, Waterloo, On, Canada