

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences

En Sciences Vétérinaires

par

Mohammed Tahar BOUBEZARI

**ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE, PURIFICATION,
MODE D'ACTION DE LA MICROCINE V ET EFFET DE LA
SUPPLEMENTATION DE LA RATION SUR LA QUALITE DES ŒUFS**

Soutenue le 01 juillet 2018 devant le jury :

M. Taha Mossadek HAMDI,	<i>Professeur à l'ENSV Alger</i>	Président
M. Tayeb IDOUI,	<i>Professeur à l'Université de Jijel</i>	Directeur de thèse
M. Ismail FLISS,	<i>Professeur Titulaire, Université Laval, Québec, Canada</i>	Co-directeur de thèse
M ^{me} . Soraya TEMIM,	<i>Professeur à l'ENSV Alger</i>	Examinatrice
M. Ammar AYACHI,	<i>Professeur à l'Université de Batna</i>	Examinateur
M. Mohamed SIFOUR,	<i>Professeur à l'Université de Jijel</i>	Examinateur

Année universitaire : 2017/2018

*A ma mère et à toute ma famille
A la mémoire de mon père
A ceux qui me sont chers*

Remerciements

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein des laboratoires de biologie de l'Université de Jijel, Laboratoires du département des Sciences des Aliments et Nutrition de l'Université Laval, sous les directions de :

–**Tayeb Idoui**, professeur à l'université de Jijel. Je tiens à lui exprimer tous mes sentiments, mon profond respect et mes sincères gratitude. Il n'a jamais cessé de m'encourager, et m'orienter afin d'arriver à mon but scientifique et moral. C'est une personne distinguée par ses qualités tant humaines que professionnelles, sa patience et son esprit analytique et constructif, montrés tout au long de ce travail. Sans lui, je ne commencerais jamais ma thèse et je ne la finirais jamais, il m'a sorti pas mal de fois de mes angoisses et m'a encouragé par ses vifs conseils quand je voyais que le chemin était encore loin et impossible... Merci Tayeb.

– **Ismail Fliss**, Professeur titulaire et directeur du centre de recherche en Sciences et Technologie du Lait à l'Université Laval, sans son aide, ses conseils, ses encouragements, ce travail n'aurait pu se terminer avec la qualité présente. Qu'il trouve ici le témoignage de ma haute considération. Ismail, je disais toujours de toi "Ismail, le bon gérant, malgré les quantités d'acétonitrile que j'ai consommé !", je prenais ça comme exemple pour moi... Merci Ismail.

–**Riadh Hammami**, professeur à l'Université d'Ottawa. Que puis-je dire de lui ... ? ! Tous les mots, toutes les expressions ne peuvent exprimer mes sentiments et mes sincères gratitude envers lui. Sans lui, rien de mes travaux n'aurait pu avoir lieu... Riadh, grâce à toi que j'ai pu terminer les travaux de ma thèse et que j'ai vu mon premier articles publié. C'était un immense honneur pour moi de travailler avec quelqu'un comme toi... Les remarques et les critiques pendant tes séances de travail m'ont été très utiles et m'ont forgé. Riadh, je te remercie infiniment et par-dessus tout, je te remercie aussi de ton amitié et ta bonne humeur pendant mon séjour au laboratoire.

Je voudrais remercier Professeur Taha Mossadek HAMDI, de l'ENSV d'Alger, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Je voudrais le remercier également pour sa façon de faire les cours, je les ai en ma mémoire malgré les années passées.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, Professeur Soraya TEMIM, de l'ENSV d'Alger, Professeur Ammar AYACHI, de l'Université de Batna et Professeur Mohamed SIFOUR, de l'Université de Jijel, pour avoir évalué l'ensemble de ce document et de s'être déplacés pour la soutenance.

Je voudrais remercier Benoît Fernandez, Allison Vimont et Luca Lo Verso pour leur aide au laboratoire et leur soutien.

Je remercie bien évidemment tout le personnel du département des aliments et nutrition, et du centre STELA en particulier Diane Gagnon, Marie Michelle Gagnon, Marine Béguin. Alexandre Bastien de l'INAF et tout le personnel si accueillant de l'Université Laval.

Un grand merci au doyen de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Pr Essaid LAGHOUCI. Aux enseignants du département de Microbiologie Appliquée et Sciences Alimentaires en particulier Pr Mohamed Sifour et Tarek Khennouf, ainsi que tout le personnel des laboratoires.

Je n'aurai pas de mots suffisamment forts pour dire à quel point mes amies rencontrés à l'Université Laval m'ont été indispensables. J'ai vécu avec elles des moments inoubliables : Ourdia Kareb (Louloute 2), Manel Ben Taher (Louloute) et Sabrine Naimi pour nos moments de folies au laboratoire et à la ville de Québec malgré le froid ! Ainsi qu'aux étudiants des locaux 1423 et 2402.

Mes amis algériens à Québec et Montréal pour leur soutien.

Ma famille... en particulier ma mère, le meilleur est pour la fin ! Je tiens bien évidemment à vous remercier du plus profond de mon cœur. Sans vous je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui et sans vous je ne serais pas arrivé jusqu'ici.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale 1

I. Synthèse bibliographique 3

I.1 Antibiotiques promoteurs de croissance	4
I.1.1 Utilisation des APC chez la volaille	4
I.1.2 Les antibiotiques dans la promotion de la croissance	4
I.1.3 Les résistances aux antibiotiques	5
I.1.3.1 La résistance bactérienne naturelle	5
I.1.3.2 La résistance bactérienne acquise	5
I.1.4 Impact de la consommation des antibiotiques	6
I.1.5 L'interdiction de l'utilisation des antibiotiques promoteurs de croissance en production animale	6
I.2 Alternatives aux antibiotiques promoteurs de croissance	7
I.2.1 Caractéristiques des bonnes alternatives des APC.....	7
I.2.2 Polysaccharides et enzymes exogènes	8
I.2.3 Acides organiques	8
I.2.4 Herbes et huiles essentielles	9
I.2.5 Prébiotiques.....	9
I.2.6 Les probiotiques	10
I.2.6.1 Caractéristiques d'un probiotique idéal.....	10
I.2.6.2 Mode d'action des probiotiques	11
I.2.6.3 Les probiotiques en aviculture	12
I.2.6.3.1 Effets sur la croissance.....	13
I.2.6.3.2 Effet sur la prise alimentaire et l'efficacité de la conversion des aliments.....	13
I.2.6.3.3 Réduction de la mortalité	14
I.2.6.3.4 Effets sur la production et la qualité des œufs	14
I.2.6.3.5 Potentiel de l'hypocholestérolémie	15
I.2.6.4 Facteurs d'efficacité des probiotiques	15
I.2.6.5 Variation de l'efficacité des probiotiques chez la volaille	16
I.2.6.6 Méthodes d'administration des probiotiques.....	18
I.2.6.6.1 Traitement des oiseaux individuellement	18
I.2.6.6.2 Administration via l'eau potable	18
I.2.6.6.3 Administration dans l'aliment	18
I.2.6.6.4 Application aux gouttelettes et à la pulvérisation	21
I.2.7 Les bactériocines	21
I.2.7.1 Bactériocines produites par les bactéries Gram positives.....	22
I.2.7.1.1 Classe I: Bactériocines modifiées post-traductionnellement	22
I.2.7.1.2 Classe II: Bactériocines non modifiées	23
I.2.7.1.3 Bactériolysines	24
I.2.7.2 Bactériocines des bactéries Gram négatives	24
I.2.7.2.1 Colicines	25

I.2.7.2.2 Les microcines	26
I.2.7.3 Applications des bactériocines	29
I.2.7.4 Modes d'application des bactériocines	30
I.2.7.4.1 Préparations de bactériocine	30
I.2.7.4.2 Les cultures productrices de bactériocine	30
I.2.7.5 Réglementation de l'utilisation des bactériocines comme additifs alimentaires	31
I.2.7.6 Impact des souches bactériocinogènes et de leurs bactériocines sur le microbiote intestinal	31
I.2.7.6.1 Le microbiote intestinal du poulet : Description et localisation dans le tractus digestif	31
I.2.7.6.2 Rôle des bactériocines au niveau du système digestif	33
II. Etude Expérimentale	36
II.1 Chapitre 1 : Criblage de l'activité antimicrobienne et la purification de la microcine V	36
II.1.1 Matériel et Méthodes	37
II.1.1.1 Les souches bactériennes et conditions de culture	37
II.1.1.2 Identification moléculaire des souches productrices	37
II.1.1.3 Détermination de l'activité antimicrobienne	38
II.1.1.3.1 Méthode de diffusion sur gélose	38
II.1.1.3.2 Méthode de dilution critique (microdilution)	38
II.1.1.4 Tests d'activité et de l'immunité	39
II.1.1.5 Courbes de croissance et de production de bactériocines	39
II.1.1.6 Sensibilité aux antibiotiques	39
II.1.1.7 Identification des gènes de virulence et sérotypage des souches	40
II.1.1.8 Sensibilité aux solvants organiques	40
II.1.1.9 Purification de la bactériocine	40
II.1.1.10 Détermination de la concentration en protéines	42
II.1.1.11 Effet des enzymes, du pH et du traitement thermique sur la stabilité de la bactériocine	42
II.1.1.12 Spectrométrie de masse et détermination de la séquence d'acides aminés	43
II.1.1.13 Concentration minimale inhibitrice	44
II.1.2. Résultats	44
II.1.2.1 Criblage, identification et caractérisation des souches bactériocinogènes	44
II.1.2.2 Cinétique de croissance	47
II.1.2.3 La sensibilité des bactériocines aux solvants, enzymes, au pH et aux traitements thermiques	50
II.1.2.4 Cross Test	52
II.1.2.5 Purification de la bactériocine	52
II.1.2.6 Spectrométrie de masse et séquence d'acides aminés	53
II.1.2.7 Spectre antimicrobien et CMI	54
II.1.3 Discussion	58

II.2 Chapitre 2 : Etude du mode d'action de la microcine V	61
II.2.1 Matériel et Méthodes	62
II.2.1.1 Cinétique de l'activité bactéricide de la microcine V contre <i>E. coli</i>	62
II.2.1.2 Mesure de l'activité bactéricide en présence des lipopolysaccharides	62
II.2.1.3 Test de dépolarisation membranaire.....	62
II.2.1.4 Marquage du peptide	63
II.2.1.5 Visualisation par microscopie à fluorescence	63
II.2.1.6 La microscopie électronique à transmission (MET).....	63
II.2.1.7 Essai de retardation de l'ADN d'E.coli sur gel	64
II.2.1.8 Mesure de l'activité hémolytique	64
II.2.2 Résultats.....	65
II.2.2.1 Cinétique de l'activité antibactérienne	65
II.2.2.2 Mesure de l'activité bactéricide en présence des LPS.....	66
II.2.2.3 La dépolarisation membranaire	67
II.2.2.4 Marquage à la Fluorescéine Isothiocyanate.....	67
II.2.2.5 Microscopie à fluorescence	68
II.2.2.6 Microscopie électronique à transmission.....	69
II.2.2.7 Essai de retardation de l'ADN d'E.coli sur gel	70
II.2.2.8 Activité hémolytique	71
II.2.3 Discussion	72
II.3 Chapitre 3. Effet de la supplémentation par <i>Lactobacillus plantarum</i> J34 sur la performance des poules pondeuses et la qualité des œufs	76
II.3.1 Matériel et Méthodes	77
II.3.1.1 Souche bactérienne	77
II.3.1.2 Effectif et conditions d'élevage	77
II.3.1.3 Alimentation, prophylaxie et traitement expérimental	77
II.3.1.4 Evaluation des performances zootechniques	78
II.3.1.5 Evaluation de la qualité de l'œuf	78
II.3.1.6 Physicochimie de l'œuf	79
II.3.1.6.1 Mesure de pH.....	79
II.3.1.6.2 Teneur en eau et matière sèche	79
II.3.1.6.3 Teneur en matière minérale et en protéines	80
II.3.1.6.4 Teneur en matière grasse totale	81
II.3.1.6.5 Teneur en glucides totaux et en β -carotène	81
II.3.1.7 Traitement statistique	82
II.3.2 Résultats	82
II.3.2.1 Nombre de cellules, mensurations et paramètres de qualité des œufs.....	82
II.3.2.2 Effets du probiotique sur les caractéristiques physicochimiques des œufs	83
II.3.2.3 Analyse de la matière fécale des poules	84
II.3.2.4 Effet du probiotique sur le poids des poules, le taux de ponte et la mortalité.....	85
II.3.3 Discussion	87
Conclusion générale	90
Bibliographie	93

Liste des Tableaux

Tableau 1. Liste des probiotiques appliqués ou étudiés pour l'application dans l'alimentation animale	19
Tableau 2. Activité antimicrobienne des surnageants stériles et conditions de culture des souches indicatrices	45
Tableau 3. Identification et caractérisation des souches productrices.....	46
Tableau 4. pH des surnageants après filtration.....	47
Tableau 5. Sensibilité aux antibiotiques des souches sélectionnées avec interprétation	48
Tableau 6. Effet des solvants organiques sur l'activité du surnageant des souches productrices	50
Tableau 7. Effet des enzymes, du pH et de la chaleur sur l'activité des bactériocines semi-purifiées	51
Tableau 8. Test d'activité croisée des souches sélectionnées et quelques souches productrices de microcines	52
Tableau 9. Les concentrations minimales inhibitrices de la microcine V purifiée par rapport à la microcine J25 et la colistine sulfate.....	56
Tableau 10. Bilan de purification de la microcine V produite par Escherichia coli P2C	57
Tableau 11. Composition et teneur en nutriments du régime basal fourni aux poules pondeuses	78
Tableau 12. Effets sur les mensurations des œufs.....	82
Tableau 13. Paramètres de qualité des œufs issus des deux lots.....	83
Tableau 14. Caractéristiques physicochimiques des œufs issus des lots témoin et expérimental	84
Tableau 15. pH et dénombrement des entérobactéries de la matière fécale des poules.....	84

Liste des figures

Figure 1. Spirale de la résistance de Carlet.....	6
Figure 2. Diaphonie entre les bactéries probiotiques et la muqueuse intestinale.....	12
Figure 3. Organisation génétique des grappes de gènes de la microcine V.....	28
Figure 4. Séquences de la MccV mature.....	28
Figure 5. Répartition spatiale de la composition microbienne par embranchement le long du tractus gastro-intestinal de poulet.....	32
Figure 6. Les mécanismes par lesquels la production de bactériocines pourrait contribuer à la fonctionnalité probiotique.....	34
Figure 7. Etapes de séparation sur colonne Sep-pak.....	41
Figure 8. Purification de la substance active.....	42
Figure 9. Courbes de croissance cellulaire de souches inhibitrices, et leur production de substance inhibitrice.....	49
Figure 10. Activité antimicrobienne des souches productrices de bactériocines contre E.coli ATCC 35695.....	53
Figure 11. L'analyse par HPLC en phase inverse de la microcine.....	54
Figure 12. Détermination de la CMI de la Microcine V contre E.coli ATCC 35695 (nM).....	55
Figure 13. Action inhibitrice de la microcine V contre Escherichia coli ATCC 35695.....	65
Figure 14. Réduction de l'activité de la microcine V en présence de LPS par rapport au sulfate de colistine.....	66
Figure 15. Variations d'intensité de fluorescence de DiSC3 (5) dans une suspension de cellules suite au traitement par la microcine V et la colistine sulfate.....	67
Figure 16. Profil HPLC analytique de la Microcine V marquée et non par la Fluorescéine Isothiocyanate.....	68
Figure 17. Images de microscopie à fluorescence d'E. Coli ATCC 35695 qui a réagi au peptide marqué par la FITC.....	69
Figure 18. Aspect des cellules d'E.coli sous microscope électronique à transmission.....	70
Figure 19. Résultats de l'essai de retardation de la migration d'ADN par la microcine V sur gel d'agarose.....	71
Figure 20. Activité hémolytique de la microcine V et la microcine J25.....	72
Figure 21. Variation du poids des poules durant les 18 semaines.....	85
Figure 22. Evolution du taux de ponte dans les deux lots.....	86
Figure 23. Taux de mortalité dans les deux lots durant les 18 semaines d'expérience.....	86

Résumé

Les bactériocines sont un groupe abondant et diversifié de peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique, produits par des bactéries et des archées. La production de ces substances a été considérée comme un trait important dans le choix des bactéries probiotiques.

Cette thèse avait pour objectif d'isoler des souches potentiellement probiotiques avec une forte activité bactériocinogène.

Dans le premier chapitre de la partie expérimentale, nous avons criblé l'activité antimicrobienne de plusieurs souches provenant du tractus gastro-intestinal du porc et du poulet dont deux souches ont été sélectionnées. Une souche désignée *Escherichia coli* P2C était la plus efficiente, et la bactériocine produite par cette souche a fait l'objet d'une purification par RP-HPLC et d'une caractérisation, ensuite elle a été identifiée par LCMS/MS comme étant la microcine V.

Le deuxième chapitre a été consacré à l'étude du mode d'action de la microcine V purifiée avec l'utilisation des techniques récentes de biologie moléculaire et cellulaire, ce qui a montré qu'en plus de son activité sur la membrane cellulaire, elle a aussi un effet intracellulaire contre la bactérie cible.

La deuxième souche sélectionnée nommée *Lactobacillus plantarum* J34 a été exploitée dans le troisième chapitre du travail par une étude *in vivo* sur des poules pondeuses. L'utilisation de la souche a entraîné une prise de poids des poules et une baisse de la production des œufs dans le lot expérimental. La qualité des œufs est restée la même par rapport au témoin avec une amélioration de certains paramètres.

Mots clés :

Bactériocine, probiotique, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, RP-HPLC, Microcine V, Poule pondeuse, Qualité des œufs.

Abstract

Bacteriocins are an abundant and diverse group of ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by bacteria and archaea. The production of these molecules was considered an important trait in the choice of probiotic bacteria.

The aim of this thesis was to isolate potentially probiotic strains with a strong bacteriocinogenic activity.

In our first chapter, we screened the antimicrobial activity of several strains isolated from the pig and chicken gastrointestinal tract, among which two strains were selected. A strain designated *Escherichia coli* P2C was the most efficient, and the bacteriocin produced by this strain was purified by RP-HPLC, characterized, and then identified by LCMS / MS as microcin V.

The second chapter was dedicated to the study of the mode of action of purified microcin V with the use of recent molecular and cellular biology techniques, which showed that in addition to its activity on the cell membrane, it also has an intracellular effect against the target bacteria.

The second selected strain named *Lactobacillus plantarum* J34 was exploited in the third chapter of the work by an *in vivo* study on laying hens. The use of the strain resulted in hens gaining weight and decreasing egg production in the experimental batch. The quality of the eggs remained the same compared to the control with an improvement of certain parameters.

Keywords :

Bacteriocin, probiotic, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, RP-HPLC, Microcin V, Laying hen, Quality of eggs.

المخلص

البكتيريوسين هي مجموعة وفيرة ومتنوعة من الببتيدات المضادة للميكروبات تنتجها البكتيريا بطريقة ريبوزومية. ويُعتبر إنتاج هذه المركبات سمة هامة في اختيار بكتيريا البروبيوتيك.

الهدف من هذه الرسالة هو عزل سلالات بكتيرية جديدة لها خصائص بروبيوتكية جيدة مع نشاط قوي مضاد للبكتريا.

في الباب الأول، قمنا بفحص النشاط المضاد للميكروبات لعدة سلالات معزولة من الجهاز الهضمي للخنزير و الجهاز الهضمي للدجاج و قد تم اختيار سلالتين. كانت السلالة المعيّنة بإسم *Escherichia coli* P2C هي الأكثر كفاءة، وتم تنقية البكتيريوسين التي تنتجها هذه السلالة بطريقة RP-HPLC، ومن ثمّ تحديد تركيبها عن طريق استعمال LCMS/MS بما يُعرف ميكروسين V.

كرّس الباب الثاني لدراسة طريقة عمل الميكروسين المنقاة باستخدام تقنيات البيولوجيا الجزيئية والخلوية الحديثة، والتي أظهرت أنه بالإضافة إلى نشاطها على غشاء الخلية، لديها تأثير داخل الخلايا البكتيرية المستهدفة.

تم استغلال السلالة المختارة الثانية و التي اسمها *Lactobacillus plantarum* J34 في الباب الثالث من العمل من خلال دراسة على الدجاج البيوض. أدى استخدام السلالة إلى زيادة وزن الدجاج وخفض إنتاج البيض في المجموعة التجريبية. كما ظلت نوعية البيض هي نفسها بالمقارنة بالدجاج الشاهد مع تحسّن بعض المعايير.

الكلمات المفتاحية:

بكتيريوسين، بروبيوتيك، *Escherichia coli*، *Lactobacillus plantarum*، RP-HPLC، ميكروسين V، الدجاج البيوض، جودة البيض.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES LIEES A LA THESE

PUBLICATIONS

Mohammed Tahar Boubezari ^{1,2§}, Tayeb Idoui ², Ryadh Hammami^{1,3}, Benoît Fernandez ¹, Ahmed Gomaa ¹ and Ismail Fliss. Bacteriocinogenic properties of *Escherichia coli* P2C isolated from gastrointestinal tract of pig: Purification and characterization of microcin V.

Boubezari MT, Hammami R, Idoui T and Fliss I. Microcin V has an intracellular effect on *Escherichia coli* (En cours de rédaction).

COMMUNICATION DANS LES CONFERENCES

Boubezari MT, Hammami R, Idoui T and Fliss I. Caractérisation et purification d'une bactériocine produite par E.coli O15 isolée du tractus digestif du porc. VI Symposium international de la recherche avicole, Constantine, Algérie, 2016.

Boubezari MT, Hammami R, Fernandez B, Idoui T and Fliss I. Criblage du potentiel bactériocinogène de souches isolées du tractus digestif du porc et du poulet et caractérisation d'une nouvelle bactériocine. Symposium sur les alternatives aux antibiotiques en production animale, Sherbrooke, Québec, Canada, 2016.

Boubezari MT, Khennouf T and Idoui T. Pouvoir bactériocinogène de *Lactobacillus plantarum* isolé du tractus digestif du poulet fermier. 20^{èmes} journées nationales de microbiologie, Jijel, Algérie, 2014.

Boubezari MT, Khennouf T and Idoui T. Optimisation et test de croissance de quelques souches de bactéries lactiques sur différents milieux. 20^{èmes} journées nationales de microbiologie, Jijel, Algérie, 2014.

Boubezari MT and Idoui T. Aptitudes probiotiques des lactobacilles du jabot. 19^{èmes} journées nationales de microbiologie, Ouargla, Algérie, 2013.

Boubezari MT and Idoui T. Approche d'identification de quelques bactéries lactiques par la chromatographie gazeuse. 3^{ème} congrès maghrébin sur les toxi infections alimentaires, Constantine, Algérie, 2013.

Boubezari MT and Idoui T. Etude comparative de la qualité physicochimique et microbiologique des œufs de la souche ISA 15 et de la souche *Gallus gallus domesticus*. 6^{ème} séminaire international de médecine vétérinaire, Constantine, Algérie, 2012.

Avant-propos

Cette thèse de doctorat est le fruit de six ans de travail. Etant maître assistant à l'Université de Jijel, mon temps était partagé entre la pédagogie et la recherche. Cette thèse est répartie en quatre chapitres, dont le premier est une synthèse bibliographique et les trois autres sont des résultats de recherches et qui font l'objet d'articles scientifiques.

Le chapitre deux s'est porté sur la sélection de nouvelles souches probiotiques et la purification de la microcine V à partir d'une souche nommée *Escherichia Coli* P2C a été réalisé dans les locaux de l'Université Laval, sous la direction du Pr Ismail Fliss et l'encadrement du Dr Riadh Hammami. Dans ce travail, les souches utilisées sont de trois origines : Certaines sont isolées du porc par Luca Lo Verso post doctorant à l'unité de Pr Fliss, d'autres sont isolées du poulet par Nour Ben Abdallah étudiante à la maîtrise à l'université Laval, et une partie a été isolée par moi-même aux laboratoires de l'Université de Jijel sous la direction du Pr Idoui. Benoît Fernandez m'a donné toute l'aide nécessaire pour la réalisation des tests microbiologiques et de biologie moléculaire. L'article traitant ce chapitre a été rédigé par moi-même et corrigé en premier lieu par Dr Ahmed Gomaa et ensuite par Dr Riadh Hammami.

Le troisième chapitre s'est intéressé à l'étude du mode d'action de la microcine V en utilisant des techniques récentes de biologie cellulaire et moléculaire a été réalisé dans les locaux de l'Université Laval, sous la direction du Pr Fliss et l'encadrement du Dr Riadh Hammami. La réalisation des expériences et le traitement des résultats ont été réalisés par mes soins. Ce chapitre sera publié dans un article qui est actuellement sous rédaction.

Le quatrième chapitre qui traite l'application de la souche *Lactobacillus plantarum* J34 aux poules pondeuses a été réalisé conjointement dans un élevage de la région de l'Emir Abdelkader, Jijel et aux laboratoires de l'Université de Jijel, sous la direction du Pr Idoui. Les travaux sur terrain et la collecte des données ont été réalisés par moi-même Des étudiantes au cycle d'ingénieur en contrôle de qualité m'ont aidé aux analyses de laboratoire.

Introduction générale

L'utilisation d'antibiotiques en aviculture a d'abord été introduite dans les années 1940 pour améliorer la croissance et l'efficacité alimentaire ainsi que pour réduire la mortalité [1]. Par conséquent, l'ajout d'antibiotiques en tant que promoteurs de croissance dans les aliments pour la volaille est devenu une pratique courante. Les mécanismes d'action de la promotion de la croissance induite par les antibiotiques sont étroitement liés à la réduction des bactéries pathogènes dans le tube digestif. Cependant, la concentration d'antibiotiques utilisés pour la promotion de la croissance est souvent inférieure à la concentration utilisée pour le traitement et la prophylaxie, qui est communément appelée «concentration sous-thérapeutique»[2].

L'Organisation Mondiale de la Santé, l'Association Médicale Américaine, et l'Association Américaine de la Santé Publique ont demandé une interdiction des antibiotiques promoteurs de la croissance (APC), arguant que leur utilisation entraîne une augmentation du nombre des germes résistants aux antibiotiques humains [3]. Plusieurs pays ont interdit l'utilisation des APC dans leurs élevages dont l'Algérie comme décrit à l'article 4 de la décision ministérielle N°472 du 24 décembre 2006 : « *Les substances médicamenteuses considérées comme additifs, appartenant au groupe des antibiotiques, sont interdites d'utilisation dans l'alimentation animale* ».

Cependant, l'interdiction de l'utilisation des antibiotiques dans les aliments a entraîné des effets imprévus sur la production animale [4], comme l'augmentation des infections et la diminution de la production animale. Pour surmonter le taux accru de mortalité et de morbidité en raison de l'interdiction d'usage des antibiotiques, un certain nombre d'alternatives / remplacements ont été proposés [5]. Ce sont des vaccins antibactériens, des agents immunomodulateurs, des bactériophages et leurs lysines, des peptides antimicrobiens (PAM), des prébiotiques et probiotiques ou des symbiotiques, des extraits de plantes, des inhibiteurs de la détection bactérienne de quorum sensing (QS) et des enzymes alimentaires, etc [6].

Les derniers rapports ont indiqué que la supplémentation probiotique chez les animaux semble être une meilleure alternative à l'utilisation des antibiotiques pour lutter contre les pertes économiques dans les élevages [7]. Les probiotiques sont classés par la Food and Drug Administration en tant que généralement reconnus comme des ingrédients sûrs (GRAS)[7]. Parmi les diverses bactéries probiotiques, *Lactobacillus* est le genre des probiotiques le plus utilisé [8]. Les lactobacilles sont des bactéries gram-positives, non mobiles, non sporulés, avec une bonne tolérance à l'acide, et qui

produisent l'acide lactique comme principal produit métabolique final de la fermentation glucidique [9]. Dans les animaux de ferme, ils confèrent une bonne santé intestinale en stimulant la croissance d'un microbiote sain [10]. Plusieurs paramètres sont nécessaires pour l'évaluation du potentiel d'un probiotique, comme la résistance à l'acidité gastrique et à la toxicité biliaire, l'adhésion au tissu épithélial intestinal, la capacité de coloniser le tractus gastro-intestinal, mais surtout la production de substances antimicrobiennes. Parmi ces substances, il y a les bactériocines.

Les bactériocines sont des peptides produits par les bactéries, actives contre d'autres bactéries dont le producteur a un mécanisme d'immunité spécifique contre elles [11, 12]. Elles sont produites par toutes les lignées majeures de bactéries et d'archées et constituent un groupe hétérogène de peptides en fonction de la taille, de la structure, du mode d'action, de la puissance antimicrobienne, des mécanismes d'immunité et des récepteurs cellulaires cibles [13].

Dans ce travail, nous nous sommes orientés vers les souches bactériennes qui ont une forte activité bactériocinogénique, car c'est le point le plus important du choix. Donc nous avons tracé l'objectif en prenant comme point de départ l'isolement et l'identification de souches bactériennes à partir du jabot de poulet et le tractus gastro-intestinal du porc, screening de l'activité antibactérienne pour la recherche d'une nouvelle bactériocine, puis purifier et caractériser cette bactériocine. Ensuite, étudier le mode d'action de la bactériocine purifiée et déterminer sa concentration minimale inhibitrice ainsi que son spectre d'action. Puis enfin, faire des essais *in vivo* pour évaluer l'activité probiotique de la souche isolée sur les poules et sur la qualité de la production (cas de la poule pondeuse et la qualité des œufs).

I. Partie 1

Synthèse bibliographique

Guide de lecture :

Dans cette première partie, nous menons une étude bibliographique sur les antibiotiques promoteurs de croissance, décrire leurs bienfaits et leurs dangers lors de l'utilisation dans l'élevage de la volaille. Ensuite nous faisons une petite synthèse sur leurs alternatives possibles, et terminer par donner un bref aperçu sur les probiotiques et les bactériocines.

I.1 Antibiotiques promoteurs de croissance

I.1.1 Utilisation des APC chez la volaille

Les effets des antibiotiques promoteurs de la croissance sur le poulet de chair ont d'abord été mis en évidence par Moore et al. [14], ces auteurs ont montré que les poussins ayant reçu la streptomycine avaient une croissance accrue par rapport à leurs congénères témoins [14]. Comme la promotion de la croissance des volailles par les antibiotiques a été évidente, la FDA (Food and Drug Administration) aux États-Unis a autorisé l'utilisation de ces derniers à des doses non-thérapeutiques pour la promotion de la croissance dans l'alimentation animale depuis 1951 [15, 16]. Les antibiotiques promoteurs de la croissance ont aidé l'industrie avicole à produire des poulets de chair en bonne santé tout en réduisant les coûts des traitements thérapeutiques et les pertes économiques dus à la mortalité importante [17]. Au moment que les APC favorisent la croissance des animaux d'élevage, ils sont également connus pour sélectionner des variants de microorganismes résistants aux antibiotiques. Les coliformes ont montré un pouvoir de muter et devenir résistants chez la volaille où la streptomycine a été administrée [18, 19]. La crainte que les bactéries à l'origine des infections deviennent plus résistantes au traitement a abouti à l'interdiction des APC en Europe [20]. En outre, des souches pathogènes résistantes d'origine humaine ont été mises au point en raison de l'utilisation des APC durant les 50 dernières années [2]. Ces souches pathogènes sont plus difficiles à traiter du fait qu'elles sont actuellement très résistantes à une gamme d'antibiotiques et les patients doivent subir des traitements antibiotiques pour des périodes plus longues afin d'assurer la destruction de l'agent pathogène [2].

I.1.2 Les antibiotiques dans la promotion de la croissance

Le microbiote gastro-intestinal est soupçonné de diminuer les performances de l'hôte par absorption intestinale des nutriments, la concurrence directe pour les éléments nutritifs avec l'hôte, la production de métabolites qui affectent la croissance, et par induction d'infections subcliniques [21, 22]. Il a été démontré que les APC modifient le microbiote gastro-intestinal des animaux d'élevage [23, 24], ce qui réduit son effet négatif sur la performance de l'hôte. Lorsque les APC arrivent au niveau de l'intestin, la disponibilité des nutriments augmente. On croit que les antibiotiques diminuent également la population microbienne totale, ce qui induit l'amincissement de l'intestin grêle, et une augmentation de l'épaisseur de la muqueuse. La réduction des agents

pathogènes et leurs antimétabolites mènent à une meilleure absorption des nutriments, ce qui améliore la croissance des animaux d'élevage [2, 25].

La colonisation de la volaille par des agents pathogènes, y compris *Clostridium perfringens* est connue pour abaisser les taux de croissance chez les poulets en réduisant la productivité globale des poulets de chair [26]. L'inflammation en réponse à l'infection subclinique par *C. perfringens* par exemple provoque la libération d'hormones cataboliques, ce qui entraîne une réduction de la masse musculaire [27]. Les APC réduisent les populations de pathogènes avec peu d'impact sur les bactéries commensales, réduisant la baisse de croissance due à une infection subclinique [28].

I.1.3 Les résistances aux antibiotiques

Après une période de forte efficacité contre les maladies infectieuses, les antibiotiques deviennent de moins en moins efficaces face à certaines infections bactériennes. Déjà en 1940, juste après la découverte de la pénicilline, une résistance à cet antibiotique chez *Escherichia coli* a été mise en évidence par Abraham et Chain [29]. Les bactéries s'adaptent aux antibiotiques et deviennent résistantes. Deux types de résistance bactérienne se présentent. La résistance naturelle et celle acquise.

I.1.3.1 La résistance bactérienne naturelle

Les molécules naturelles d'antibiotiques sont synthétisées par la plupart des microorganismes pour éliminer d'autres micro-organismes dans un environnement donné. Ces molécules peuvent ne pas être actives sur toutes les bactéries. On dira que ces bactéries ont une résistance naturelle vis-à-vis de cette molécule. La résistance naturelle à un antibiotique donné est un caractère présent chez toutes les souches de la même espèce [30].

I.1.3.2 La résistance bactérienne acquise

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique. C'est l'acquisition d'un facteur génétique qui se traduit par une réduction de la sensibilité à la molécule qui lui était fatale. Elle peut donc se faire soit par mutation chromosomique soit par acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme [31].

I.1.4 Impact de la consommation des antibiotiques

L'utilisation inadéquate des antibiotiques peut contribuer fortement à la mise en place des bactéries pathogènes résistantes dans un environnement donné. Ce constat a amené à identifier des actes inappropriés qui favorisent ces événements. Ces actes sont en général liés à l'emploi non approprié de ces molécules antimicrobiennes. Le premier concerne la consommation accrue et inappropriée des antibiotiques. On note l'existence d'un paradoxe, plus les antibiotiques sont utilisés, plus ils perdent leur efficacité. Leur utilisation excessive est identifiée comme contribuant à la mise en place des bactéries résistantes en particulier par utilisation non conforme [32].

Selon la spirale de la résistance décrite par Carlet et collaborateurs [33](figure 1), l'apparition de formes résistantes ou multirésistantes de bactéries suscite une certaine inquiétude chez les cliniciens et chercheurs. Cette inquiétude induit une réaction au niveau des industries pharmaceutiques pour développer de nouveaux antibiotiques efficaces sur la nouvelle forme bactérienne résistante. L'utilisation constante de cette nouvelle molécule induira systématiquement de nouvelles formes de résistance d'où une nouvelle inquiétude [33].

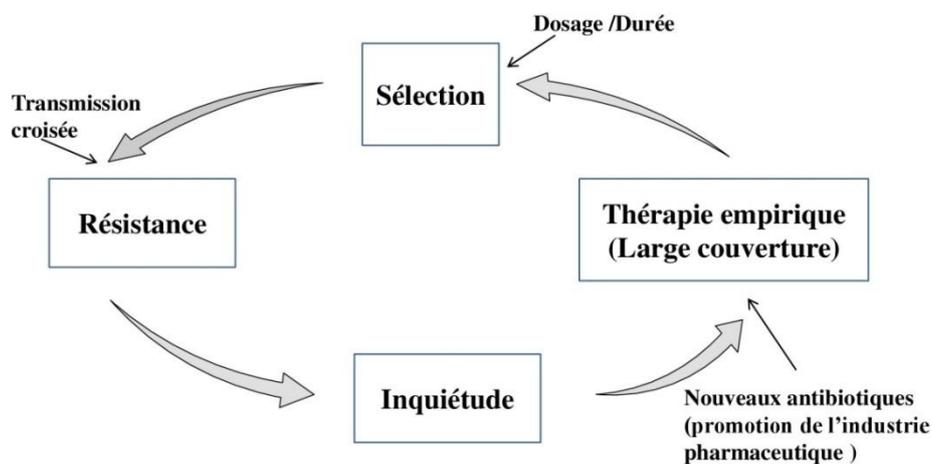


Figure 1.Spirale de la résistance de Carlet et al. [33]

I.1.5 L'interdiction de l'utilisation des antibiotiques promoteurs de croissance en production animale

Džidic et al. [34] ont rapporté des preuves à l'appui du fait que les bactéries résistantes aux antibiotiques provenant d'animaux comme les porcs et les volailles entrent dans la chaîne alimentaire humaine et finissent par coloniser les voies digestives et transposer les gènes de

résistance dans la microflore intestinale. Le Royaume-Uni a été le premier à interdire l'utilisation d'antibiotiques dans la production animale en 1970, en interdisant l'utilisation de la pénicilline et de la tétracycline comme facteurs de croissance [35], suivi de la Suède, du Danemark et de l'Union européenne [2] respectivement. Dibner et Richards [2] et Vondruskova et al. [36] ont expliqué, qu'avec la sensibilisation actuelle des consommateurs sur la salubrité des aliments et leur impact sur la santé, il est très probable que d'autres parties du monde interdisent l'utilisation de tous APC et donc la nécessité d'étudier et de trouver la meilleure alternative aux APC qui seront également sûrs dans la chaîne alimentaire.

I.2 Alternatives aux antibiotiques promoteurs de croissance

L'impact de la suppression progressive des promoteurs de croissance animale pourrait être minimisé, à condition qu'une attention suffisante soit accordée à la mise en œuvre de stratégies alternatives de prévention des maladies et de facteurs de gestion tels que les pratiques d'élevage dans la production animale. En effet, les problèmes globaux de maladie et de performance ont été plutôt limités, en partie parce que les anticonvulsivants ionophores sont encore disponibles, l'utilisation d'antibiotiques thérapeutiques (par exemple, les macrolides et les pénicillines) a augmenté et les alternatives pour les APC ont été empiriquement utilisées de sorte que celles qui ont les meilleurs effets sur la performance sont actuellement utilisées comme additifs pour l'alimentation animale [37].

I.2.1 Caractéristiques des bonnes alternatives des APC

Idéalement, les alternatives aux promoteurs de croissance devraient avoir le même effet bénéfique. Cependant, il n'est pas tout à fait clair comment les APC exercent leur action bénéfique. Le mécanisme le plus connu à proposer est que les APC ont une action antibactérienne qui favorise les performances de différentes façons: (1) en réduisant l'incidence et la sévérité des infections infracliniques [38, 39] ; (2) en réduisant l'utilisation microbienne des éléments nutritifs [40] ; (3) en améliorant l'absorption des nutriments en raison de l'amincissement de la paroi intestinale, et (4) en réduisant la quantité de métabolites déprimant la croissance produits par les bactéries Gram positives [41, 42]. La base de cette explication mécaniste est que les APC n'exercent pas d'effets favorisant la croissance chez les animaux axéniques [43].

Quel que soit le mécanisme d'action des APC, la principale caractéristique d'une bonne alternative du point de vue pratique est qu'elle doit améliorer les performances au moins aussi bien que les

APC. Sur la base du mécanisme d'action proposé des APC, les composés modulant les populations microbiennes et les composés immunomodulateurs pourraient présenter un potentiel. Il existe de nombreuses façons possibles pour que les composés modulant le microbiote puissent influencer sur la population du microbiote intestinale sans ajouter d'APC à l'alimentation. La méthode la plus évidente est l'utilisation de doses thérapeutiques d'antibiotiques sous prescription, une pratique qui va sans aucun doute augmenter et (ironiquement) probablement augmenter l'émergence de pathogènes humains résistants. Aucune des alternatives non APC proposées ci-dessous n'est susceptible de compenser complètement la perte d'APC. Il convient de souligner que certaines stratégies ne contribueront qu'à compenser les APC partiellement, et travailleront par des mécanismes indirects. La liste n'est en aucun cas exhaustive et il y a aussi d'autres produits prétendant être de valeur dans les régimes sans APC [37].

I.2.2 Polysaccharides et enzymes exogènes

Les polysaccharides non amylacés (PNA) dans les aliments pour animaux sont un ensemble complexe de composants qui diffèrent largement en composition chimique, en propriétés physiques et en activité physiologique, dont beaucoup ont des effets négatifs sur la croissance et les performances. Les PNA comprennent les (hémi) celluloses, les pectines et les oligosaccharides, ainsi que les arabinoxylanes et les β -glucanes (consistant soit en une fraction plus soluble, soit en une fraction non soluble) [44].

Les enzymes alimentaires-PNA travaillent en réduisant la viscosité du digesta dans l'intestin grêle, de sorte que le passage du digesta et la vitesse de digestion des nutriments augmentent en fournissant moins de substrat et moins de temps pour que les organismes de fermentation prolifèrent. Cela peut restaurer la digestion enzymatique endogène normale et efficace des nutriments dans l'intestin grêle [45]. En outre, les enzymes dégradant les PNA réduiront également la prolifération de bactéries pathogènes telles que *Clostridium perfringens* [46].

I.2.3 Acides organiques

Il a été montré que les acides organiques ont des effets bénéfiques sur les performances de croissance de la volaille. Certains (par exemple l'acide butyrique) diminuent également l'incidence de l'entérite nécrotique subclinique causée par *C. perfringens*, un effet bénéfique supplémentaire très pertinent pour l'industrie de la volaille [47]. Les acides organiques sont largement répartis dans la nature en tant que constituants normaux de plantes ou de tissus

animaux. Ils sont également formés par fermentation microbienne de glucides principalement dans les cæca de la volaille [48].

Le mécanisme d'action des acides organiques reflète probablement leur nature antibactérienne, telle que la diminution du pH de l'eau potable et la réduction de la capacité tampon de l'aliment, avec un effet ultérieur sur la physiologie du jabot et du proventricule [49, 50]. La capacité des acides organiques de passer de la forme non dissociée à la forme dissociée (selon le pH de l'environnement) augmente leur effet antimicrobien. Lorsque l'acide est sous forme non dissociée, il peut se diffuser librement à travers la membrane semi-perméable des micro-organismes dans le cytoplasme cellulaire [50, 51]. Une fois dans la cellule, où le pH est maintenu près de 7, l'acide se dissocie et supprime les enzymes cellulaires bactériennes (par exemple les décarboxylases et les catalases) et les systèmes de transport des nutriments.

I.2.4 Herbes et huiles essentielles

De nombreuses plantes ont des propriétés multifonctionnelles bénéfiques dérivées de leurs composants bio-actifs spécifiques. Les constituants biologiquement actifs des plantes sont principalement des métabolites secondaires tels que les terpénoïdes (mono- et sesquiterpènes, stéroïdes, etc.), les phénols (tannins), les glycosides et les alcaloïdes (présents comme alcools, aldéhydes, cétones, esters, éthers, lactones, etc) [52].

En raison d'une «synergie» possible entre les constituants, il reste peu clair quelles composantes des produits oléoriques éthériques peuvent stimuler les enzymes digestives endogènes, agir comme un antioxydant, un agent antimicrobien ou un immunomodulateur. Il existe des données expérimentales montrant les effets antimicrobiens *in vitro* avec les valeurs respectives de la CMI et le spectre d'activité [52, 53]. Selon Adams [54], l'activité antimicrobienne est plutôt faible pour le gingembre et le poivre, le cumin (p-cymène), la coriandre (lialol), l'origan (carvacrol), le romarin (cinéol), le saule (cinéol) et le thymol ; et forte pour le clou de girofle (eugenol), la moutarde (allylisothiocyanate), la cannelle (cinnamaldehyde) et l'ail (allicine).

I.2.5 Prébiotiques

Les prébiotiques peuvent être définis comme des ingrédients alimentaires non digestibles avec des effets sélectifs sur le microbiote intestinal. Les oligosaccharides sont les composants principaux et la gamme est diverse et peut être basée sur n'importe lequel des monosaccharides d'hexose, y compris le glucose, le fructose, le galactose et le mannose [55] avec un degré de polymérisation

compris entre 2 et 20 monosaccharides. Les légumineuses à grains sont les sources naturelles les plus courantes d'oligosaccharides, présentes sous forme de raffinose, de stachyose et de verbascose. Les oligosaccharides «synthétiques» sont dérivés de la polymérisation directe des disaccharides ou du fractionnement des cellules végétales et microbiennes. Des oligosaccharides tels que l'arabinogalactose, l'arabinoxylane et le rhamnogalacturonose sont dérivés de polysaccharides de soja (avec environ 3-5% de galacto-oligosaccharides), de blé et de fruits, respectivement [56, 57].

Le mécanisme d'action des prébiotiques en tant que substituants d'APC dépend de la nature du composé. Ce sont des ingrédients alimentaires non digestibles qui peuvent avoir une action bénéfique en raison de la stimulation sélective de la croissance ou de l'activité métabolique d'un nombre limité d'espèces de microbiote intestinal telles que Bifidobacteria et *Lactobacillus* spp. Ainsi, ils peuvent avoir un mécanisme d'action similaire à celui des probiotiques [58].

I.2.6 Les probiotiques

Micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, confèrent un avantage sanitaire à l'hôte [59].

I.2.6.1 Caractéristiques d'un probiotique idéal

Un probiotique idéal devrait avoir les caractéristiques suivantes [60-63] :

- Capacité d'exercer des effets bénéfiques sur l'animal hôte, à savoir l'augmentation de la croissance ou résistance aux maladies ;
- Non pathogène et non toxique pour les animaux et les humains ;
- Être présent en tant que cellules viables, de préférence en grand nombre bien que la dose efficace minimale ne soit pas entièrement définie ;
- Aptitude à supporter le traitement et le stockage ;
- Haute tolérance à la bile et à l'acide gastrique (pH bas) ;
- Capacité à adhérer à l'épithélium ou au mucus ;
- Persistance dans les voies intestinales ;
- Capacité à moduler la réponse immunitaire ;
- Capacité à produire des composés inhibiteurs ;
- Capacité à modifier l'activité microbienne.

1.2.6.2 Mode d'action des probiotiques

Les effets bénéfiques des probiotiques peuvent être médiés par des effets antagonistes directs contre des microorganismes, entraînant une diminution du nombre ou un effet sur leur métabolisme ou par synthèse de certains nutriments essentiels ou par stimulation de l'immunité [64].

Le mode d'action des probiotiques (figure 02) a été proposé et discuté par de nombreux chercheurs [64-67].

- Suppression des pathogènes [64, 65] :
 - Par la production de composés antibactériens
 - Les substances antibactériennes comme la lactocidine, l'acidophiline, les acides organiques et les bactériocines ;
 - Production de peroxyde d'hydrogène.
 - Par exclusion compétitive
 - Compétition sur les sites d'adhérence ;
 - Compétition pour les nutriments. Les bactéries pathogènes et non pathogènes sont habituellement en compétition pour obtenir des nutriments. Les bactéries non pathogènes ont généralement un pouvoir compétitif élevé et ainsi colonisent mieux l'intestin.
- Modification du métabolisme microbien [66, 67] :
 - Par augmentation de l'activité des enzymes digestives comme la β -galactosidase, α -amylase, etc. qui aident à la digestion de divers glucides, graisses et protéines et absorption de nutriments ;
 - Par diminution de l'activité enzymatique bactérienne, par ex la glucoronidase, la nitroréductase et l'azoreductase, qui sont produites par certaines bactéries pathogènes ;
 - En diminuant la production d'ammoniac.
- Stimulation du système immunitaire, rendant les hôtes moins vulnérables à la maladie [64, 67] :
 - En augmentant le niveau d'anticorps ;
 - En augmentant l'activité des macrophages ;
 - En améliorant la production d'immunoglobuline-IgA, IgM et IgG ainsi que les cytokines.

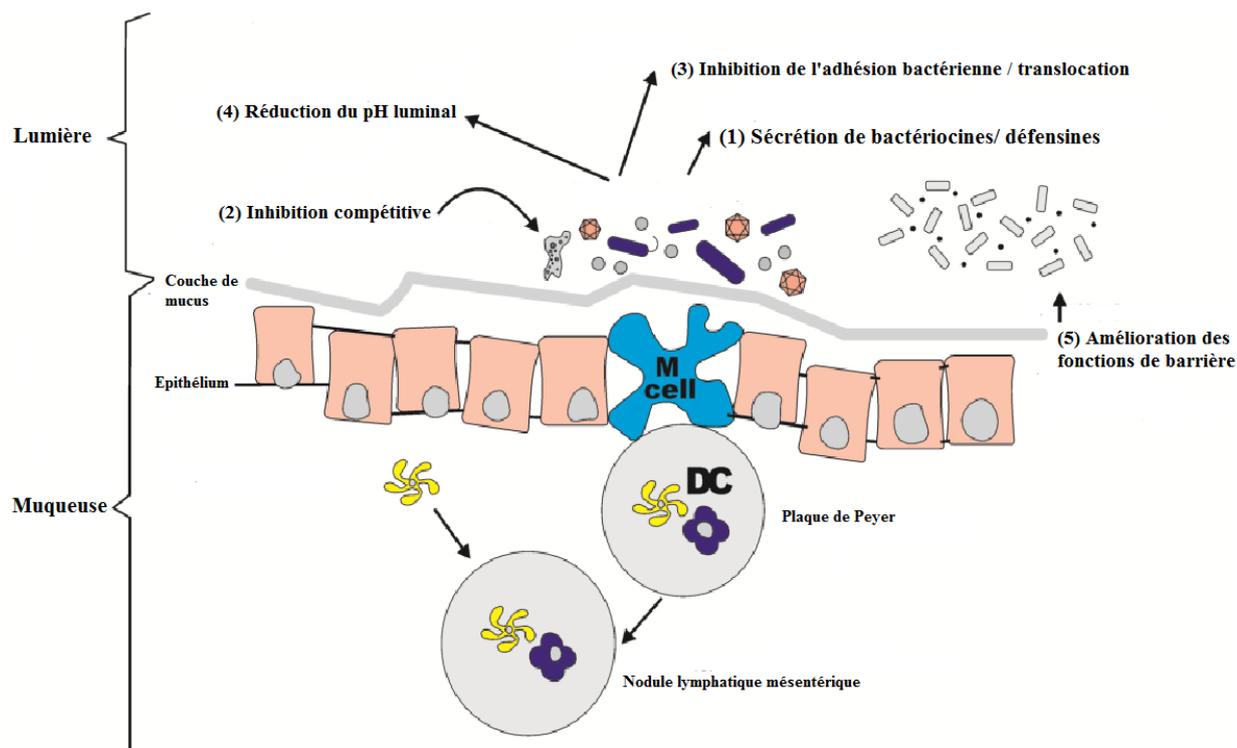


Figure 2. La diapasonie entre les bactéries probiotiques et la muqueuse intestinale [68].

Les activités antimicrobiennes des probiotiques comprennent (1) la production de bactériocines / défenses, (2) l'inhibition compétitive des bactéries pathogènes, (3) l'inhibition de l'adhérence ou la translocation bactérienne, et (4) la réduction du pH luminal. Les bactéries probiotiques peuvent également améliorer la fonction de barrière intestinale par (5) l'augmentation de la production de mucus[68].

1.2.6.3 Les probiotiques en aviculture

Les probiotiques en aviculture ont deux rôles principaux, déjà pour remplacer les organismes bénéfiques qui ne sont pas présents dans les voies digestives, et pour fournir au poulet les effets d'organismes bénéfiques [65].

De tels organismes bénéfiques peuvent être absents, peut-être parce que les méthodes actuelles d'élevage empêchent le contact entre les poussins nouvellement éclos et leurs parents, empêchant un transfert vertical rapide de micro-organismes bénéfiques ou par des pratiques de gestion qui peuvent perturber la microflore intestinale. Selon Barrow [69], il existe deux grands groupes de préparations probiotiques basés sur leur site d'action: ceux qui sont principalement destinés à être efficaces dans le jabot et les régions antérieures de l'appareil digestif et ceux dont les effets sont dirigés vers les cæca. Cependant, il est probable que les deux types de préparation sont dans une certaine mesure, efficaces dans l'intestin.

I.2.6.3.1 Effets sur la croissance

Plusieurs études [66, 70-73] ont démontré une augmentation du gain de poids vif chez les poussins ayant reçu un aliment aux probiotiques. D'autre part, Lan et al. [74] ont observé des gains de poids plus élevés ($P < 0,01$) chez les poulets de chair alimentés avec un régime supplémenté de deux espèces probiotiques. Shareef et Dabbagh [75] ont indiqué que la supplémentation de l'aliment de poulets de chair en probiotique *Saccharomyces cerevisiae*, à des doses de 1, 1,5 et 2%, avait significativement augmenté le gain de poids corporel, la consommation d'aliments et l'efficacité de la conversion alimentaire. D'autres rapports comme celui de Banday et Risam [76] ont suggéré que la supplémentation en probiotiques améliorait les performances du poulet de chair. Nikpiran et al. [77] ont rapporté que *Saccharomyces cerevisiae* avait des effets positifs sur les performances des cailles japonaises. De même, Zhang et Kim [78] ont obtenu une augmentation globale du gain de poids corporel chez les poulets aux probiotiques multisouches comparativement à ceux du groupe témoin. Mansoub [79] a également trouvé une augmentation significative du poids corporel du poulet de chair ayant reçu *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*. Cependant, certaines études ont montré que la supplémentation probiotique n'améliore pas les performances du poulet [66, 79, 80], tandis que Timmerman et al. [81] ont trouvé des résultats incohérents, peut-être en raison du type d'ingrédients alimentaires qui peuvent affecter la croissance des probiotiques ou l'activité de leurs métabolites. Par ailleurs, Yousefi et Karkoodi [82] ont constaté que les changements de poids corporel n'étaient pas significativement différents entre les groupes expérimentaux et que le taux de conversion alimentaire n'était pas affecté par la supplémentation probiotique. Un travail réalisé à Jijel (Algérie) par Idoui et al. [83] ayant supplémenté la ration du poulet de chair par *Lactobacillus plantarum* a montré que les meilleures performances de croissance sont enregistrées avec les sujets à probiotique.

I.2.6.3.2 Effet sur la prise alimentaire et l'efficacité de la conversion des aliments

Naik et al. [84] ont évalué l'effet des probiotiques *Lb. acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* et leur combinaison sur les performances du poulet de chair et ont rapporté que la supplémentation du régime basal par 0,05% de *Lactobacillus* améliorait l'efficacité alimentaire comparativement aux témoins. Safalaoh et al. [85] ont montré que les microorganismes efficaces (probiotiques) améliorent l'efficacité alimentaire du poulet de chair seuls ou avec des antibiotiques, ce qui est plus prononcé à la dose la plus élevée (30g / kg d'aliment). Upendra et Yathiraj [86] ont observé que la supplémentation avec un produit multi-souches encapsulées à 250g / Tonne d'aliment a

abouti à une amélioration du ratio de la conversion alimentaire, qui était de 10,8% supérieure à celui du témoin. Chitra et al. [87] ont signalé que l'ajout de probiotiques et d'acide ascorbique, indépendamment ou simultanément, soit dans l'alimentation, soit dans l'eau potable pour le poulet de chair, avait permis une amélioration significative ($P < 0,01$) de la consommation totale et de l'efficacité alimentaire pendant la saison estivale. Anjum et al. [88] ont obtenu une amélioration significative ($P \leq 0,05$) du taux de conversion alimentaire après la supplémentation de la ration avec un probiotique multi-souches chez le poulet de chair, mais aucune amélioration de l'apport alimentaire n'a été observée.

I.2.6.3.3 Réduction de la mortalité

Shome et al. [89] n'ont obtenu une mortalité chez le poulet de chair à ration supplémenté avec *Lb. acidophilus* et *Lb. salvarius* et un taux de mortalité de 12,7% dans le lot témoin, principalement due aux bactéries entéropathogènes. Upendra et Yatiraj [86] ont enregistré une réduction significative ($P < 0,05$) (54,25%) de la mortalité des poussins lorsque ceux-ci ont été nourris avec des régimes supplémentés par un produit multi-souches. Bhatt et al. [90] ont observé un effet favorable sur la survie des poulets de chair après l'ajout de probiotiques dans l'alimentation. Kaistha et al. [91] ont enregistré une mortalité moindre chez les poulets de chair nourris avec des régimes supplémentés par *Lb. acidophilus*, *Streptococcus uberis* et *Saccharomyces cerevisiae*. De même, Samantha et Biswas [92] ont observé que la mortalité était réduite chez le poulet de chair nourris avec des suppléments probiotiques. Cependant Sabiha et al. [93] ont indiqué que la mortalité n'était pas affectée par la supplémentation de la ration par des probiotiques chez le poulet de chair. En Algérie, un travail mené par Temmim et al. a [94] montré que l'addition de *Pediococcus acidilactici* n'a pas significativement modifié la croissance des poulets mais a permis de réduire le taux de mortalité global.

I.2.6.3.4 Effets sur la production et la qualité des œufs

Beaucoup d'études ont été réalisées dans ce sens. Daneshyar et al. [95] ont indiqué que l'ajout de probiotiques n'a pas eu d'effet significatif sur la production d'œufs et leur taille, mais un effet significatif a été enregistré sur le poids de l'œuf. Le même résultat a été rapporté par Ramasamy et al. [96] ayant utilisés la culture de *Lb. acidophilus*, celle-ci n'a pas influencé la production d'œufs pendant toute la période expérimentale et aucune différence significative n'a été trouvée avec le poids des œufs. Davis et Anderson [97] n'ont également trouvé aucune amélioration significative

dans la production d'œufs chez les poules dont la ration était supplémentée avec un produit commercial contenant des espèces de *Lactobacillus*.

Par ailleurs, Yörük et al. [98] ont rapporté que la production d'œufs chez les souches Hisex Brown à ration supplémentée par des probiotiques contenant *Lb.plantarum*, *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb.acidophilus*, *Lb.rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Aspergillus oryza* et *Candida pintolopesii* était plus importante comparativement au lot témoin. De plus, il y a eu des augmentations linéaires de la production d'œufs avec l'augmentation de la supplémentation en probiotiques (relation dose/réponse).

I.2.6.3.5 Potentiel de l'hypocholestérolémie

A ce sujet assez de travaux ont été réalisés. Mansoub [79] a trouvé que le taux de cholestérol sérique diminuait significativement chez les animaux supplémentés avec les probiotiques à *Lactobacillus* comparativement à celui du groupe contrôle. De même, par comparaison au témoin, il y avait une diminution significative du taux de triglycérides chez les groupes de poulet de chair traités avec *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*. Kurtoglu et al. [99] ont rapporté que les suppléments probiotiques à base de *Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis* ont diminué le cholestérol du jaune d'œuf et le taux de cholestérol sérique dans les hybrides de la souche Brown-Nick.

Par ailleurs, Corcoran et al. [100] ont rapporté que la vitesse de digestion des graisses est liée à la concentration des acides de la vésicule biliaire dans la digestion de latex et par la suite la concentration en lipides. Les probiotiques *Lb. acidophilus* et *Lb.casei* utilisés dans le régime alimentaire ou l'eau provoquent une diminution de la sécrétion des acides biliaires, ce qui a entraîné une diminution de la capacité de la digestion des graisses, donc une diminution du niveau lipidique sanguin [100]. De même, il a été prouvé qu'*in vitro* *Lb. acidophilus* peut absorber le cholestérol et ce phénomène peut diminuer le taux de cholestérol sanguin [101].

I.2.6.4 Facteurs d'efficacité des probiotiques

L'utilisation de probiotiques dans l'alimentation animale pourrait être renforcée par un criblage préalable *in vitro*: l'activité antimicrobienne, la survie dans le tractus gastro-intestinal, les études d'adhésion à la muqueuse intestinale et la sensibilité aux antibiotiques sont parmi les principales propriétés probiotiques qui devraient être analysées pour évaluer la fonctionnalité et la sécurité.

Les méthodes moléculaires avancées, par ex. les puces à ADN, permettra d'améliorer la détection de ces multiples caractéristiques et permet également l'analyse, au niveau génomique, des propriétés phénotypiques et génétiques utiles à la production industrielle [102].

L'activité probiotique pourrait être liée à des genres, espèces ou souches. Une approche dans l'application probiotique pourrait être l'utilisation de mélanges de souches appartenant à différents genres ou espèces [81]. Le moment et la durée de l'administration des probiotiques peuvent être un facteur influant sur l'efficacité. Un autre déterminant peut être l'âge des animaux; au début de la vie, les habitudes de colonisation sont instables et les animaux nouveau-nés sont alors sensibles aux agents pathogènes de l'environnement. La colonisation initiale revêt une grande importance pour l'hôte car les bactéries peuvent moduler l'expression des gènes dans les cellules épithéliales, créant ainsi un habitat favorable pour eux-mêmes [103].

1.2.6.5 Variation de l'efficacité des probiotiques chez la volaille

Il existe un large éventail de micro-organismes utilisés comme probiotiques, avec des variations d'espèces et de souches de la même espèce, et par conséquent, ils présentent des variations dans leur activité métabolique et justifient les variations dans les résultats de leur utilisation. Cependant, d'autres facteurs peuvent justifier les variations dans les résultats de l'utilisation de probiotiques chez les volailles, telles que l'espèce d'origine, la méthode de préparation du probiotique, la survie des microorganismes colonisant dans les conditions du tractus gastro-intestinal, l'environnement où les poules sont élevés, le temps d'application des probiotiques et la voie d'application, l'état immunologique des animaux, la lignée de la volaille évaluée, ainsi que l'âge des poussins et l'utilisation concomitante d'antibiotiques [65].

Fuller [62] a souligné que la spécificité de l'adhésion des lactobacilles (l'un des types de probiotiques les plus utilisés chez la volaille) aux cellules épithéliales est spécifique à l'hôte, et si la colonisation est atteinte, il est essentiel d'administrer des bactéries issues de l'espèce hôte pour laquelle ils sont donnés.

D'autre part, il est intéressant de mentionner qu'il existe des probiotiques présentant de l'efficacité même s'ils n'ont pas été isolés de l'espèce hôte originale. A titre d'exemple, on peut citer les travaux développés par Impey et al. [104] et Schneitz et Nuotio [105] ayant montré que le microbiote naturel du poulet et des dindes fournit une protection réciproque pour les poussins et les dindonneaux.

En ce qui concerne la méthode de préparation des probiotiques, Fuller [106] a rapporté que même la source de glucides utilisée dans le milieu de croissance pendant la préparation du probiotique

peut affecter la capacité du micro-organisme à adhérer à l'épithélium intestinal de la volaille et la capacité d'adhérence peut également changer pendant son cycle de croissance. Par conséquent, même si deux souches sont identiques, la forme par laquelle elles ont été préparées peut entraîner des variations dans les résultats [107].

En outre, pour qu'un micro-organisme soit choisi pour être utilisé comme probiotique, il est nécessaire qu'il puisse surmonter certaines barrières qui seraient nuisibles à sa survie dans le tractus gastro-intestinal. Mills et al. [108] ont rapporté qu'avant que les bactéries probiotiques puissent commencer à remplir leur rôle physiologique dans l'intestin, elles devraient soutenir un certain nombre de tensions pour s'assurer qu'elles atteignent le site cible en nombre suffisant pour élucider leur effet.

Pour être dans un état hautement viable pendant la transformation, le stockage et le transit intestinal, les bactéries passent par des conditions défavorables comprenant la température, l'acidité, la bile, l'exposition au stress osmotique et oxydatif à la fois dans la matrice de production et pendant le transit intestinal [109].

Dans une recherche développée par Dilworth et Day [110], les auteurs ont vérifié que l'effet de la supplémentation avec *Lactobacillus* spp. sur la croissance de la masse corporelle et la conversion alimentaire chez les poulets de chair est significativement plus élevée lorsque les taux de méthionine, de cystine et de lysine dans l'alimentation sont réduits.

Concernant l'âge, Mohan et al. [111] ont constaté que les effets bénéfiques des probiotiques ont été observés au cours de la phase de croissance initiale, avant 28 jours et non après 49 jours d'âge. Certes, au cours des premiers stades de la vie, le microbiote intestinal est dans un état instable et les micro-organismes donnés par voie orale trouvent probablement une niche à occuper [107]. Par conséquent, Siriken et al. [112] ont indiqué que l'existence d'un microbiote intestinal au moment de l'administration ainsi que l'état de santé de l'hôte doivent être pris en considération lorsqu'un probiotique est administré pour la suppression des bactéries pathogènes.

- *Genre Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* (fig.3.3) appartient aux bactéries lactiques (BL), un groupe d'espèces bactériennes Gram-positives, catalase négatives qui sont capables de produire l'acide lactique comme principal produit final de la fermentation des glucides. *Lactobacillus* est un genre bien caractérisé appartenant au phylum des Firmicutes, classe des Bacilli, ordre des Lactobacillales, et famille des *Lactobacillaceae*. Ce sont des bâtonnets non-sporulés gram-positifs qui sont catalase négative, habituellement non-mobile, ou mobiles par des flagelles peritriches. Leur température de

croissance va de 20 à 53 °C, l'optimum étant compris entre 30 et 40 °C et leur pH va de 5,5 à 6,2 [110].

Ce sont des anaérobies aérotolérants, et l'atmosphère microaérophile avec 5 à 10% de CO₂ peut améliorer leur croissance. Le glucose est utilisé de façon homofermentaire ou hétérofermentaire et ils ont des besoins nutritionnels complexes pour les acides aminés, les glucides, les peptides, les dérivés d'acides nucléiques, les vitamines, les sels, les acides gras ou les esters d'acides gras [113]. *Lactobacillus* comprend 113 espèces reconnues et 16 sous-espèces. Le genre *Lactobacillus* est très hétérogène, englobant des espèces présentant une grande variété de propriétés phénotypiques, biochimiques et physiologiques. Cette hétérogénéité peut être vue dans la plage de pourcentage G + C de l'ADN génomique des espèces incluses dans le genre, qui varie de 32 à 54% [114].

I.2.6.6 Méthodes d'administration des probiotiques

Il existe quatre méthodes différentes pour administrer les probiotiques :

I.2.6.6.1 Traitement des oiseaux individuellement

Pratiquement, il existe quatre manières différentes de traiter individuellement les oiseaux [105, 115]:

- Introduire le matériau de traitement dans le jabot par un tube et une seringue ;
- Introduire le matériau de traitement dans le bec en utilisant une seringue hypodermique ;
- Permettre à chaque poussin de boire du bout d'une pipette ;
- Tremper le bec de l'oiseau dans le matériau de traitement, qui est une méthode recommandée d'utiliser au laboratoire.

I.2.6.6.2 Administration via l'eau potable

Cette méthode a été introduite par Rantala [116]. La méthode est efficace en tant que traitement de poussins individuels par gavage même si la première application sur le terrain de la méthode n'a montré qu'une réduction de 11% de l'incidence de *Salmonella typhimurium* var. *copenhagen* [117]. L'application pratique des préparations de probiotiques à travers la première eau potable des poussins à peine éclos pendant que l'aliment est retenu n'est pas toujours optimale. Parfois, certains poussins refusent de boire et la préparation du probiotique se propage de façon inégale parmi le troupeau. La viabilité des organismes anaérobies montre un déclin rapide en particulier dans l'eau chlorée [65].

I.2.6.6.3 Administration dans l'aliment

Les probiotiques classiques comme *Lactobacillus* ou *Streptococcus* donnent rarement des résultats optimaux dans les aliments granulés habituellement donnés aux poulets de chair. Cela semble être

dû au fait que les bactéries lactiques sont détruites partiellement ou totalement au cours du procédé de granulation [118]. La température optimale de viabilité des bactéries lactiques est d'environ 35-38°C [65], tandis que la granulation peut augmenter la température de l'alimentation finie jusqu'à 80°C. Gould et Hurst [119] ont signalé que les spores de *Bacillus* sont bien connues pour pouvoir survivre à des températures élevées. Toyocerin®, probiotique contenant des spores de *Bacillus toyoi*, est un promoteur de croissance potentiel [120].

Tableau 1. Liste des probiotiques appliqués ou étudiés pour l'application dans l'alimentation animale [121]

Genres	Espèces
Bactéries	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis</i> (<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>) <i>B. lactis</i> (<i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>) <i>B. longum</i> (<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>) <i>B. pseudolongum</i> (<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>) <i>B. thermophilum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. amylovorus</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. casei</i> (<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>) <i>Lb. crispatus</i> <i>Lb. farmicinis</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. murinus</i> <i>Lb. plantarum</i> (<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>) <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. rhamnosus</i>

Tableau 1. (Suite)

	<i>Lb. salivarius</i>
	<i>Lb. sobrius (Lb. amylovorus)</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Ln. citreum</i>
	<i>Ln. lactis</i>
	<i>Ln. mesenteroides</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>
	<i>P. pentosaceus</i> subsp. <i>pentosaceus</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. freudenreichii</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. infantarius</i>
	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> var. <i>toyoi</i>
	<i>B. licheniformis</i>
	<i>B. subtilis</i>
Levures	
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	<i>S. boulardii (S. cerevisiae)</i>
	<i>S. pastorianus</i> (synonyme de <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>)
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. fragilis</i>
Champignons	
<i>Aspergillus</i>	<i>A. orizae</i>
	<i>A. niger</i>

I.2.6.6.4 Application aux gouttelettes et à la pulvérisation

Pivnick et Nurmi [122] ont d'abord appliqué la méthode d'administration de probiotiques en utilisant des aérosols. Goren et al. [123] ont développé une méthode d'application par pulvérisation pour traiter des poussins nouvellement éclos, soit dans les éclosiers eux-mêmes, soit dans les boîtes de transport des poussins. Les poussins nouvellement éclos ont été traités avec un homogénat de culture provenant soit du jabot ou de la matière caecale ou un mélange des deux cultures de microorganismes des poules adultes cultivés de manière aérobie et anaérobie.

L'application par pulvérisation de cultures de probiotiques dans les éclosiers suivie par l'administration de l'eau potable à la ferme est très efficace pour le contrôle de *Salmonella* [124]. Schneitz [125] a étudié la méthode d'application automatisée par pulvérisation de probiotiques, une cabine automatisée pour la vaccination contre la bronchite infectieuse a été utilisée.

Par ailleurs, Ghadban [126] a rapporté que l'application par pulvérisation de probiotiques lorsque 50 à 60% des poussins ont été éclos, suivie d'un traitement des poussins par leur première eau potable à la ferme, était une méthode hautement efficace pour contrôler *Salmonella*, *E.coli* et dans l'amélioration de la croissance des poussins traités.

I.2.7 Les bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés ribosomiquement par des bactéries qui sont actives contre d'autres bactéries, et contre lesquelles les souches productrices sont protégées par un système d'immunité dédié. Elles peuvent subir ou non des modifications post-traductionnelles qui leur confèrent des structures et des mécanismes d'action très divers. Il est évident que les producteurs de bactériocines sont très répandus dans la nature. Leur présence fréquente est probablement un reflet de leur importance pour fournir des avantages concurrentiels dans des niches microbiennes complexes [127]. En effet, il a été suggéré que de nombreuses souches produisent seulement des bactériocines dans des environnements surpeuplés et privés de nutrition [128]. Le terme "bactériocine" a d'abord été inventé il y a plus de 50 ans pour décrire le prototype de bactériocine Gram-négative, la colicine [129]. Cependant, la première référence à l'inhibition à médiation par les bactériocines remonte à plus de 130 ans lorsque Pasteur et Joubert [130] ont signalé l'inhibition de *Bacillus anthracis* par des bactéries isolées d'échantillons d'urine. Les bactériocines se divisent en deux groupes : celles produites par des bactéries Gram positives et celles produites par des bactéries Gram négatives :

1.2.7.1 Bactériocines produites par les bactéries Gram positives

La classification des bactériocines à partir de bactéries Gram-positives est compliquée par leur hétérogénéité et donc, comme le nombre de bactériocines Gram positives identifiées a continué d'augmenter, les schémas de classification ont dû évoluer en permanence. La classification présentée ici est revue en 2011 par Rea et al. [131] mais a été proposée avant par Cotter et al. en 2005 [11].

1.2.7.1.1 Classe I: Bactériocines modifiées post-traductionnellement

Traditionnellement, le groupe des bactériocines modifiées après la traduction ne contenait que les lantibiotiques. Cependant, l'identification d'un certain nombre de bactériocines supplémentaires modifiées après la traduction a confondu cette question. En conséquence, Rea et al. [131] ont proposé de diviser la classe I en classe Ia (les lantibiotiques), Ib (les labyrinthopeptines) et Ic (les sactibiotiques) :

a. Classe Ia (Lantibiotiques)

Le terme lantibiotique, dérivé des antibiotiques contenant de la lanthionine, est généralement appliqué aux petits peptides (< 5 kDa; 19-28 acides aminés de longueur), qui subissent d'importantes modifications post-traductionnelles et contiennent de la lanthionine (Lan) et / ou la β -méthyllanthionine, ainsi que d'autres acides aminés inhabituels, le plus souvent, la déshydroalanine (DHA) et la dehydrobutyrine (Dhb) [130].

b. Classe Ib (Labyrinthopeptines)

C'est une nouvelle classe de peptides modifiés post-traductionnellement. Les labyrinthopéptines sont nouvellement identifiées, ainsi nommées en conséquence de leur structure "labyrinthique", se distinguent par la présence de la labionine, un acide aminé carbacyclique, non encore identifié, modifié post-traductionnellement. *Actinomadura namibiensis* produit les labyrinthopéptines A2 et A1 qui sont remarquables en raison de leur activité contre le virus de l'herpès simplex et présentant un potentiel comme agents pour le traitement de la douleur neuropathique [132].

c. Classe Ic (Sactibiotiques)

L'élucidation de la structure de la subtilosine A a créé une énigme intéressante. La subtilosine A, produite par *Bacillus subtilis*, est un peptide cyclique mais diffère significativement de toutes les

autres bactériocines circulaires en ce qu'elle est considérablement plus petite en taille et largement modifiée après la traduction, avec des liaisons croisées formées entre les sulfures de trois résidus cystéine et le carbone a deux phénylalanines et d'une threonine [133, 134].

I.2.7.1.2 Classe II: Bactériocines non modifiées

Le groupe de bactériocines de classe II est un groupe hétérogène de peptides (<10 kDa) constitué de résidus d'acides aminés standards (qui peuvent être liés par des ponts disulfure ou cyclisés aux extrémités N et C) [131].

a. Classe IIa (Bactériocines de type Pédicocine)

Les bactériocines de type pédicocine sont produites par une large gamme de bactéries Gram positives. Ces dernières années, elles ont été reconnues comme ayant un potentiel de conservateurs naturels des aliments et dans d'éventuelles applications biomédicales par leur inhibition des bactéries détériorant / pathogènes telles que *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* et des bactéries formant des spores telles que *Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens* [135].

Il existe 28 bactériocines différentes dans la classe IIa [136]. Une caractéristique qui unit tous les membres est leur spectre étroit d'activité et leur puissance élevée contre *L. monocytogenes*. Ils vont de 55 acides aminés pour l'acidocine A [137] à 37 acides aminés dans le cas de la sakacine G [138] et partagent une région N-terminale conservée contenant les acides aminés YGNGV- X1-C-X2-K / N-X3-X4-C (où X représente un quelconque acide aminé).

b. Classe IIb: Bactériocines à deux peptides non modifiées

Il existe actuellement 16 bactériocines à deux peptides non modifiées [136]. Ceux-ci sont d'abord d'origine BL, mais cette sous-classe contient également la brotochine-B qui est une bactériocine antibotulinum produite par *Brochothrix campestris*. Le nombre de résidus d'acides aminés à l'intérieur de ces peptides varie de moins de 40 résidus d'acides aminés, par exemple, la plantaricine S et la lactococcine G avec 26/24 et 39/35 résidus dans ses deux peptides respectivement [139, 140] à des peptides plus grands tels que la brochocine-C, la sakacine T, la gasséricine T et la lactacine F, auquel cas au moins un des peptides a une longueur supérieure à 50 acides aminés [141, 142].

c. Classe IIc: Bactériocines circulaires

Comme pour d'autres bactériocines, les peptides de classe IIc sont synthétisés ribosomiquement et sont donc distincts des peptides cycliques antimicrobiens synthétisés par voie enzymatique tels que la gramicidine-S et la mycosubtiline [143, 144]. Les protéines précurseurs de classe IIc subissent des modifications post-traductionnelles conduisant à la liaison covalente de leurs terminaisons N et C pour créer un squelette circulaire [144].

d. Classe II d: Bactériocines non modifiées, linéaires, ne ressemblant pas à la pédiocine

Selon les différents schémas de classement, les bactériocines peptidiques unidimensionnelles, ne ressemblant pas à la pédiocine, non modifiées sont placées dans la classe II d, Tout simplement parce qu'elles ne sont pas conformes à l'un des critères définis dans les schémas de classement actuellement disponibles [11, 136, 145]. En conséquence, ce groupe de bactériocines englobe une compilation hétérogène de peptides antimicrobiens provenant d'une grande variété de souches provenant de diverses niches écologiques dont la lactococcine A, la première à être isolée, et la plus caractérisée. Nissen-Meyer et al. [136] ont classé 31 bactériocines de classe II d qui sont principalement d'origine BL mais ont également été isolées de *Staphylococcus* et *Weissella* sp.

I.2.7.1.3 Bactériolysines

Les bactériolysines (anciennement des bactériocines de classe III) sont des protéines de grandes tailles, antimicrobiennes thermolabiles. Leur mécanisme d'action est différent de celui des autres bactériocines car elles agissent en hydrolysant la paroi bactérienne des cellules sensibles. Il semblerait que la partie N-terminale montre des homologies avec les 26 endopeptidases alors que la partie C-terminale sert de site de reconnaissance. Les bactéries productrices ne possèdent pas toujours d'immunité contre leur production [11].

I.2.7.2 Bactériocines des bactéries Gram négatives

Les bactériocines produites par les bactéries Gram négative sont majoritairement produites par des souches d'*Escherichia coli*. Ces bactériocines sont subdivisées en deux groupes, celui des protéines de haut poids moléculaire appelé colicines, et celui des peptides de faible poids moléculaire, les microcines [146].

I.2.7.2.1 Colicines

Les colicines sont les bactériocines les plus étudiées provenant de bactéries à Gram négatif [147-149]. Il s'agit de protéines bactéricides de masse moléculaire élevée (30-80 kDa) produites par de nombreuses souches d'*E. coli* hébergeant un plasmide colicinogène en période de stress. La production de colicines est mortelle pour les cellules productrices, en conséquence de la production concomitante d'une protéine de lyse, coexprimée avec cette bactériocine. L'opéron de colicine typique contient un à trois gènes: un gène codant pour la colicine (cxa pour l'activité de la colicine X), un gène souvent situé en aval du gène structural codant pour la protéine d'immunité (cxi pour l'immunité à la colicine X ou imX) et un gène codant la protéine de lyse (ou protéine de libération de bactériocine), dont le produit permet la libération de la colicine dans le milieu externe [146].

La classification élaborée pour les colicines repose à la fois sur leurs mécanismes de destruction et sur la machinerie d'absorption qu'elles utilisent [147, 148]. En effet, les colicines tuent les cellules cibles à travers trois mécanismes principaux (1) en faisant des canaux dépendants de la tension dans la membrane interne des bactéries cibles, (2) par une action de nucléase dans le cytoplasme ou (3) en dégradant le peptidoglycane [150]. L'activité des colicines nécessite une étape de reconnaissance qui utilise un certain nombre de récepteurs normalement impliqués dans l'absorption de nutriments essentiels tels que la vitamine B12 (cobalamine), le fer ou les nucléosides liés aux sidérophores, qui ont été occupés par les colicines, les aidant à pénétrer plus efficacement dans les bactéries cibles [146].

a. Colicines du groupe A

Les colicines du groupe A nécessitent les protéines Tol ou un sous-ensemble de ces protéines (par exemple TolA / TolQ pour la colicine E1 et TolA / TolQ / TolR pour la colicine N) en plus d'une lipoprotéine d'ancrage en dehors de la membrane. Elles sont codées par de petits plasmides et sont libérées dans le milieu de culture. Le groupe A comprend les colicines A, E1 à E9, K, N, U [148] et S4 [151].

b. Colicines du groupe B

Toutes les colicines du groupe B ont besoin de protéines du système membranaire TonB / ExbB / ExbD. Ces colicines sont codées par de grands plasmides et ne sont pas libérées dans le milieu, le groupe B comprend les colicines B, D, Ia, M, 5 et 10 [148].

En outre, les bactériocines de type colicine, qui ont été caractérisées dans des bactéries non-*E. coli*, sont également réparties entre les deux groupes A et B [130].

I.2.7.2.2 Les microcines

Les microcines sont des peptides antibactériens codés par des gènes, avec des masses moléculaires inférieures à 10 kDa, produites par des entérobactéries, et sont généralement résistants aux protéases, aux pH extrêmes et à la température [146]. Ils sont sécrétés dans des conditions d'épuisement des nutriments et exercent une activité antibactérienne puissante contre des espèces étroitement apparentées. Des clusters de gènes typiques codant pour le précurseur de la microcine, le facteur d'auto-immunité, les protéines de sécrétion et fréquemment les enzymes de modification post-traductionnelle sont situés soit sur des plasmides, soit sur le chromosome. Contrairement à la plupart des antibiotiques d'origine microbienne, qui sont synthétisés de façon non ribosomique par des enzymes multimodulaires appelées synthétases peptidiques, les microcines sont synthétisées ribosomiquement comme précurseurs, qui sont en outre modifiées enzymatiquement. Ils forment une classe restreinte de puissants peptides antibactériens [130].

Jusqu'à présent, 14 microcines ont été signalées, dont sept seulement ont été isolées et caractérisées. Malgré le faible nombre de molécules connus, les microcines présentent une diversité de structures et de mécanismes antibactériens [152].

a. Les microcines de classe I

Elles sont codées par des groupes de gènes dans lesquels le gène d'auto-immunité n'est pas situé à proximité du gène de structure de la microcine. Deux ou trois gènes impliqués dans des modifications post-traductionnelles du squelette d'acides aminés sont situés adjacents au gène de structure. En outre, au moins un gène est impliqué dans l'auto-immunité et l'exportation [152].

Dans cette classe, on trouve trois peptides ayant une taille comprise entre 1 et 3 kDa, qui sont les microcines (Mcc) B17, C7/C51 et J25. La Mcc B17 est produite par diverses souches d' *E. coli* hébergeant le plasmide conjugué pMccB17 de 70 kb [153, 154]. La Mcc C7/C5 est considérée la plus petite microcine caractérisée jusqu'à présent, la MccC7 a d'abord été isolée par Moreno et ses collaborateurs à partir de surnageants de culture de souches d' *E. coli* hébergeant le plasmide pMccC7 à une seule copie de 43 kb [155, 156]. Les auteurs l'ont appelé MccC7. Plus tard, la même molécule a été isolée par Khmel et ses collaborateurs provenant de souches de *E. coli* hébergeant le plasmide pMccC51 à faible nombre de copies de 38 kb [157] et le peptide a été

appelé MccC51. La Mcc J25 est codée par le plasmide pTUC100 à faible nombre de copies de 60 kb, trouvé dans la souche fécale *E. coli* AY25[158]. Les peptides de la classe I subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles telles qu'une cyclisation dans le cas de la Mcc B17, une adénylation de la partie C-terminale de la Mcc C7/C51 et la formation d'une structure en lasso dans la Mcc J25 [152].

b. Les microcines de classe II

Elles sont des polypeptides d'une masse de 4,9 à 8,99 kDa produits par les *Enterobacteriaceae* et actifs contre ces mêmes bactéries. Suivant leur structure et l'arrangement de l'information génétique servant à la biosynthèse des peptides, elles sont divisées en deux groupes [152]. L'organisation du système génétique impliqué dans la biosynthèse des microcines de classe II comprend toujours au moins un gène de structure pour le précurseur, un gène d'immunité et au moins deux gènes codant le transporteur ABC et sa protéine accessoire nécessaire à la sécrétion du peptide [159]. Cet ensemble de gènes, qui sont homologues parmi les microcines de classe II, nécessite que la protéine tolC chromosomique soit fonctionnelle [147, 160, 161].

b1. Les microcines de la classe IIa

Les microcines appartenant à ce groupe sont caractérisées par l'absence de modification post-traductionnelle. On retrouve dans ce groupe trois bactériocines, que sont les microcines V, L et 24. Les mécanismes d'action des microcines de la classe II ont été très peu étudiés [159], ce qui nous a motivé à mieux chercher de comprendre le mécanisme d'action de la microcine V dans le chapitre II de la partie pratique de cette thèse.

✓ La microcine V

La MccV était la première substance antibiotique rapportée à être produite par *E. coli* [162]. Cet agent antibactérien a été initialement nommé colicin V (ColV) [163]. Cependant, en raison de plusieurs caractéristiques (faible poids moléculaire, production non inductible et système d'exportation dédié), il est devenu évident que ColV devrait être classé dans les microcines [161, 164]. Dans cette thèse, nous continuons de la nommer MccV, mais le lecteur doit garder à l'esprit que la plupart de la littérature sur cette microcine utilise la terminologie ColV. La MccV est sécrétée par diverses souches d'*E. coli* hébergeant des plasmides pColV de grande taille (> 80 kb), à faible nombre de copies [165]. Un fragment d'ADN de 4,2 kb provenant du plasmide pColV-K30 de 144 kb est requis pour la production, l'exportation et l'auto-immunité. Quatre gènes

répartis dans deux opérons convergents ont été identifiés [161, 166, 167]. Le gène structural *cvaC*, codant pour le précurseur de MccV de 103 acides aminés, et le gène d'auto-immunité *cvi* forment le premier opéron. Le système d'exportation dédié de MccV a été bien caractérisé [168, 169] et implique deux gènes qui forment le second opéron [161]. Le gène *cvaA* code pour une protéine ancrée à la membrane interne avec une région C-terminale s'étendant dans l'espace péri-plasmique [170]. Le gène *cvaB* code un transporteur ABC de membrane interne. Deux promoteurs ont été identifiés en amont de *cvaA* et en aval de *cvi* [171]. L'analyse de séquence nucléotidique de 12 plasmides producteurs de MccV isolés de souches naturelles d'*E. coli* a révélé un faible niveau de polymorphisme dans la région *cvaC-cvi* de 683 pb, ce qui suggère une forte stabilité du groupe de gènes de la MccV.



Figure 3. Organisation génétique des grappes de gènes de la microcine [152].

Les gènes sont indiqués par des flèches (figure 3) dont la direction fait référence à la transcription génique. Le gène codant pour les précurseurs de la microcine est représenté en vert. Les gènes nécessaires à l'auto-immunité et à l'exportation de la microcine sont indiqués respectivement en rouge et bleu. Les promoteurs sont indiqués par des croissants. Le nom des gènes est indiqué au-dessous de chaque gène [152].

**ASGRIDIAMAI GTLSGQFVAG GIGAAAGGVA
GGAIYDYAST HKPNPAMSPS GLGGTIKQKP
EGIPSEAWNY AAGRLCNWSP NNLSDVCL**

Figure 4. Séquences de la MccV mature comme mentionnée à Bactibase [172]

✓ La microcine L

La microcine L (MccL) est produite par la souche *E. coli* LR05 isolée de l'intestin de volaille [173]. Cet isolât exprime également la MccB17, la MccD93 et la MccJ25 [174]. Le séquençage de pL102, a montré que le gène cluster de la MccL est constitué de quatre gènes codant les 105 acides aminés, qui sont le précurseur de MccL (MclC), la protéine d'auto-immunité de la microcine (mclI), et les protéines d'exportation de la microcine (mclA et mclB). Les gènes mclA

et mclB sont hautement homologues (99% et 96% d'identité) à *cvaA* et *cvaB* codant pour le système d'exportation de la MccV [152].

✓ La microcine 24

La Mcc24 (anciennement la colicine 24) est sécrétée par la souche uropathogène *E. coli* 2424 et ses déterminants génétiques sont situés sur le plasmide conjugué p24-2 [175].

b2. Les microcines de la classe IIb

Les peptides de la classe IIb sont des polypeptides linéaires transportant en C-terminal un sidérophore ajouté après la traduction de la protéine [159]. Ces peptides possèdent en C-terminal une séquence de 10 acides aminés hautement conservée qui servirait à la reconnaissance [184]. L'information génétique pour la biosynthèse de ces microcines est portée sur le chromosome. En plus des gènes présents pour la biosynthèse des microcines de classe II a, des gènes codant des enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles sont nécessaires [159]. On retrouve dans cette classe, les microcines E492, H47, M et sûrement les G492 et I47. La microcine E492 montre un mécanisme d'action de type formation de pores [176] alors que la microcine H47 semble plutôt interagir avec la partie F0 de l'enzyme multimérique F0F1 ATP synthase [177].

1.2.7.3 Applications des bactériocines

Les bactériocines produites par les BL présentent plusieurs caractéristiques qui les rendent encore plus attrayantes pour la conservation des aliments, vu que les BL ont une longue histoire d'utilisation sûre dans les aliments ; ces bactéries et leurs produits cellulaires - y compris les bactériocines - sont généralement reconnus comme sûrs; Les bactériocines des BL ne sont pas actives et non toxiques sur les cellules eucaryotes et en raison de leur nature protéique, les bactériocines devraient être inactivées par les protéases digestives et ne pas exercer d'effets significatifs sur le microbiote intestinal aux concentrations ingérées [128]. En outre, les bactériocines des BL peuvent être appropriées comme conservateurs, étant donné leur spectre antimicrobien parfois large, leur activité synergique avec d'autres antimicrobiens, un mode d'action bactéricide exercé au niveau membranaire, la stabilité sous les conditions de chaleur et de pH exercées lors du traitement de nombreux aliments, et surtout leurs déterminants génétiques (habituellement codés par un plasmide), ce qui facilite la manipulation génétique et le développement de souches productrices avec des propriétés technologiques améliorées [5].

L'utilisation de bactériocines dans la conservation des aliments peut être bénéfique sous plusieurs aspects [178, 179]: (1) réduire les risques d'intoxication alimentaire, (2) diminuer la contamination croisée dans la chaîne alimentaire (3) améliorer la durée de conservation des produits alimentaires, (4) protéger les aliments pendant les épisodes de mauvais traitement de la température, (5) réduire les pertes économiques causées par la détérioration des aliments, (6) réduire les niveaux de conservateurs chimiques ajoutés, (7) réduire l'intensité des traitements physiques, permettant ainsi une meilleure conservation de la valeur nutritive des aliments et éventuellement une diminution des coûts de transformation, (8) peuvent éventuellement constituer d'autres barrières de conservation pour les aliments "nouveaux" (moins acides, avec une teneur en sel plus faible et une teneur en eau plus élevée) 9) satisfaire éventuellement aux exigences des consommateurs des aliments frais, légèrement conservés et prêts à consommer (PAC). Il peut aussi y avoir un marché potentiel pour les bactériocines comme substituts naturels des conservateurs chimiques et pour la préservation des aliments fonctionnels et des nutraceutiques [180].

1.2.7.4 Modes d'application des bactériocines

Selon des études antérieures, les bactériocines peuvent être appliquées dans les aliments de différentes façons :

1.2.7.4 .1 Préparations de bactériocine

Obtenues par culture de la souche de production dans un milieu de croissance approprié. Ceci est habituellement suivi d'une inactivation bactérienne par la chaleur et de la concentration des cellules cultivées (par lyophilisation ou séchage par pulvérisation) pour obtenir une poudre bioactive qui contient un mélange des substances antimicrobiennes produites dans le bouillon (comme la bactériocine et les acides organiques). Des préparations commerciales telles que les produits Nisaplin®, Alta® ou Microgard® en sont quelques exemples. D'autres bactériocines telles que la lacticine 3147, la variacine ou l'enterocine AS-48 ont également été obtenues sous la forme de préparations en poudre [181, 182].

1.2.7.4.2 Les cultures productrices de bactériocine

Prêtes à la propagation dans le substrat alimentaire et la production de bactériocine *in situ*. Les souches productrices de bactériocines peuvent être appliquées comme cultures initiales principales dans les aliments fermentés, à condition qu'elles offrent les propriétés technologiques appropriées, ou en tant que culture adjuvante en combinaison avec des souches de démarrage résistantes aux

bactériocines. Ils peuvent également être appliqués comme des cultures bioprotectrices dans les aliments non fermentés, à condition qu'ils n'aient pas d'effets négatifs sur les aliments [146, 183].

1.2.7.5 Réglementation de l'utilisation des bactériocines comme additifs alimentaires

Il existe de nombreuses réglementations différentes concernant l'application de bactériocines dans les aliments selon la catégorie, le mode d'application (par exemple sous forme de préparations de bactériocine ou de cultures protectrices) et les lois de chaque pays. Cela comprend non seulement les lois alimentaires directes, mais aussi beaucoup d'autres qui traitent des aspects connexes tels que l'étiquetage, l'emballage, l'exportation ou l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés [183].

La nisine est la seule bactériocine actuellement approuvée comme conservateur alimentaire (E234). Le comité mixte d'experts de la FAO / OMS sur les additifs alimentaires a évalué l'innocuité de la nisine en 1969 et a été ajoutée à la liste Européenne des additifs alimentaires en 1983 (directive 83/463 / CEE, directive 95/2 / CE); elle a été approuvée en 1988 par la FDA pour être utilisée dans les pâtes de fromage fondu pasteurisé. La nisine est également utilisée dans plus de 80 pays [184]. Cependant, il existe des différences importantes dans les législations nationales concernant la présence et les niveaux de la nisine dans les produits alimentaires.

1.2.7.6 Impact des souches bactériocinogènes et de leurs bactériocines sur le microbiote intestinal

1.2.7.6.1 Le microbiote intestinal du poulet : Description et localisation dans le tractus digestif

La flore digestive au sens large comprend les organismes unicellulaires situés dans le tractus digestif, c'est-à-dire les bactéries, les champignons et les protozoaires. En ce qui concerne les populations bactériennes, qui sont les micro-organismes prédominants, elles représentent une large gamme de types métaboliques et morphologiques. Leur nombre total est plus important que le nombre de cellules eucaryotes constituant le corps de l'hôte. On distingue les bactéries dominantes ($>10^6$ UFC / g du contenu), sous-dominantes (10^5 à 10^3 UFC / g du contenu), et résiduelles ($<10^3$ UFC / g du contenu). Chez le poulet, les sites principaux d'activité bactérienne sont le jabot, les cæca et, dans une moindre mesure, l'intestin grêle [185]. Ainsi, dans les cæca et l'iléon, on trouve 10^{11} et 10^9 bactéries par g de contenu respectivement [21]. Compte tenu des nombreux facteurs

modifiant la flore, les différences méthodologiques entre les études (type de régime dont la présence ou non d'antibiotique, souche d'animaux, etc.), empêchent toute généralisation de description de la flore. Par ailleurs, les études effectuées sur la microflore des oiseaux ont touché principalement le cæca [186].

Globalement, la flore du jabot à l'iléon terminal est composée principalement d'anaérobies facultatives alors que les cæca contiennent en plus des anaérobies strictes, ces derniers étant dominants [185].

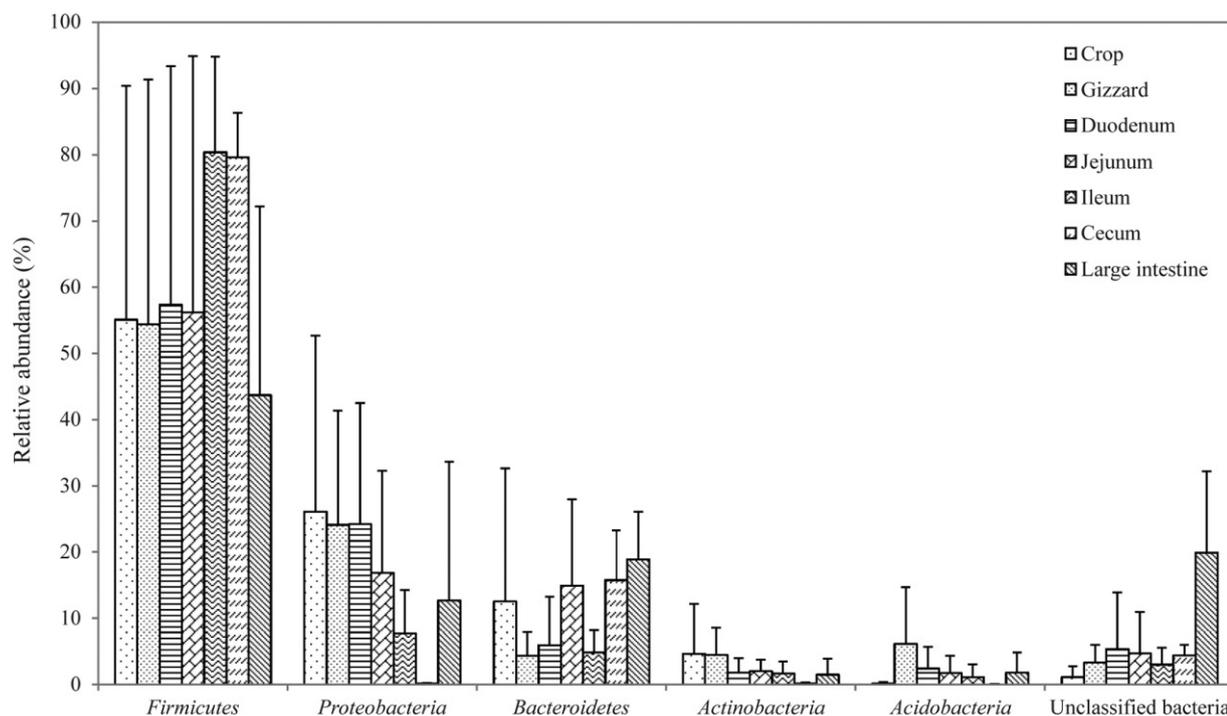


Figure 5. Répartition spatiale de la composition microbienne par embranchement le long du tractus gastro-intestinal de poulet [187].

Dans le jabot, on trouve principalement des lactobacilles qui peuvent être attachés à l'épithélium en formant presque une couche complète. On trouve aussi des entérocoques, des coliformes, et des levures. Dans le gésier et le proventricule, le faible pH fait chuter la population bactérienne. Dans le duodénum, le nombre important d'enzymes, la forte pression en oxygène et la présence de fortes concentrations de composés antimicrobiens tels que les sels biliaires limitent la croissance bactérienne. On trouve principalement des lactobacilles ainsi que des entérocoques et des coliformes. Plus loin dans l'intestin, l'environnement devient plus favorable à la croissance bactérienne à cause de la plus faible pression d'oxygène, la faible concentration en enzymes et sels biliaires (réabsorption et dégradation en partie par la microflore) [185]. Si les aliments sont bien digestibles, par manque de substrat, la flore est limitée. Dans l'iléon, on trouve principalement des lactobacilles attachés aux entérocytes, des entérocoques et des coliformes. Dans les cæca, on

trouve une large population de types morphologiques variés, enfouie dans la couche de mucus et attachée à l'épithélium. En effet, le contenu de cet organe étant rarement renouvelé (1 à 2 fois/jour), cela le rend favorable au développement des bactéries. On trouve en majorité des anaérobies stricts comme les *Eubacterium*, des bifidobactéries ou des clostridies. On trouve aussi des anaérobies facultatifs comme des lactobacilles, des entérocoques, et des coliformes [186].

I.2.7.6.2 Rôle des bactériocines au niveau du système digestif

La production d'antimicrobiens est souvent considérée a priori comme un trait important en termes d'efficacité probiotique. Plusieurs bactéries probiotiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui peuvent améliorer leur capacité à concurrencer d'autres microorganismes du tractus gastro-intestinal et qui pourraient potentiellement inhiber les bactéries pathogènes [188, 189]. Traditionnellement, la production de bactériocines a été un critère important dans le choix d'une souche probiotique, bien que peu d'études aient définitivement démontré l'impact de la production de bactériocines sur la capacité d'une souche à concurrencer dans le tractus gastro-intestinal et / ou influencer positivement la santé de l'hôte [190]. Les bactériocines jouent un rôle important malgré les coûts d'énergie associés imposés par leur production [191]. Cependant, leur fonction écologique exacte a fait l'objet de nombreux débats. Il est possible que les bactériocines puissent contribuer à la fonctionnalité probiotique de plusieurs façons (figure 6)[11]. Les bactériocines peuvent fonctionner comme des peptides colonisateurs, ce qui facilite l'introduction et / ou la prédominance d'un producteur dans une niche déjà occupée [192]. Alternativement, les bactériocines peuvent agir comme des peptides antimicrobiens ou mortels, inhibant directement les souches ou agents pathogènes concurrents [193]. Enfin, les bactériocines peuvent fonctionner comme des peptides de signalisation, et induire une modulation du microbiote colique tout en influençant la stimulation du système immunitaire de l'hôte [193, 194].

a. Les bactériocines comme peptides colonisateurs.

La densité cellulaire élevée, généralement associée au tractus gastro-intestinal peut entraîner un contact cellulaire étroit entre des membres de la même espèce ou des espèces différentes, favorisant à la fois des interactions microbiennes coopératives et antagonistes [195]. La production d'antimicrobiens peut constituer un mécanisme par lequel les producteurs peuvent obtenir un avantage concurrentiel sur les souches sensibles voisines dans cet environnement. À l'appui de cette hypothèse, Gillor et al. [191] ont démontré qu'*E. coli* produisant une colicine pouvait

persister dans le gros intestin de souris traitées par streptomycine pendant une période prolongée par rapport à leurs homologues non colicinogènes.

b. Les bactériocines comme peptides tueurs

La capacité des microorganismes produisant des bactériocines à inhiber les agents pathogènes *in vitro* a été bien documentée [191]. Cependant, les études impliquant des corrélations directes entre l'efficacité *in vitro* et la protection *in vivo* sont quelque peu rares. Il a été révélé que, bien que la production de pediocine PA-1 par *Pediococcus acidilactici* UL5 réduise la viabilité de *L. monocytogenes* d'environ 3 log *in vitro*, un effet correspondant n'a pas été observé *in vivo* [196].

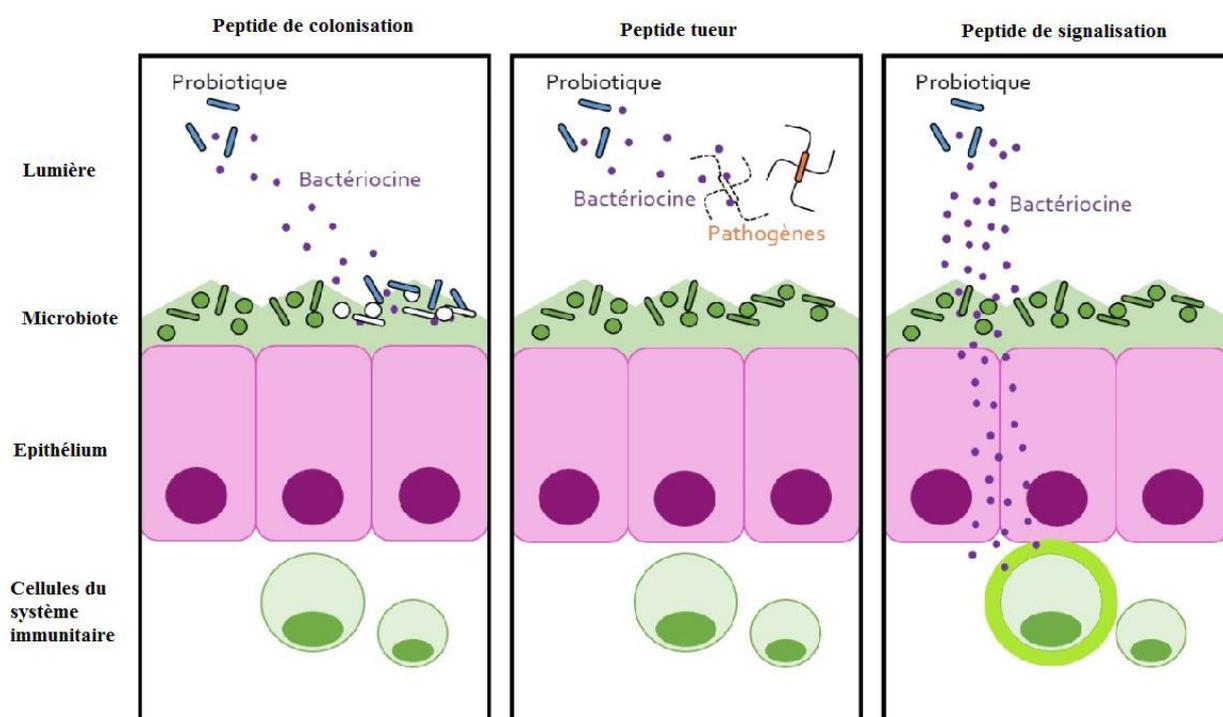


Figure 6. Les mécanismes par lesquels la production de bactériocines pourrait contribuer à la fonctionnalité probiotique [11]

Les bactériocines peuvent être des peptides colonisateurs, ce qui facilite la compétition d'un probiotique avec le microbiote résident; Ils peuvent fonctionner comme des peptides tueurs, éliminant directement les agents pathogènes; ou ils peuvent servir de peptides de signalisation, signalant d'autres bactéries ou le système immunitaire [11].

c. Les bactériocines comme peptides de signalisation.

La communication bactérienne via des molécules de signalisation extracellulaires diffusibles (quorum sensing : QS) permet aux populations de bactéries de synchroniser le comportement du groupe et permet ainsi une adaptation à leur environnement [197]. Chez les bactéries Gram négatives, la (N-acyl) homosérine lactone sert généralement de molécule de signal, tandis que chez les bactéries Gram-positives, les peptides, y compris certaines bactériocines, servent fréquemment d'agents de signalisation [198]. Ainsi, il a été suggéré qu'au moins certaines bactériocines ont un double rôle, agissant comme inhibiteurs à haute concentration et comme composés de signalisation à des concentrations inférieures [199].

II. Partie 2

Etude Expérimentale

II.1 Chapitre1

Criblage de l'activité antimicrobienne et la purification de la microcine V

Guide de lecture :

L'objet de ce chapitre est le screening de l'activité antimicrobienne des souches d'origine aviaire et porcine. Une caractérisation des souches par une identification moléculaire, et sérotypage ainsi qu'une recherche de gènes de virulence. Ensuite décrire la méthode utilisée pour la purification de la microcine V et caractériser cette dernière par des tests physicochimiques et protéomiques.

II.1.1 Matériel et Méthodes

II.1.1.1 Les souches bactériennes et conditions de culture

Les souches bactériennes productrices de bactériocines ont été isolées du contenu de l'intestin de porc et du jabot de poulet (voir le tableau 02). Elles ont été choisies parmi plusieurs autres bactéries co-isolées pour leur activité antibactérienne. Pour l'ensemble des souches utilisées, la pureté a été confirmée par une coloration de Gram avec une observation microscopique.

Les souches de bactéries lactiques ont été isolées et purifiées sur milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe). L'identité des isolats a été réalisée par une coloration de Gram, les tests de microbiologie classique, puis les meilleures souches ont été identifiées par séquençage de l'ADN (gène 16S).

Les souches indicatrices sont obtenues à partir des stocks du Centre de Recherche en Sciences et Technologies du Lait (STELA), Université Laval, Canada. Toutes les souches ont été cultivées et maintenues à 37°C dans un bouillon ou gélose Luria Bertani (LB Difco Laboratories, Sparks, MD) et MRS (Difco Laboratories, Sparks, MD) selon la souche.

Dans cette étude, la souche *E. coli* LR05 qui est une souche sauvage productrice des MccL, B17, D93 et J25 et la souche *E. coli* pTUC 202 productrice de la MccJ25 ainsi que la souche *Pediococcus acidilactici* UL5 ont été utilisées comme des témoins positifs.

II.1.1.2 Identification moléculaire des souches productrices

L'ADN génomique a été isolé par un kit d'extraction d'ADN génomique (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Pour chaque échantillon, la région 16S a été amplifiée comme décrit par Hanchi et al. [200] en utilisant des amorces universelles F27 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') et R1522 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG GCC CA-3').

Le mélange réactionnel (25 µl) était constitué de 18,25 µl d'eau ultrapure «nuclease free water» (Invitrogen Life Technologies, Carlsbed, CA, USA), 2,5 µl de 10X Taq buffer, 1 µl de dNTP (A, T, G et C à 10 µM), (New England Biolabs Ltd, ON, Canada) 1 µl d'une solution d'ADN cible (60 ng/µl), 1 µl de chacun des deux amorces (10 µM/µl) et 0,25 µl (1,25 U) de l'enzyme Taq polymérase (New England Biolabs).

L'amplification par PCR a été réalisée dans un recycleur PCR (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hambourg, Allemagne) en utilisant 35 cycles d'amplification. Chaque cycle comprend les étapes

suivantes : une dénaturation de 30 s à 94°C, une hybridation des amorces à 55°C durant 30 s, une élongation à 72°C pour 1,5 min et une extension de 5 min. Les produits amplifiés ont été soumis à une électrophorèse sur gel (100 V; 1 h) dans un gel contenant 0,8% d'agarose (Sigma, Oakville, ON, Canada) en un tampon 1 x TAE (Sigma), la coloration a été réalisée par le GelRed (Biotium) et la visualisation par UV.

La détermination des séquences de bases a été effectuée à la plateforme de séquençage et de génotypage des génomes du Centre Hospitalo-Universitaire Laval (Québec, Qc). Les séquences obtenues ont été comparées à celles de la base de données utilisée pour la recherche de similitude à l'aide du service BLAST du centre national de biotechnologie information NCBI (National Center of Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

II.1.1.3 Détermination de l'activité antimicrobienne

II.1.1.3.1 Méthode de diffusion sur gélose

La méthode de diffusion en gélose décrite par Hammami [201] a été utilisée. La gélose LB (Difco Laboratories, Sparks, MD) contenant 0,8% (p/v) d'agar a été passée à l'autoclave, refroidie à 45°C,ensemencée avec 150 µl d'une culture d'une nuit de la souche indicatrice et versée dans des boîtes de Pétri stériles (25 ml chacune). Après solidification, les puits ont été percés dans la gélose en utilisant l'extrémité large d'une pipette de 5 ml stérile et 80 µl de l'échantillon à tester ont été distribués dans chaque puits. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C pendant 18 heures pour laisser les zones d'inhibition se développer et le diamètre de celles-ci a été mesuré.

II.1.1.3.2 Méthode de dilution critique (microdilution)

Ce bio-essai a été réalisé en utilisant des plaques de micro-titration en polystyrène (96 puits de microtitration, Becton-Dickinson Labware, Sparks, MD, USA) comme décrit par Ennaas [202]. Les surnageants obtenus par centrifugation à 5000g/5min et filtrés par des filtres de 0,22 µm ont été déposés rapidement dans des microplaques et dilués en double série avec le bouillon LB, puis ont été ensemencés avec environ 1×10^4 UFC de souche indicatrice par puits en utilisant une culture bactérienne en phase logarithmique diluée dans du LB à $0,5-1,0 \times 10^6$ CFU ml⁻¹. Les microplaques ont été incubées pendant 12 h, et l'absorbance à 595 nm a été mesurée chaque 20 mn en utilisant un Infinite® F200 PRO photomètre (Tecan US inc., Durham, Caroline du Nord).

L'activité antimicrobienne a été calculée comme suit: $AU \text{ ml}^{-1} = (1000/100) \times 2^n$,

Avec n = nombre de puits inhibés, et exprimés en unités arbitraires par ml (UA ml⁻¹).

II.1.1.4 Tests d'activité et de l'immunité

Un test d'immunité croisée entre les producteurs de bactériocines a été réalisé contre les souches d'*E.coli* recombinantes produisant la MccJ25, la MccB17 (classe I), la MccL (classe IIa) et la MccD93 [152], obtenues à partir des cultures mères du Centre de recherche en Sciences et technologie du lait (STELA), Université Laval, Canada. L'immunité croisée a été déterminée pour les dix souches Gram négatif initialement sélectionnées en duplicata par un essai de diffusion sur gélose tel que décrit ci-dessus (*cf* titre 1.2.3.1).

II.1.1.5 Courbes de croissance et de production de bactériocines

La cinétique de croissance des souches a été étudiée simultanément et l'activité de la bactériocine. Cinq cents millilitres de bouillon M63 (KH_2PO_4 3g/l, K_2HPO_4 7g/l, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 2g/l, casaminoacides 1g/l, autoclavés à 121°C pendant 15min, puis supplémentés avec du glucose à 20% (10ml/l), MgSO_4 20% (1ml/l) et la thiamine 1‰ (1ml/l)) ont étéensemencés à 1% avec une culture d'une nuit (18 h) cultivée déjà dans du bouillon LB à 37°C, puis incubés à 37°C pendant 24 h sous agitation. Des échantillons ont été prélevés toutes les 2 h pour les 14 premières heures et un autre a été pris à 24h. Pour chaque échantillon, le nombre de bactéries viables, et la production de bactériocine ont été déterminés.

Le nombre de bactéries ont été déterminés par des dilutions décimales de la culture dans de l'eau peptonnée 0,1% puis dénombrés sur le milieu LB [203] et les courbes de croissance ont été tracées.

Un millilitre de la culture a été centrifugée à 10 000 g pendant 10 min. Le surnageant a été filtré à travers une membrane d'acétate de cellulose avec la taille des pores 0,22µm (VWR, Mississauga, ON, Canada) après cela, ils ont été stockés à -80 ° C pour une utilisation ultérieure (détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de microplaque *cf* titre 1.2.3.2).

II.1.1.6 Sensibilité aux antibiotiques

Les souches sélectionnées ont été testées pour leur sensibilité à certains antibiotiques de différentes classes. Pour chaque antibiotique, les solutions mères ont été préparées comme décrit par Andrews [204]. La sensibilité aux antibiotiques a été déterminée selon les lignes directrices du CLSI « Clinical and Laboratory Standards Institute » [205] en utilisant la méthode de

microdilution. La concentration bactérienne a été ajustée pour être près de 5×10^5 UFC / ml dans un bouillon Mueller-Hinton. La CMI a été déterminée après incubation des microplaques pendant 18 heures à 37°C, et a été définie comme étant la concentration minimale de l'antibiotique qui inhibe la croissance visible de la bactérie. Les breakpoints recommandés par CLSI [205] et EUCAST [206] pour les entérobactéries ont été utilisés pour classer les bactéries testées dans trois classes: résistants, intermédiaires, ou sensibles.

II.1.1.7 Identification des gènes de virulence et sérotypage des souches

Douze gènes de virulence connus chez *E.coli* ont été ciblés à savoir Aero (gène codant pour aérobactine) LT (Entérotoxine sensible à la chaleur), STb, STa (Entérotoxine résistante à la chaleur), Stx1, Stx2 (Shigatoxines), Eae (facteur de fixation et d'effacement), F4, F18 (fimbriae), P (adhésine fimbriae), CNF (facteur de nécrose cytotoxiques) et Tsh (hémagglutinante sensible à la température).

Pour déterminer le sérotype des souches sélectionnées, 85 antisérums O ont été utilisés. L'amplification des gènes de virulence et la détermination des sérotypes ont été réalisées au Laboratoire de référence pour *E.coli*, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC.

II.1.1.8. Sensibilité aux solvants organiques

La sensibilité de l'activité des surnageants aux solvants organiques (Fisher Scientific, New Jersey, Canada) tels que le méthanol, l'acétonitrile, le propanol, l'hexane et le chloroforme a été étudiée. Les surnageants des cultures ont été dissous individuellement dans chaque solvant organique (1V / 1V). Les mixtures ont été mises à incuber à 37°C pendant 2 h, puis les solvants ont été éliminés par évaporation au SpeedVac. Des échantillons non traités ont été utilisés comme témoins. Après chaque traitement, l'activité résiduelle a été déterminée par la méthode de micro-dilution critique. [207].

II.1.1.9. Purification de la bactériocine

Pour produire et purifier la microcine, des Erlenmeyers (2000 ml) contenant 750 ml de bouillon M63 (préparé comme indiqué précédemment) ont étéensemencés avec un inoculum de 1% à partir d'une culture d'une nuit d'*E.coli* P2C et incubés à 37°C pendant 12 heures avec agitation. La culture a été centrifugée (10 000g, 20 min) et le surnageant a été passé sur une colonne C18 (Sep-Pak Plus C18 environnement, Waters, Saint-Quentin en Yvelines, France). Quatre éluions par

étapes ont été réalisés avec successivement 0%, 20%, 60% et 100% d'acétonitrile et d'eau ultrapure acidifiée avec l'HCl à 0,5 mM (débit 5 ml / min). Les différentes fractions récupérées ont été testées pour leur activité antimicrobienne contre *E. coli* ATCC 35695. La fraction active a ensuite été soumise à une évaporation rotative (Rotavapor) pour éliminer l'acétonitrile [208].

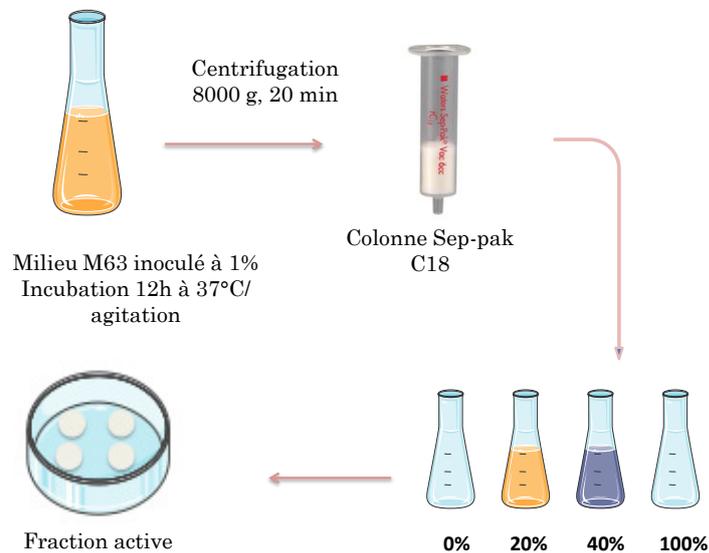


Figure 7. Etapes de séparation sur colonne Sep-pak.

Le peptide antimicrobien a été purifié comme décrit par Pons et al. [209] (figure 8). La fraction active a été injectée deux fois dans une colonne C18 d'une Chromatographie en phase liquide à haute pression en phase inverse (RP-HPLC) (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada), en utilisant de l'eau pure avec 0,5 mM d'HCl comme éluant A et de l'acétonitrile comme éluant B. Le premier passage était sur un système HPLC préparatif (Luna 10 μm , 250 \times 21.10 mm, Phenomenex, CA, USA) en utilisant un gradient d'acétonitrile de 20% à 40% et un débit de 10 ml / min. Le second passage est sur un système HPLC analytique, au moyen d'une colonne de cartographie peptidique (Aeris™ 3.6 μm , PEPTIDE XB-C18, 250 \times 4.6 mm, Phenomenex).

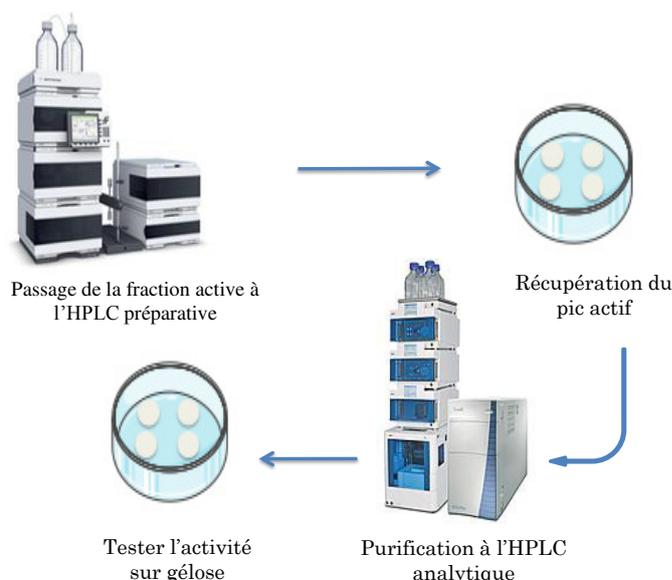


Figure 8. Purification de la substance active.

Le gradient utilisé était 0-03 min, 29%; 3-21 min, 29-38%; 21-23 min, 38 à 100%; et de 23 à 24 min, 100% d'acétonitrile, débit 1 ml / min et la mesure de la densité optique a été effectuée à 214 nm. Chaque pic a été testé pour une activité antibactérienne. L'acétonitrile résiduel a été séché par de l'azote (Praxair, Canada). Les fractions purifiées ont été rassemblées et stockées à -20°C.

II.1.1.10. Détermination de la concentration en protéines

La concentration en protéines à chaque étape de purification de la bactériocine a été déterminée en utilisant un kit de dosage de protéine de Lowry (Bio-Rad) selon le protocole du fabricant : La courbe d'étalonnage a été tracée en utilisant la BSA comme protéine de référence, avec un coefficient de régression R^2 de 0,999. L'absorbance est déterminée en triplicata à 750 nm dans un lecteur de microplaque [210].

II.1.1.11. Effet des enzymes, du pH et du traitement thermique sur la stabilité de la bactériocine

La stabilité thermique de la bactériocine semi-purifiée (BSP) a été évaluée en exposant des aliquotes à des couples différents de temps/températures (10 min à 80°C et 100°C, 30 min et 60 min à 100°C et 15 min à 121°C), puis tester leur activité antimicrobienne par la méthode de microplaque [211].

L'effet du pH sur l'activité de la bactériocine a été testé par l'ajustement de la BSP à pH 2-12 (au minimum de deux unités de pH) avec du NaOH 0,5N ou HCl stériles. Les échantillons ont été mis

en incubation à température ambiante (25°C) pendant 2 h. L'activité résiduelle a été mesurée après ajustement du pH à 6,0 [212].

La sensibilité aux enzymes protéolytiques (Sigma) comprenant la subtilisine A, α -chymotrypsine, la trypsine, la pepsine et la proteinase K a été réalisée en dissolvant les enzymes dans un tampon phosphate (pH 7,5), un tampon Tris-HCl (pH 8), un tampon phosphate de sodium (pH 7,6), un tampon HCl 10 mM et du tampon phosphate (pH 7,5) respectivement à une concentration finale de 2 mg / ml. Les solutions enzymatiques ont été stérilisées par des filtres jetables (0,22 μ m Fischer, UK). Des aliquotes de SPB ont été mélangées avec chaque solution d'enzyme (1V / 1V), incubés à 25°C ou 37°C pendant 2 h selon l'enzyme utilisée, puis chauffés dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes pour inactiver les enzymes, et enfin l'activité antimicrobienne a été déterminée par la méthode de microdilution [213].

II.1.1.12. Spectrométrie de masse et détermination de la séquence d'acides aminés

Des analyses LC-MS / MS ont été réalisées sur un système Thermo EASY nLC II LC couplé à un spectromètre de masse Thermo LTQ Orbitrap Velos équipé d'une source d'ions nanospray (Thermo Fisher Scientific). Pour la séquence des peptides, les fragmentations ont été réalisées en utilisant CID (Collision Induced Dissociation), HCD (High-energy Collision Dissociation) et ETD (Electro Transfer Dissociation) séparément. Dans chaque essai, environ 1/30 de l'échantillon total a été injecté sur une colonne de 10 cm x 75 μ m emballée à l'intérieur avec une phase stationnaire C18. Les données MS ont été traitées à l'aide du logiciel Thermo Proteome Discoverer (v2.1) avec le moteur de recherche SEQUEST contre une base de données *E.coli* (téléchargée depuis UniProt). L'enzyme de recherche de base de données a été choisie comme étant « pas enzyme ». Seuls des peptides uniques avec une confiance élevée (faux taux de découverte <1%) et avec au moins 2 CSP (correspondance spectrale peptidique) ont été considérés et rapportés après des vérifications manuelles. Les mêmes données MS ont également été traitées en utilisant un fichier FASTA contenant 115 séquences de protéines reconnues comme contaminants communs dans les études protéomiques (<http://www.thegpm.org/crap/>) plus la base de données BACTIBASE [172]. Les analyses protéomiques ont été effectuées au Centre d'Applications Biologiques de la spectrométrie de masse (AMSB) de l'Université Concordia (Canada).

II.1.1.13. Concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI 50) du peptide antimicrobien a été déterminée contre certains micro-organismes par la méthode de dilution critique [202]. La CMI 50 a été considérée comme la plus faible concentration qui ne montre pas de turbidité (DO 600nm) après 8 h d'incubation.

II.1.2. Résultats

II.1.2.1 Criblage, identification et caractérisation des souches bactériocinogènes

Les surnageants stériles provenant de vingt-sept souches précédemment isolées à partir des jabots de poulets et du tractus gastro-intestinal du porc ont été criblés contre un large éventail de bactéries Gram-négatives par l'essai de diffusion sur gélose (résultats préliminaires). Dix isolats ont montré une activité antibactérienne contre au moins une souche indicatrice, et les six souches les plus actives ont été sélectionnées pour une caractérisation plus poussée. Les isolats ont été identifiés comme *E. coli* P2C, *E. coli* P2M, *Proteus* sp. P6C, *E. coli* P3M, *E. coli* I1006 et *Lb.plantarum* J34. Les séquences du gène de l'ARNr 16S ont été soumises dans Genbank sous les numéros d'accès respectifs MF355370, MF355371, MF355372, MF355373 et MF355374. Les surnageants des six souches étaient actifs, les souches *E. coli* P2C, *E. coli* P2M et *E. coli* I1006 étant les plus inhibitrices contre *E. coli* O157 H7, *E. coli* O18, *E. coli* O1K1H7, *E. coli* O26 et *E. coli* ATCC 35695 (tableau 2).

Tableau 2. Activité antimicrobienne des surnageants stériles et conditions de culture des souches indicatrices

Souches indicatrices	Activité (Ø mm)					
	Souches productrices					
	P2C	P2M	P6C	P3M	I 1006	J34
<i>E. coli</i> O ₁₅₇ :H ₇	10	13	10	13	10	17
<i>E. coli</i> O ₁₅₇ :H ₇ ATCC ^a 35150	0	12	0	0	12	15
<i>E. coli</i> O ₂₆ HM ^b	10	10	0	7	9	13
<i>E. coli</i> O11 NM	0	0	0	0	0	8
<i>E. coli</i> O ₁₈	14	11	10	10	15	15
<i>E. coli</i> O ₈ K ₂₅	0	0	0	0	0	8
<i>E. coli</i> O ₇₈ K ₈₀	0	0	0	0	0	9
<i>E. coli</i> O ₁ K ₁ H ₇	12	15	0	9	12	14
<i>E. coli</i> O ₂ K ₁ H ₄	0	0	0	0	0	7
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0	0	9
<i>E. coli</i> ATCC 35695	18	17	13	14	17	19
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0	0	0	0	0	0
<i>Yersinia</i> O:5	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aerogenosa</i> ATCC 15442	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 9700	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 8400	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 29628	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 14028	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 9607	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 8387	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella enteritidis</i> MNHN	0	0	0	0	0	10

^aATCC : American Type Culture Collection; ^b collection du centre STELA

La figure 10A illustre l'activité antimicrobienne des surnageants des souches dirigées contre *E. coli* ATCC 35695, ceux qui sont récupérés à partir des souches P2C et P2M étant les plus actifs. Comme le montre le tableau 3, les souches P2C et P2M d'*E. coli* appartiennent au sérotype O15, tandis que la souche P3M appartient au sérotype O8. Aucun sérotype n'a été obtenu pour la souche *E. coli* I1006 en raison de l'absence d'agglutination avec les 86 antisérums testés. La souche P6C a été identifiée comme *Proteus sp.* et son sérotype n'a pas été étudié en raison de sa pathogénicité présumée.

Tableau 3. Identification et caractérisation des souches productrices

Souche	Identification	Sérotype	Gène de pathogénicité
P2C	<i>E. coli</i>	O15	-
P2M	<i>E. coli</i>	O15	-
P6C	<i>Proteus sp</i>	ND ^c	ND
P3M	<i>E. coli</i>	O8	-
I1006	<i>E. coli</i>	NT ^d	<i>P, Tsh</i>
J34	<i>Lb. plantarum</i>	ND	ND

^c Non Déterminé, ^dNon Typé.

En outre, toutes les souches sélectionnées ont été criblées pour la présence de 12 gènes de virulence différents chez *E. coli* qui sont connus pour être pathogènes pour diverses espèces animales et humains (Tableau 3). La souche *E. coli* I1006 avait deux gènes codant pour l'adhésine fimbriae (P) et l'hémagglutination sensible à la température (Tsh), tandis que les autres souches d'*E. coli* ne contenaient aucun des gènes de virulence testés. *Lb. plantarum* J34 avec son statut GRAS (Generally Recognized as Safe) n'a pas été soumise à la recherche de gènes de virulence.

Le tableau 5, résume la sensibilité des souches sélectionnées aux antibiotiques. Alors que les souches *E. coli* P2C et P2M étaient sensibles au sulfate de colistine, à l'acide nalidixique, au chloramphénicol, à la gentamicine et à l'ampicilline, *E. coli* P3M et *E. coli* I1006 présentaient une résistance à l'ampicilline. Aucun breakpoint n'a été fourni par CLSI et EUCAST aux autres antibiotiques testés pour lesquels seuls leurs CMI ont été fournis (Tableau 5).

Le pH du surnageant des 05 souches Gram (-) était proche de la neutralité, alors que celui de *Lb. plantarum* J34 était acide (Tableau 4)

Tableau 4.pH des surnageants après filtration

Souches	<i>E. coli</i> P2C	<i>E. coli</i> P2M	<i>Proteus</i> sp. P6C	<i>E. coli</i> P3M	<i>E. coli</i> I 1006	<i>Lb. plantarum</i> J34	
pH	6,73	6,74	6,64	6,53	6,64	Avant neutralisation 3,71	Après neutralisation 6,69

Après les tests de détermination de la nature de l'agent antimicrobien pour la souche *Lb. plantarum* J34, il s'est avéré qu'il s'agit de production d'acides organiques et que cette activité est liée à un abaissement de pH et non pas à la production de bactériocines (le surnageant a perdu son activité après neutralisation du pH et ne l'a pas perdu après son traitement par des enzymes protéolytiques), donc nous avons écarté cette souche pour une utilisation ultérieure (*cf* chapitre III).

II.1.2.2. Cinétique de croissance

La croissance des cinq souches suit une courbe logarithmique avec une atteinte de la phase stationnaire au bout de 8 heures d'incubation, atteignant un maximum de 3×10^9 UFC ml⁻¹, le nombre est resté stable jusqu'à 24 heures. L'activité a été détectée dans les surnageants après 6 heures de culture avec un maximum de 512 UA ml⁻¹ après 8 h d'incubation, l'activité antimicrobienne a été détectée lors de la phase de croissance exponentielle. La production de substances antagonistes était la plus élevée pendant la phase stationnaire de la culture. Pour certaines souches (*E.coli* P2C et *E.coli* P3M), l'activité a diminué après 12 heures d'incubation, alors qu'elle est restée stable pour les autres (figure 9).

Criblage et purification

Tableau 5. Sensibilité aux antibiotiques des souches sélectionnées avec interprétation

Antibiotique	Breakpoint	Référence	<i>E.coli</i> P2C		<i>E.coli</i> P2M		<i>Proteus sp</i> P6C		<i>E.coli</i> P3M		<i>E.coli</i> I1006	
			CMI (µg/ml)	I	CMI (µg/ml)	I	CMI (µg/ml)	I	CMI (µg/ml)	I	CMI (µg/ml)	I
<i>Colistine</i>	2-32	Eucast, 2016	0,39	S	0,39	S	0,39	S	0,39	S	1,56	S
<i>Novobiocine</i>			12,5	\	50	\	25	\	25	\	12,5	\
<i>Cloxacilline</i>			50	\	50	\	50	\	50	\	50	\
<i>Streptomycine</i>			25	\	25	\	25	\	25	\	50	\
<i>Neomycine</i>			25	\	25	\	25	\	25	\	12,5	\
<i>Chloramphenicol</i>	≤ 8-16 ≥32	CLSI, 2015	6,25	S	6,25	S	6,25	S	12,5	I	3,12	S
<i>Kanamycine</i>			12,5	\	12,5	\	12,5	\	12,5	\	6,25	\
<i>Erythromycine</i>			50	\	50	\	50	\	50	\	50	\
<i>Dicloxacilline</i>			50	\	50	\	50	\	50	\	50	\
<i>Vancomycine</i>			50	\	50	\	50	\	50	\	50	\
<i>Paramomycine</i>			25	\	25	\	12,5	\	12,5	\	12,5	\
<i>Acide Nalidixique</i>	≤ 16- ≥32	CLSI, 2015	3,12	S	3,12	S	3,12	S	3,12	S	3,12	S
<i>Polymixine B</i>			0,78	\	0,78	\	/	\	0,78	\	1,56	\
<i>Gentamycine</i>	≤ 4-8- ≥16	CLSI, 2015	3,12	S	3,12	S	6,25	I	12,5	I	3,12	S
<i>Penicilline G</i>			12,5	\	12,5	\	25	\	12,5	\	50	\
<i>Ampicilline</i>	≤ 8-16 ≥32	CLSI, 2015	6,25	S	6,25	S	6,25	S	50	R	50	R

I : interprétation

Criblage et purification

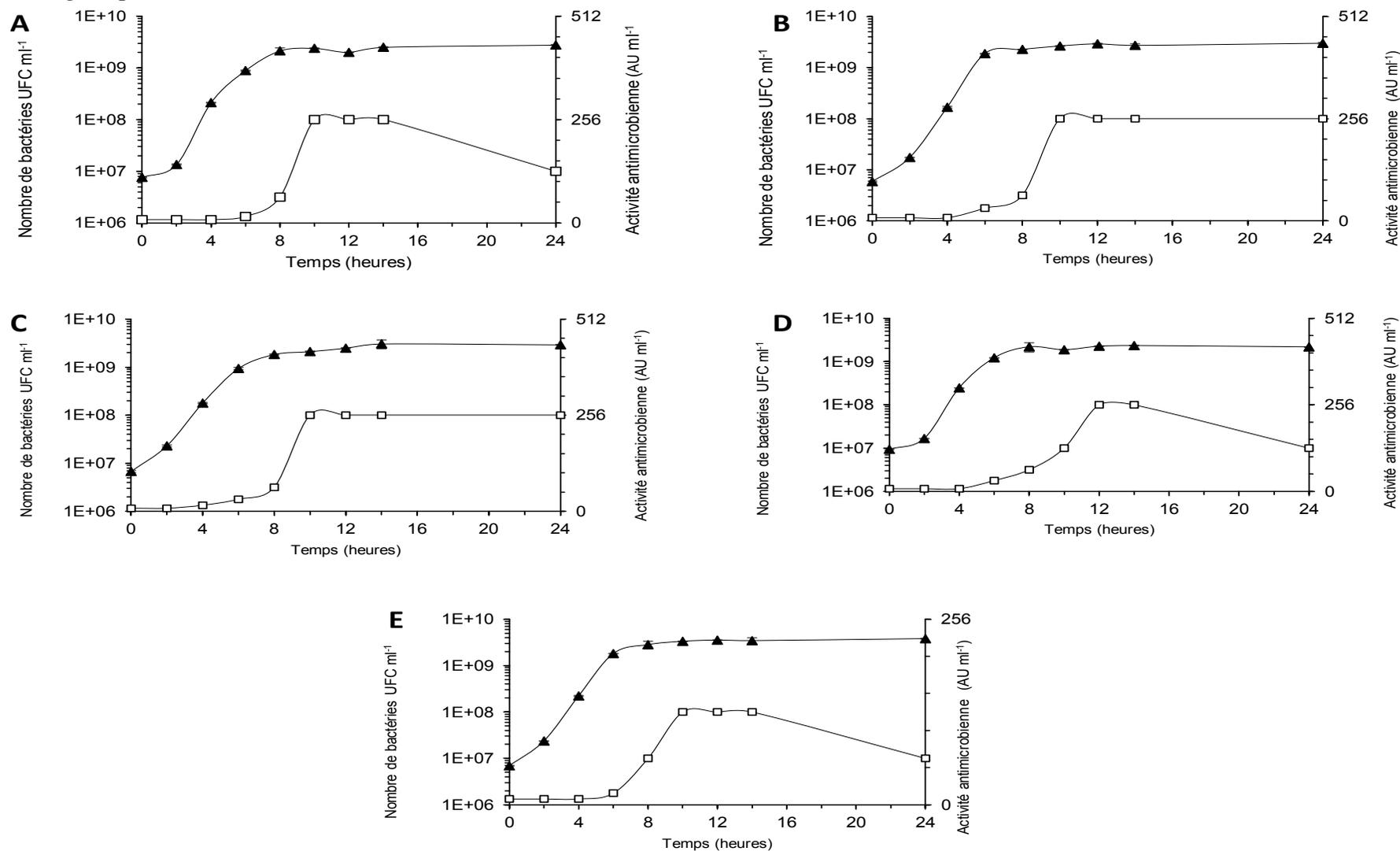


Figure 9. Courbes de croissance de souches inhibitrices (triangle), et leur production de substance inhibitrice (carré) dans du bouillon M63 à 37 °C. (A) *E.coli* P2C; (B) *E.coli* P2M; (C) *Proteus* sp P6C; (D) *E.coli* P3M; (E) *E.coli* I1006. Chaque valeur est la moyenne de deux répétitions indépendantes, les barres représentent les écart-types.

II.1.2.3. La sensibilité des bactériocines aux solvants, enzymes, au pH et aux traitements thermiques

Les surnageants conservaient leur activité antimicrobienne lorsqu'ils étaient exposés à des solvants organiques contenant du méthanol, de l'acétonitrile, du propanol et de l'hexane à l'exception du chloroforme (tableau 6).

Tableau 6. Effet des solvants organiques sur l'activité du surnageant des souches productrices

Solvant organique	Activité résiduelle (AU ml ⁻¹)				
	P2C	P2M	P6C	P3M	I1006
<u>Contrôle</u>	256	256	64	128	64
Méthanol	64	128	16	128	32
Hexane	128	128	64	256	16
Propanol	128	64	32	128	32
Acétonitrile	256	128	32	128	32
Chloroforme	08	08	08	08	08

Les effets des enzymes protéolytiques, du pH et de la température sur l'activité des bactériocines ont été évalués et résumés dans le tableau 7. Une inactivation partielle de la molécule inhibitrice a été observée à 80°C /10 min pour P2C, P2M et 100°C /30 min pour P6C et I1006.

De plus, les substances actives ont été fortement inactivées après le traitement à 121°C pendant 15 minutes (tableau 7). L'activité bactériocine était conservée à pH 2, mais diminuait lorsque le pH augmentait, à l'exclusion des bactériocines d'*E.coli* P2C et *E.coli* P3M qui conservaient une activité résiduelle même à pH 12. L'activité antimicrobienne était complètement sensible à toutes les protéases testées.

Tableau 7. Effet des enzymes, du pH et de la chaleur sur l'activité des bactériocines semi-purifiées

Traitement	Activité résiduelle (AU ml ⁻¹)				
	P2C	P2M	P6C	P3M	I1006
<u>Contrôle</u>	512	512	128	256	128
<u>Enzymes</u>					
Proteinase k	8	8	8	8	8
Pepsine	8	8	8	8	8
Trypsine	8	8	8	8	8
Subtilisine A	8	8	8	08	8
α chymotrypsine	8	8	8	8	8
<u>pH</u>					
2	512	512	128	256	128
4	128	64	32	256	16
6	128	32	32	256	16
8	64	32	16	256	16
10	64	32	08	128	08
12	32	08	16	32	08
<u>Température</u>					
80°C 10 min	256	256	128	256	128
80°C 30 min	256	256	128	128	128
100°C 10 min	256	256	128	256	128
100°C 30 min	256	128	64	128	64
100°C 60 min	64	64	32	128	64
121°C 15 min	32	16	16	32	16

II.1.2.4. Cross Test

Le test d'immunité croisée entre les producteurs de bactériocines a été réalisé contre les souches recombinantes d'*E. coli* produisant MccJ25, MccB17 (classe I), MccL (classe IIa) et MccD93, et présenté dans le Tableau 8. Les tests d'immunité du surnageant des souches productrices étaient positifs contre les souches productrices de la MccJ25, D93 et B17. Les zones d'inhibition variaient de 07 mm à 19 mm. Les surnageants des producteurs de bactériocine n'étaient pas actifs contre *E. coli* pL102, souche productrice de Mcc L, sauf pour P2C et P6C (tableau 08).

Tableau 8. Test d'activité croisée des souches sélectionnées et quelques souches productrices de microcines

Souches	Surnageants										<i>E.coli</i> pTUC202
	P2CCO2	P2C	P2M	P2MCo1- 2C	P2MCo1	P6C	P3M	I1004	I1006	I1026	
<i>E. coli</i> pTUC202= MccJ25	13	14	11	10	15	10	15	10	15	13	0
<i>E. coli</i> 93F= MccD93	13	15	19	19	16	13	10	11	17	13	0
<i>E. coli</i> pL102= MccL	0	07	0	0	0	13	0	0	0	0	20
<i>E. coli</i> pmm39=MccB17	13	15	17	17	16	12	12	11	15	13	0

II.1.2.5. Purification de la bactériocine

Après incubation pendant 12 heures avec agitation, 3L de surnageant ont été récupérés et passés dans une colonne SepPak. Le test d'activité effectué par les fractions récupérées a montré que la fraction active est celle obtenue à 60% d'acétonitrile (figure 10B). Après évaporation du solvant, la fraction active a été soumise au protocole de purification et a été passée à l'HPLC. Le profil chromatographique obtenu par HPLC préparative a eu plusieurs pics. Le passage du pic actif à postériori en HPLC analytique, un seul pic a été obtenu qui est apparu à 13,9 min et correspond à 34,45% d'acétonitrile comme représenté sur la figure 11A. Le rendement obtenu après purification totale est de 8 % avec une augmentation de l'activité spécifique. L'activité antimicrobienne est passée de 256 UA / ml dans le surnageant à 32768 UA / ml dans la fraction active pure (tableau 10).

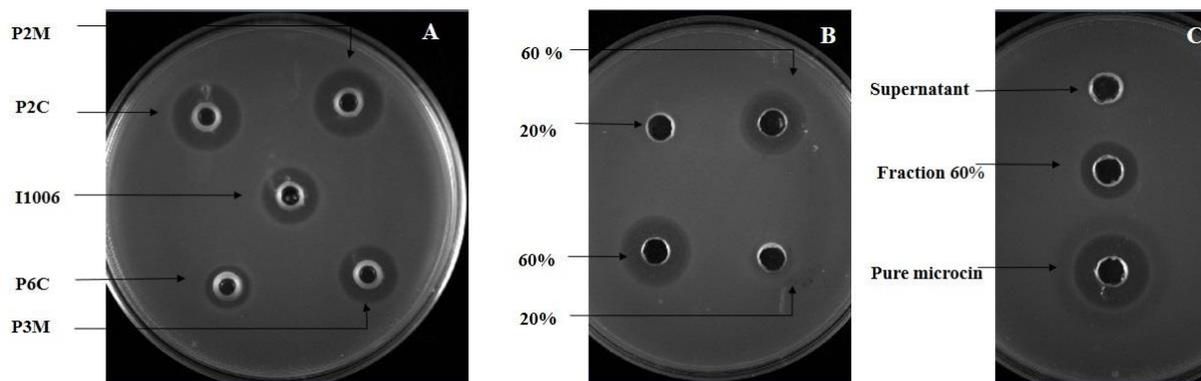
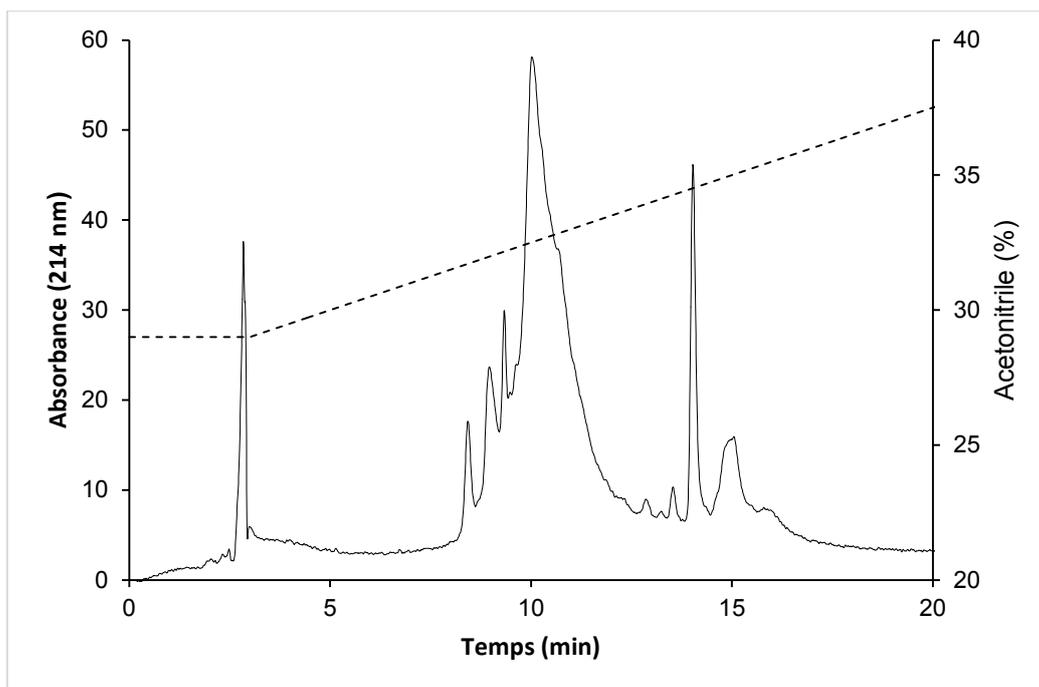


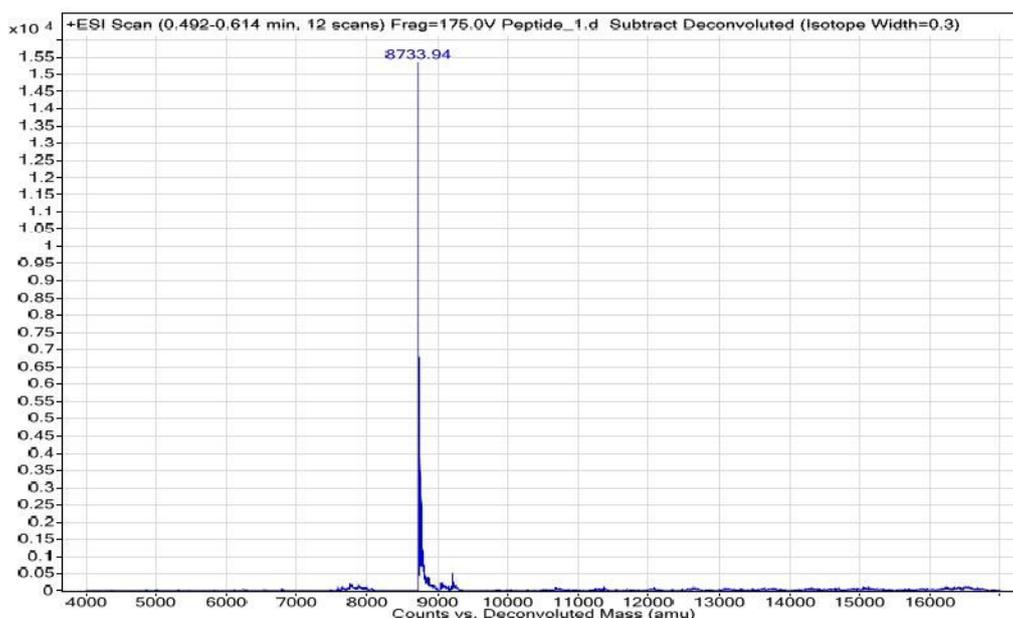
Figure 10. Activité antimicrobienne des souches productrices de bactériocines contre *E. coli* ATCC 35695 (A): L'activité des surnageants stériles; (B) Les fractions actives obtenues par chromatographie basse pression. Au-dessus, ceux de la souche *E. coli* P2C et au-dessous, celles de la souche *E. coli* P2M; et (C): Les étapes de purification

III.2.6. Spectrométrie de masse et séquence d'acides aminés

L'analyse par LCMS-MS de la fraction de microcine purifiée a révélé qu'un total de 22 peptides fragmentés différents provenant de la microcine V (BAC120) ont été identifiés. Un pic d'un poids moléculaire de 8733,94 Da (figure 11B) qui a été séquencé avec succès en acides aminés et la séquence des 62 résidus d'acides aminés N-terminaux est: (ASGRDIAMAIGTSLGQFVAGGIGAAAGGVAGGAIYDYASTHKPNPAMSPSGLGGTIK QKPEG). La masse moléculaire et la séquence d'acides aminés de cette molécule démontrent qu'elle correspond à la microcine V.



(A)



(B)

Figure 11. L'analyse par HPLC en phase inverse de la microcine. (A) Elution avec un gradient de 29-38% d'acétonitrile et d'eau contenant du HCl 0,5 mM. (Débit 1 ml min⁻¹). (B) Spectrométrie de masse de la microcine purifiée déterminée par LC-MS.

II.1.2.7. Spectre antimicrobien et CMI

Le tableau 9 résume les valeurs de CMI de la MccV purifiée par rapport à MccJ25 et à la colistine. Alors que le MccV purifiée était active contre certaines coliformes pathogènes

testées, y compris *E.coli* O157 H7, *E. coli* ATCC 35695, *E. coli* O26HM, *E. coli* O18, *E. coli* O2K1H4, *E. coli* ATCC 25922 et *E. coli* O1K1H7, aucune activité n'a été détectée contre *Salmonella*, *Vibrio* ou *Yersinia*. Les valeurs de CMI de la MccV allaient de 0,89 nM à 1517,94 nM, *E.coli* ATCC 35695 étant la souche la plus sensible (CMI = 0,89 nM) (Figure 12).

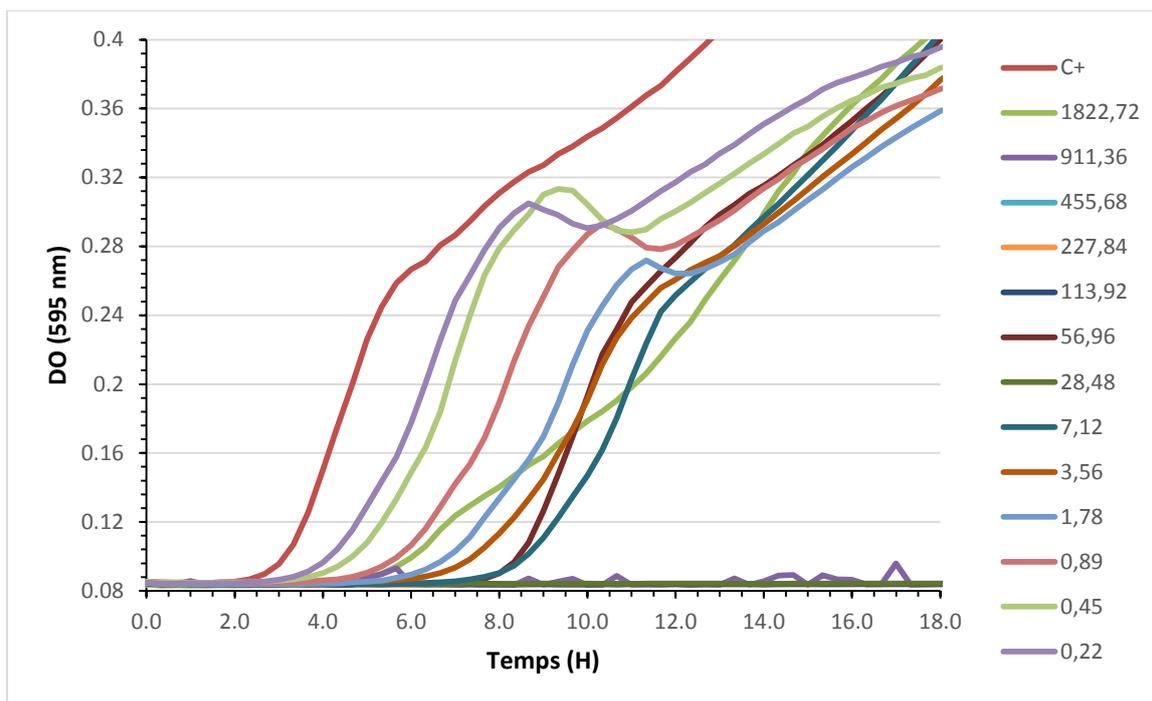


Figure 12. Détermination de la CMI de la Microcine V contre *E.coli* ATCC 35695 (nM).

La MccV était la plus puissante contre *E. coli* ATCC 35695 par rapport à la MccJ25 et au sulfate de colistine, qui avaient des valeurs de CMI respectives de 1,67 et 270,46 nM.

Tableau 9. Les concentrations minimales inhibitrices de la microcine V purifiée par rapport à la microcine J25 et la colistine sulfate.

Souches	CMI (nM)		
	Mcc V	Mcc J25	Colistine
<i>E.coli</i> ATCC 35695	0,89	1,67	270,46
<i>E. coli</i> O ₁₁ NM=Burton 461	-	26,77	270,46
<i>E. coli</i> O ₂₆ HM=Burton464	758,97	107,09	540,92
<i>E.coli</i> O18	1517,94	54831,66	540,92
<i>E.coli</i> O ₈ K ₂₅	-	-	540,92
<i>E. coli</i> O ₇₈ K ₈₀	-	-	540,92
<i>E. coli</i> O ₁ K ₁ H ₇	1517,94	3,35	540,92
<i>E. coli</i> O ₂ K ₁ H ₄	1517,94	26,77	1081,85
<i>E.coli</i> ATCC 25922	1517,94	107,09	1081,85
<i>E. coli</i> O ₁₅₇ H ₇ = Burton454	1517,94	214,19	540,92

(-) Aucune inhibition détectée

Inversement, la MccJ25 était la plus active contre *E. coli* O1K1H7 et *E. coli* O157 H7 avec des CMI de 3,35 et 214,19 nM, respectivement. Dans une moindre mesure, les deux souches étaient considérablement moins sensibles à la colistine (MIC = 540,92 nM) et MccV (MIC = 1517,94 nM).

Tableau 10. Bilan de purification de la microcine V produite par *E. coli* P2C

Étapes de purification	Volume (mL)	Concentration protéique (µg/mL)	Protéines totaux (µg)	AU/ml*	AU total	Activité spécifique (AU/µg)	CMI (ng/ml)	Rendement (%)
Surnageant	3000	315,07	945205,47	256	7,68E+05	1	9845,89	100
Bacteriocine semi purifiée	333	84,47	28130,14	512	1,70E+05	6,06	1319,92	22,13
Purification par HPLC	1,88	31,96	60,09	32768	6,16E+04	1025	7,80	8,02

* L'activité antimicrobienne [en unités arbitraires (UA)] a été déterminée par la méthode de dilution critique.

II.1.3. Discussion

Les microcines sont moins étudiées que les autres peptides antimicrobiens comme conservateurs d'aliments, en particulier parce qu'elles sont produites par des bactéries coliformes, que les organismes de réglementation ne les reconnaissent pas comme étant sûres, mais certaines de ces microcines ont une bonne activité antimicrobienne [130]. Cette partie de notre travail a principalement porté sur la purification d'un peptide antimicrobien à partir du surnageant d'une culture microbienne qui avait été identifié comme étant le peptide connu, la microcine V.

Vingt-sept souches ont été utilisées dans cette étude, isolées de l'intestin de porc et du jabot de poulet, onze d'entre elles avaient démontré une bonne activité. Six souches ont été sélectionnées qui présentaient la meilleure activité antimicrobienne. Quatre souches ont été identifiées comme étant *E.coli*, une comme *Proteus. sp* et une comme *Lb. plantarum*. Les souches sélectionnées étaient sensibles à tous les antibiotiques recommandés par le CLSI [205] et EUCAST [206] pour l'évaluation des entérobactéries sauf *E.coli* P3M et *E.coli* I1006 qui étaient résistantes à l'ampicilline. L'augmentation de la résistance des bactéries Gram-négatives est principalement due aux gènes mobiles sur les plasmides qui peuvent facilement se diffuser à travers les populations bactériennes [214].

La recherche de gènes de virulence dans les souches d'*E.coli* avait démontré qu'ils portaient le gène de l'aérobactine. Il a été confirmé que les souches d'*E.coli* les plus pathogènes possèdent et expriment le système aérobactine d'acquisition du fer [215] et que le gène codant pour l'aérobactine est présent sur le plasmide de la microcine V [216]. Les gènes codant pour Tsh et P ont été trouvés chez *E.coli* I1006 qui a été isolée du jabot de poulet, ces gènes sont généralement trouvés chez *E.coli* pathogènes aviaires (APEC) [215]. Les résultats obtenus nous ont conduits à l'importance de purifier et de caractériser la bactériocine pour une éventuelle utilisation ultérieure. *Lb.plantarum* J34 et malgré sa bonne activité antimicrobienne a été écartée parce qu'elle n'est pas productrice de bactériocines, cette souche a fait l'objet d'un travail présenté au chapitre III de cette partie.

La sécrétion d'agents antimicrobiens par les souches sélectionnées était en phase exponentielle, avec un profil similaire à la plupart des microcines connues, dont les activités sont exprimées en phase de croissance exponentielle ou stationnaire. Pendant la phase stationnaire, il y avait une stabilisation de l'activité de la microcine puis une diminution qui pourrait être liée à la dégradation du peptide par des protéases endogènes bactériennes [217].

Les agents antimicrobiens étaient actifs contre les souches productrices de MccJ25, mcc93F, mccL et mccB17 suggérant que les microcines produites n'appartiennent pas à l'un de ces groupes [214]. Bien que dans une étude antérieure, Sablé [174] ait utilisé une souche d' *E.coli* appelée *E.coli* LR05 qui produisait quatre microcines différentes (B17, D93, J25 et L) et était résistante à la Mcc V.

L'activité inhibitrice des cinq substances bactériennes semi-purifiées était sensible aux traitements enzymatiques protéolytiques utilisés, ce qui indique leur nature protéique [200], insensible à 100°C pendant 30 min, stable à pH acide (= 2) mais instable dans des conditions alcalines (pH > 10) et tous les cinq étaient stables lorsqu'elles étaient exposés à des solvants organiques à l'exception du chloroforme. Ces observations indiquent que les composés antimicrobiens sont stables. Le caractère de stabilité thermique de ces substances a démontré la capacité de leur utilisation potentielle comme conservateur alimentaire, car de nombreuses procédures de transformation des aliments impliquent une étape de traitement thermique. Leur grande résistance au pH est également très profitable pour les applications demandant des aliments aussi bien acides que non acides. De nombreux auteurs ont trouvé que les bactériocines qu'ils purifiaient étaient stables aux facteurs étudiés, mais certains d'entre eux étaient sensibles aux enzymes principalement la protéinase K et le pH élevé [218-223].

Dans notre étude et sachant que toutes les microcines connues sont solubles dans des solvants organiques [224], et surtout que l'acétonitrile n'affecte pas l'activité du surnageant incluant la microcine, la RP-HPLC a été utilisée pour purifier la microcine donnant un seul pic confirmant la pureté de l'échantillon. L'analyse de la microcine V purifiée par LC-MS a montré un seul composé majeur avec une masse de 8733,94 Da, qui est la même masse moléculaire rapportée par Duquesne [152] dans sa review et par Havarstein [225] lorsque ce dernier a purifié la microcine V provenant du producteur sauvage *E.coli* ATCC 14763, et d'un recombinant qui héberge pHK22 qui code pour les opérons de la microcine V. Cependant, Fath et al. [226] ont trouvé une masse moléculaire de 8741 Da. La microcine V a été séquencée avec succès par LC-MS-MS, et la séquence obtenue est la même que celle rapportée dans les bases de données Bactibase et Uniprot.

Les difficultés associées à la purification de la microcine V sont dues à son instabilité et à sa production en faibles quantités [166, 225]. Ainsi, elle a été purifiée avec un rendement de récupération de l'activité totale de 8% (Tableau 10) à partir de 3 litres de bouillon de culture. Ce rendement peut être dû aussi à l'inactivation de la microcine d'une manière ou d'une autre par liaison aux surfaces des flacons ou à d'autres composants dans le milieu [225]. En effet,

lorsque décrite la première fois par Gratia et al. [54], on a signalé que la microcine V était stable pendant 30 min à 120°C. Ensuite, elle a été purifiée par Havarstein [225] qui avait un rendement d'environ 0,5 mg dans 1l bouillon de culture, mais il avait utilisé une souche recombinante. La MccV purifiée a montré une bonne activité contre les coliformes pathogènes, en particulier *E. coli* O1K1H7 impliqués dans la colibacillose aviaire. Elle était également plus active que la colistine contre *E. coli* ATCC 35695. Bien que cette protéine ait été rapportée comme active contre les isolats cliniques de *Salmonella* [227], l'absence d'activité dans notre étude peut être due à des différences de souches.

Enfin, à travers cette étude expérimentale, nous avons mis l'accent sur la microcine V, notamment en ce qui concerne la mise en œuvre d'une procédure de purification rapide utilisant uniquement le système RP-HPLC, mais aussi l'étude de sa sensibilité aux traitements physico-chimiques.

II.2 Chapitre 2

Etude du mode d'action de la microcine V

Guide de lecture :

Ce chapitre est consacré à l'étude du mode d'action de la microcine V déjà purifiée. Plusieurs techniques récentes de biologie moléculaire, de microscopie électronique et de spectrofluorométrie ont été utilisées en vue d'une meilleure compréhension de son activité antimicrobienne.

II.2.1 Matériel et Méthodes

II.2.1.1 Cinétique de l'activité bactéricide de la microcine V contre *E. coli*

Pour élucider les effets de la microcine V sur la viabilité d'*E.coli* 35695, une culture en phase logarithmique de croissance a été ajustée à une DO₆₀₀ de 0,6. Un aliquote de la culture a été mélangé avec la microcine V à une gamme de concentrations (1, 10, 50, et 100× CMI). Les mélanges ont été mis à incuber à 37°C. Des prélèvements à chaque intervalle de temps ont été recueillis et utilisés pour le dénombrement de bactéries en unité formant colonie (UFC) [228].

II.2.1.2 Mesure de l'activité bactéricide en présence des lipopolysaccharides

Pour évaluer si l'endotoxine pourrait influencer l'activité du peptide, l'activité antimicrobienne de la microcine V contre *E. coli* ATCC 35695 a été mesurée également en présence des LPS. Une solution mère de microcine V à une concentration finale de cinq fois la valeur CMI pour cette souche a été pré-incubée avec une solution de LPS d'*E. coli* K12 souche LCD25 (List Biological Labs, inc, USA) à une concentration finale de 0,5 à 50 µg / ml pendant 30 min à 37°C. Ces solutions ont ensuite été ajoutées à une culture d'*E. coli* 35695 en phase de croissance (10⁷ UFC / ml) dans le bouillon LB et incubés à 37°C. La microcine V seule à la même concentration finale était utilisée comme témoin positif. Après 60 min d'incubation, 0,1 ml de cultures ont été prélevés, dilués dans de l'eau peptonnée à 0,1 % et le nombre de bactéries a été déterminé sur des boites de gélose LB. Les colonies ont été comptées après 18 h d'incubation à 37°C [229]. La sulfate de colistine (Toronto Research Chemicals, Canada) a été utilisé comme composé de référence à une concentration finale de 3,15 µg / ml, soit seule ou mise en incubation avec une solution de LPS à différentes concentrations finales comme a été décrit plus haut.

II.2.1.3 Test de dépolarisation membranaire

Pour analyser les perturbations membranaires dues à l'utilisation de la CMI de la microcine V, des bactéries d'une culture jeune d'*E.coli* ATCC 35695 (10⁶ cellules / ml) ont été récoltées par centrifugation et remises en suspension dans 1 ml de HEPES (tampon HEPES 5 mM, glucose 20 mM, 100 mM de KCl, pH 7,2). La colistine sulfate a été prise comme contrôle positif induisant une dépolarisation et le tampon HEPES comme contrôle négatif. Les

modifications du potentiel de la membrane ont été mesurées en ajoutant 3,30-dipropylthiocarbocyanine Iodure [DiSC3 (5)] et surveillance continue avec un spectrofluorophotomètre (Synergy H1 Microplate reader, Biotek) à une longueur d'onde d'excitation de 622 nm et une longueur d'onde d'émission de 670 nm. La réaction a été réalisée dans une microplaque noire (Dynex Microfluor® 2). L'expérience a été répétée trois fois pour s'assurer de la reproductibilité [230].

II.2.1.4 Marquage du peptide

Le peptide MccV a été marqué par la sonde réactive d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dissoute dans de l'acétone. La réaction de marquage a été réalisée dans un tampon borate 100 mM, pH 8,0, contenant un peptide: rapport de FITC de 1: 3 (v / v). Après deux heures à 25°C dans l'obscurité, le mélange a été repurifié sur une colonne C18 sur un système HPLC Backman en utilisant le gradient déjà utilisé pour la purification (*cf* Chapitre I) avec de l'eau pure acidifiée à l'HCl 0,5 mM (solvant A) et l'acétonitrile (solvant B) [231]. Le peptide marqué a été récupéré et l'acétonitrile a été évaporé sous azote (Praxair, Canada), ensuite le dosage des protéines a été réalisé par la méthode de Lowry (Biorad) et la CMI a été déterminée pour s'assurer que l'activité n'a pas été affectée.

II.2.1.5 Visualisation par microscopie à fluorescence

Une culture jeune d'*E.coli* ATCC35695 a été centrifugée à 5000g/5min, puis le culot a été resuspendu dans le tampon PBS. La suspension bactérienne a été mélangée avec le peptide marqué précédemment (1V/1V) et laissée 30 min au noir à la température de la pièce, puis elle a été centrifugée à 5000g / 5 min et le culot est lavé 3 fois par le tampon PBS et observé ensuite par microscope à fluorescence (Olympus BX51, Lampe X-Cite series 120 EXFO), la longueur d'onde d'excitation est de 490 nm, celle d'émission est 520 nm. Les photos obtenues ont été traitées au logiciel Image Pro Plus 7.0. [232]

II.2.1.6 La microscopie électronique à transmission (MET)

La MET a été effectuée afin de visualiser les changements de la morphologie intracellulaire d'*E. coli* 35695 pendant l'exposition à la microcine V. Une culture d'une nuit des bactéries dans le bouillon LB a été récoltée et lavée trois fois dans un tampon du phosphate de sodium (pH 7,4). A 100 µl de la suspension d'*E.coli*, nous avons ajouté 900 µl de la microcine V à 10 fois la CMI. Le tampon PBS a été utilisé comme contrôle négatif et la colistine sulfate à

0,45µg/ml comme contrôle positif. Après 5 et 30 min d'incubation à 37°C, des échantillons ont été lavés 2 fois au PBS puis fixés dans du PBS contenant le Glutaraldéhyde à 2,5% et laissés une nuit à 4°C [233]. L'observation au microscope électronique à transmission a été réalisée à la Plate-forme d'Imagerie Moléculaire & Microscopie, Institut de Biologie Interactive et des Systèmes, Université Laval, Canada.

II.2.1.7 Essai de retardation de l'ADN d'*E.coli* sur gel

L'ADN d'*E.coli* ATCC 35695 a été purifié en utilisant un kit d'extraction d'ADN (Qiagen, US) et remis en suspension dans la solution de réhydratation de l'ADN du même kit. Des expériences de retardation sur gel ont été réalisées comme décrit par Shi et al. [234]. En bref, 200 ng d'ADN ont été mélangés avec différentes quantités de microcine V (10, 100, 200, 400, 600 ng) dans un volume final de 19µl de tampon de liaison [5% de glycerol, Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM (éthylènediaminetétraacétique Acide), DL-dithiothréitol 1 mM et KCl 20 mM]. Le mélange réactionnel était incubé pendant 1 h à température ambiante puis soumis à l'électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%. La coloration a été faite au Gel Red (Biotium), les photos ont été prises sous lumière UV par un système Chemidoc MP (Biorad).

II.2.1.8 Mesure de l'activité hémolytique

Les érythrocytes ont été récoltées à partir du sang de cheval défibriné (Quelab, Montréal, QC, Canada) par centrifugation pendant 10 min à 5000g à 4°C, lavés deux fois dans du PBS (10 mM de phosphate de sodium, pH 7,4 dans NaCl 150 mM) et enfin mis en suspension dans du PBS pour utilisation immédiate. De cette suspension, 90 µl ont été déposés en triplicata dans une microplaque 96 puits contenant 100 µl d'une série de dilutions en deux de la microcine V dans le même tampon. L'hémolyse totale a été réalisée avec 1% de Triton X-100, et un blanc a été réalisé avec le tampon seul. La plaque a été mise en incubation pendant 1 h à 37°C, puis centrifugée pendant 5 min à 10 000 g à 4°C. Du surnageant obtenu, 150 µl ont été transférés dans une microplaque à fond plat et l'absorbance a été mesurée à 450 nm. L'hémolyse a été calculée en pourcentage [244]:

$$\frac{[(A_{450} \text{ de l'échantillon traité par la microcine V} - A_{450} \text{ de l'échantillon traité par le tampon}) / (A_{450} \text{ de l'échantillon traité par le Triton X-100} - A_{450} \text{ de l'échantillon traité par le tampon})]}{\times 100}$$
. Tous les échantillons ont été réalisés en triplicata.

II.2.2 Résultats

II.2.2.1 Cinétique de l'activité antibactérienne

L'effet de l'ajout de la microcine V sur les cellules sensibles a été étudié en utilisant différentes concentrations de peptide (1 x, 10 x, 50 x et 100 x la CMI) contre *E.coli* ATCC35695. Comme le montre la figure 13, l'addition de 10x la CMI a diminué le nombre d'*E.coli* de 2 unités logarithmiques en 1 h, et l'inhibition a duré 4 h avec une grande perturbation de la croissance bactérienne. Une concentration plus élevée de la microcine V (50 × la CMI) était plus préjudiciable à la souche indicatrice, avec une réduction d'environ 4.5 log CFU / ml après seulement 2 h de contact. En revanche, les bactéries ont repris leur croissance au cours des 8 h d'expérience. Mais la concentration à 100 x la CMI a été inhibitrice pour la bactérie cible à même pas 3 h de culture, puis une mort de la bactérie cible.

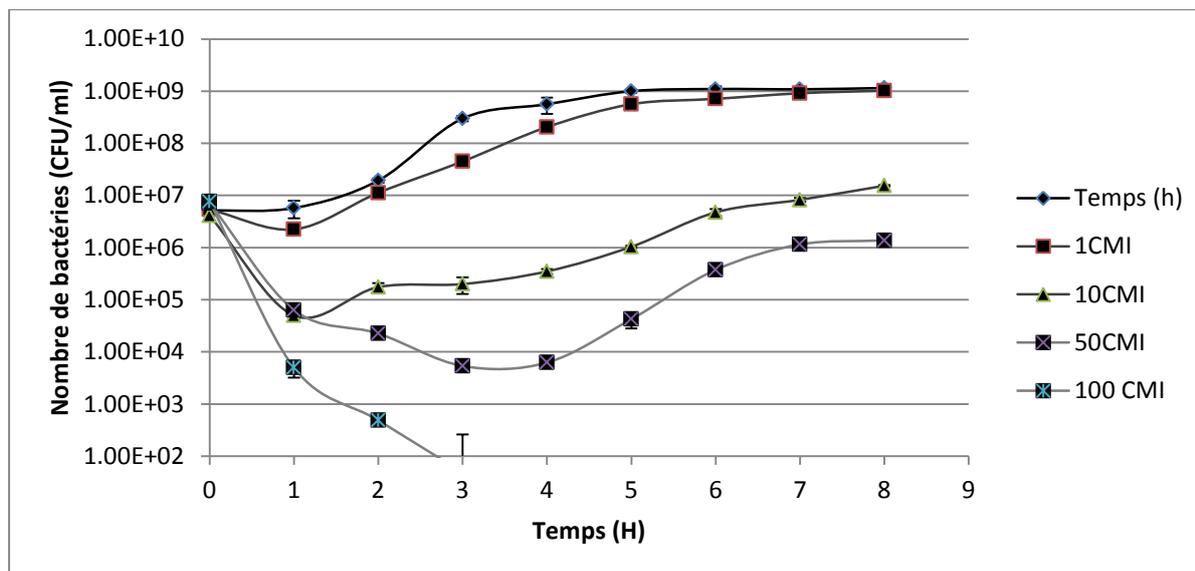


Figure 13. Action inhibitrice de la microcine V contre *E. coli* ATCC 35695, en absence et en présence de différentes concentrations de la CMI. Les valeurs sont des moyennes ± écarts-types.

II.2.2.2 Mesure de l'activité bactéricide en présence des LPS

Pour évaluer si les LPS pourraient influencer l'activité de la microcine V en s'y liant et en séquestrant le peptide, un essai de temps d'activité a été réalisé en incubant une solution de microcine V à une concentration cinq fois la valeur de la CMI avec les LPS d'*E. coli* K12 souche LCD25 à différentes concentrations (0,5 à 50 µg / ml). Le sulfate de colistine était également inclus comme composé de référence. La figure 14 montre l'activité de la microcine V et du sulfate de colistine contre *E. coli* ATCC 35695 en la présence des LPS. Les résultats obtenus semblent montrer que les LPS d'*E. coli* K12 influent l'activité de la microcine V contre *E. coli* ATCC 35695 de manière négative. Incubé avec les différentes concentrations de LPS, l'activité inhibitrice de la microcine V est supérieure quand la concentration en LPS est basse. De façon semblable, l'activité de destruction du sulfate de colistine à cinq fois sa valeur CMI dans les conditions testées semble être réduite en présence des LPS par rapport à l'activité bactéricide de Colistine seule.

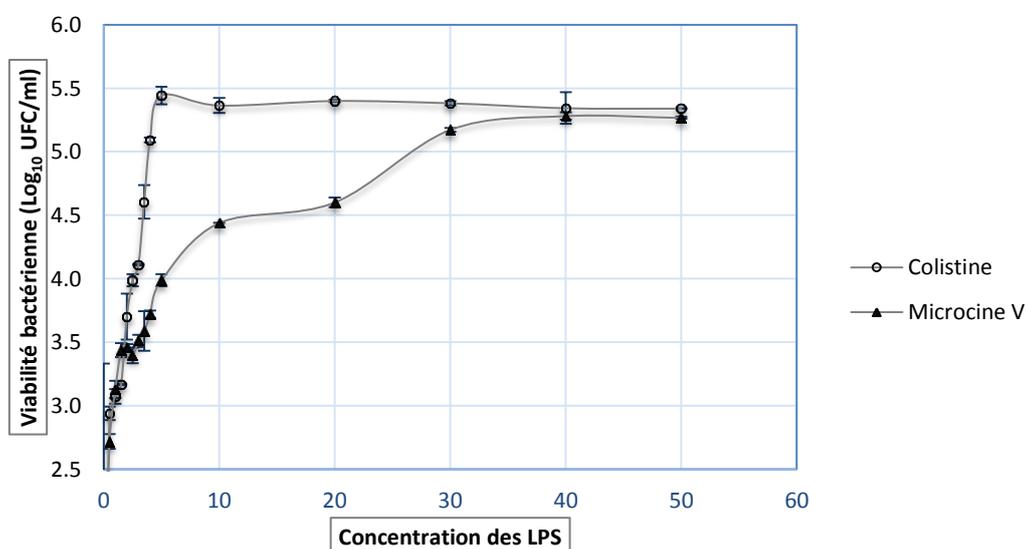


Figure 14. Activité de la microcine V en présence de LPS par rapport au sulfate de colistine.

II.2.2.3 La dépolarisation membranaire

L'essai utilise le DiSC3 (5), une sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire. La fluorescence de DiSC3 (5) diminue à mesure que le colorant se partage à la surface des cellules polarisées; la dépolarisation peut libérer le colorant déjà lié aux bactéries dans le milieu. Par conséquent, les cellules témoins produisent un signal bas et les cellules dépolarisées produisent un signal haut. Comme le montre la Figure 15, l'addition de la microcine V a dissipé le potentiel membranaire chez *E.coli* ATCC 35695. La dépolarisation complète a été obtenue par la colistine sulfate comparativement à la dépolarisation partielle obtenue par la microcine V. Les cellules témoins donnent une fluorescence basale.

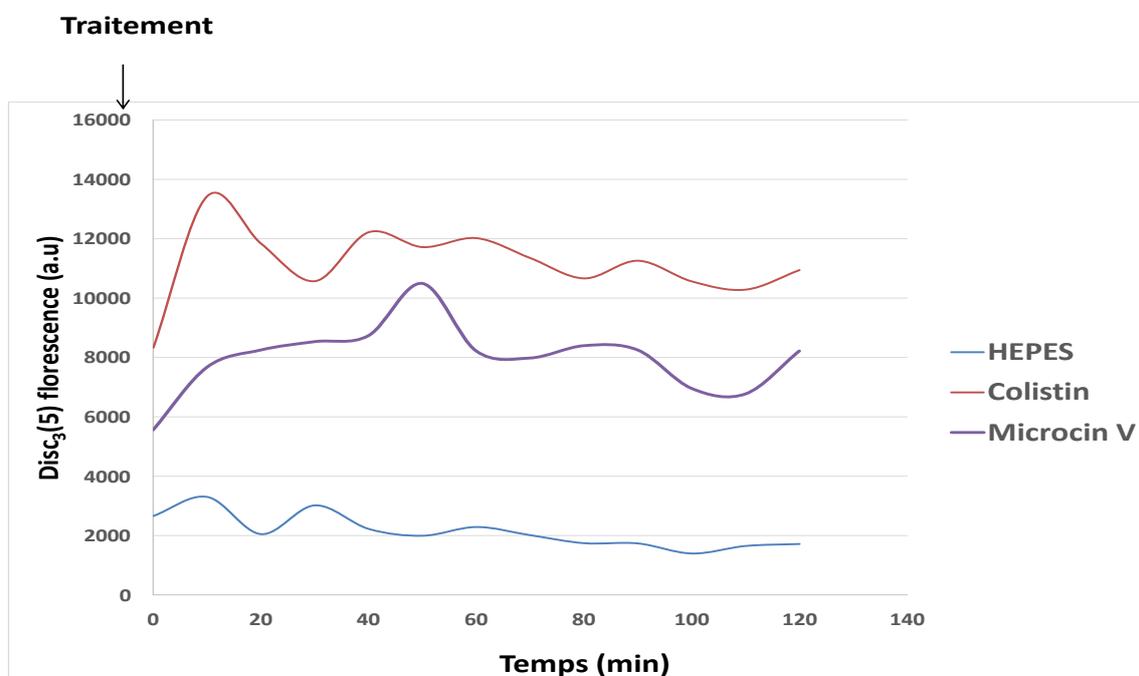


Figure 15. Variations d'intensité de fluorescence de DiSC3 (5) dans une suspension de cellules suite au traitement par la microcine V et la colistine sulfate.

II.2.2.4 Marquage à la Fluorescéine Isothiocyanate

La microcine V a été marquée à la Fluorescéine Isothiocyanate puis passée à l'HPLC analytique pour récupérer uniquement la microcine marquée et enlever l'excès de la FITC.

Le passage à l'HPLC analytique a donné un pic pur unique qui est légèrement décalé dans le temps du pic obtenu après passage de la microcine non marquée. L'ampleur du pic (concentration) a été diminuée également (Figure 16)

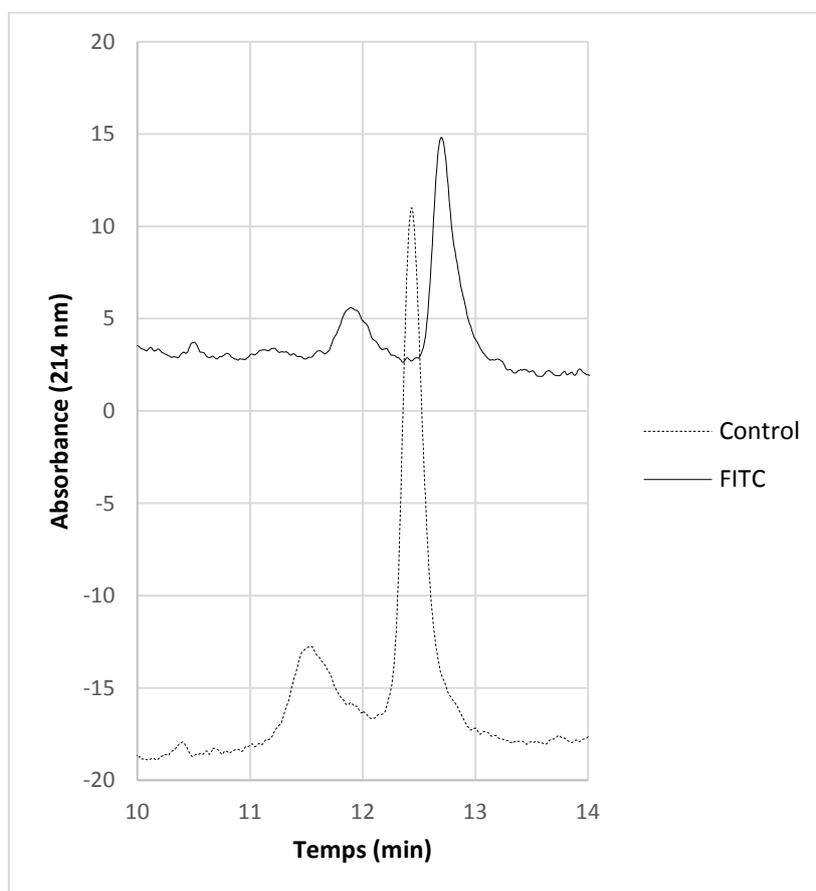


Figure 16. Profil HPLC analytique de la Microcine V marquée et non par la Fluorescéine Isothiocyanate

II.2.2.5 Microscopie à fluorescence

Pour examiner les sites cible de la microcine V chez *E. coli* ATCC35695, le peptide a été marqué avec FITC et visualisé sous la microscopie à fluorescence. Le peptide a été marqué par la FITC et purifié en utilisant une colonne HPLC en phase inverse C18. Le marquage de la microcine V avec la FITC n'a pas affecté son activité antimicrobienne. Comme montré dans la figure 17, la microcine V marquée par FITC s'est accumulée rapidement au cours des 30 minutes dans la membrane cellulaire. Basés sur les images de la microscopie à fluorescence, nous ne pouvons pas dire si la microcine V a pénétré dans les cellules ou tout simplement s'est accumulé sur la surface des cellules d'*E.coli*.

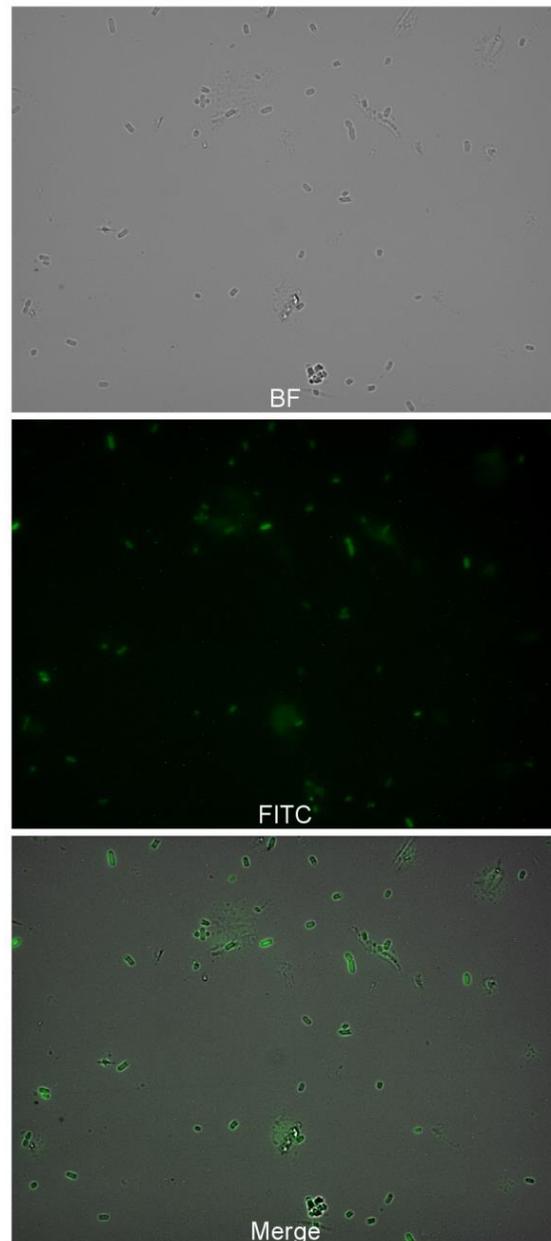


Figure 17. Images de microscopie à fluorescence d'*E.coli* ATCC 35695 traitée avec FITC-Microcine V pendant 30 min. (BF : Fluorescence Basale, FITC : Fluorescence captée, Merge : Fusion des deux images)

II.2.2.6 Microscopie électronique à transmission

Les cellules d'*E. coli* ATCC 35695 non traitées présentaient une forme cellulaire normale avec une structure intacte de la membrane interne et une structure intacte légèrement ondulée et bien définie (figure 18A). Après 5 min d'incubation des cellules d'*E. Coli* avec la microcine V à 10 fois la CMI, des lésions au niveau intracellulaire ont été détectées (figure 18B). C'est à 30 min d'exposition que les lésions intracellulaires deviennent plus visibles (figure 18C). La

figure 18D représente le contrôle positif qui est la colistine sulfate. Dans tous les cas, les cellules sont présentées avec des limites et des parois cellulaires altérées.

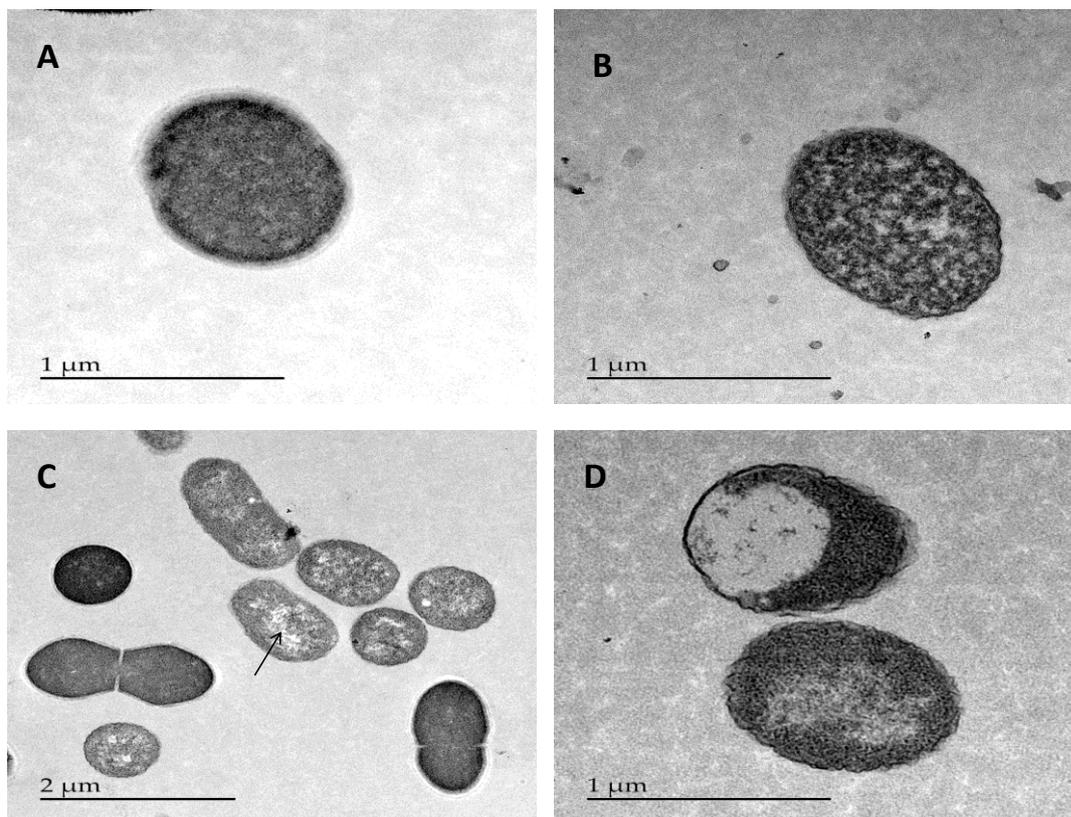


Figure 18. Aspect des cellules d'*E. coli* sous microscope électronique à transmission

(A) : *E. coli* ATCC 35695 non traitée, (B) : *E. coli* ATCC 35695 après 5 min de contact avec la microcine V, (C) : *E. coli* ATCC 35695 après 30 min de contact avec la microcine V, (D) : *E. coli* ATCC 35695 traitée au sulfate de colistine comme contrôle positif.

II.2.2.7 Essai de retardation de l'ADN d'*E. coli* sur gel

Dans une tentative de clarifier le mécanisme d'action moléculaire, nous avons examiné la propriété de liaison exercée par la microcine V sur l'ADN en analysant la mobilité électrophorétique des bandes d'ADN aux différents rapports pondéraux des peptides à l'ADN sur un gel d'agarose (1%, p / v). La microcine V a retardé la migration de l'ADN au-dessus du poids de 200 ng (figure 19). Ce résultat indique que la microcine V a des réactions plus ou moins étroites avec l'ADN de la bactérie cible.

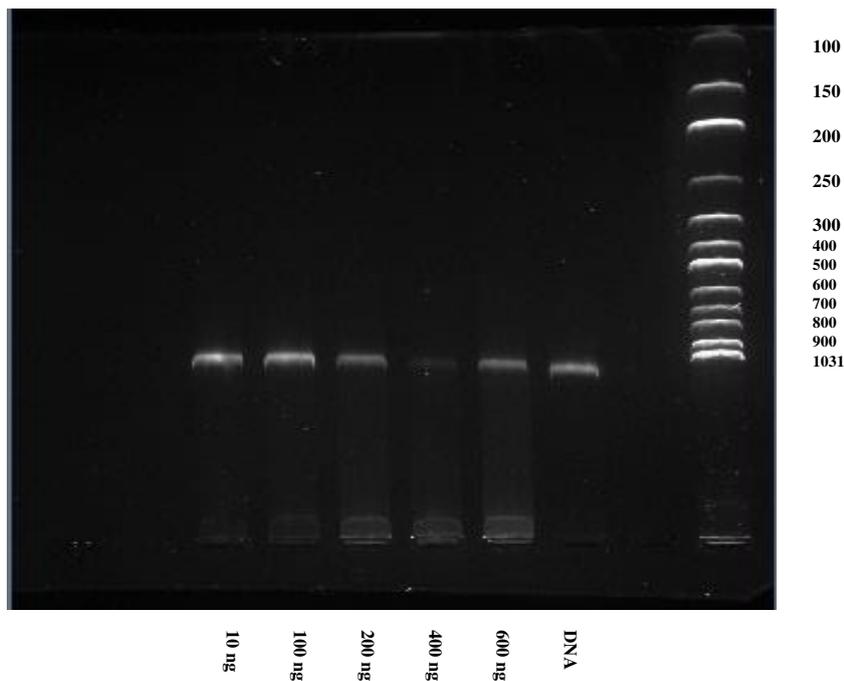


Figure 19. Résultats de l'essai de retardation de la migration d'ADN par la microcine V sur gel d'agarose.

II.2.2.8 Activité hémolytique

La sécurité *in vitro* de la microcine V a été évaluée en utilisant le test d'hémolyse. Cette bactériocine n'a pas été hémolytique à de faibles concentrations, la plus petite concentration testée contre les érythrocytes est 3x la CMI. L'hémolyse a augmenté de façon proportionnelle avec la concentration du peptide pour atteindre 30% à une concentration de 3,125 $\mu\text{g/ml}$ et restée stable ensuite suite à l'exposition à des concentrations plus élevées. La microcine J25 a été faiblement hémolytique < 7% à des concentrations fortes allant jusqu'à 50 $\mu\text{g/ml}$.

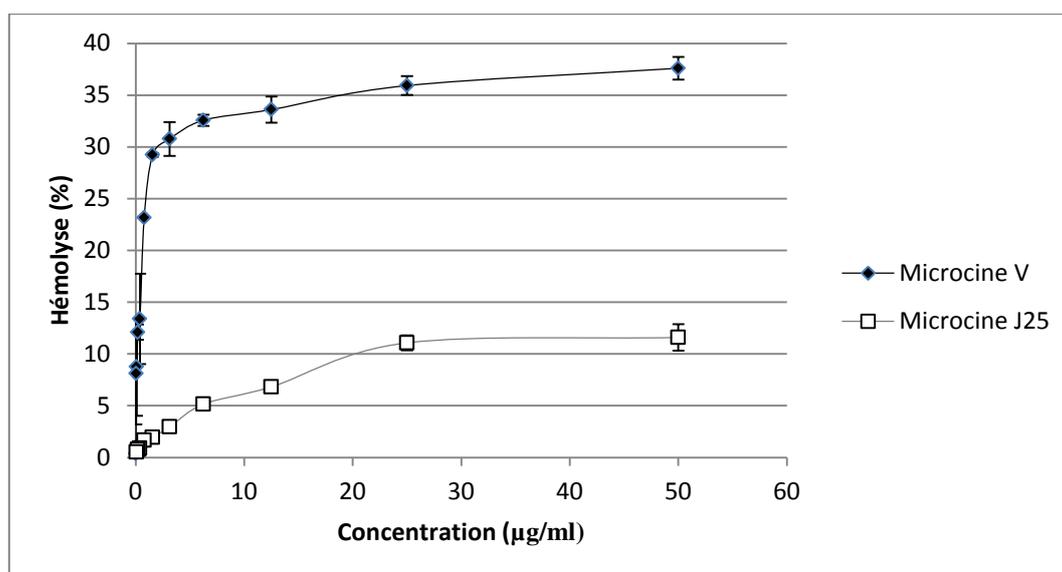


Figure 20. Activité hémolytique de la microcine V et la microcine J25 (moyennes \pm les écart-types)

II.2.3 Discussion

La grande variété des structures des microcines entraîne une diversité des mécanismes d'action, tels que l'inhibition des fonctions enzymatiques vitales et les dommages de la membrane interne. Cependant, les voies de reconnaissance initiales sont communes à plusieurs microcines. L'absorption de toutes les microcines étudiées dépend des récepteurs des sidérophores de la membrane externe et de leur système de transduction d'énergie, le complexe de la membrane interne TonB-ExbB-ExbD [235]. Il a été démontré que la MccJ25 nécessite l'interaction du récepteur ferrocchrome FhuA avec la membrane externe [236]. Alors que la MccE492, la MccH47 et la MccM lieraient les trois récepteurs du catécholate sidérophore, FepA, Fiu et Cir chez *E coli* et FepA, IroN, et Cir chez *Salmonella typhimurium* [237, 238], la reconnaissance de la MccV aurait besoin seulement de la protéine de la membrane externe Cir [166]. Ces microcines seraient ensuite transférées activement dans le périplasme via le système Ton (Ton B pour la MccV), qui utilise l'énergie de la force protonique à partir de la membrane interne [147]. Après une reconnaissance initiale sur des bactéries sensibles, les microcines agissent sur leurs cibles cellulaires pour exercer leur activité antibactérienne. En ce qui concerne la MccV, si aucune protéine d'immunité n'est présente, elle détruit la cellule en perturbant son potentiel membranaire. Le pouvoir de former des pores dans la membrane cytoplasmique de la bactérie n'a pas été démontré [239]. Il a

toujours été suggéré que la MccV tue les cellules sensibles en perturbant leur potentiel membranaire [164, 240]. Mais on ne sait pas si en plus, elle a une activité intracellulaire.

Dans notre étude, la microcine V purifiée a été bactéricide contre *E.coli* ATCC 35695 à une dose équivalente à $100 \times$ la CMI. La dose létale est peut être beaucoup plus moins que celle-ci, la microcine V étant très sensible et se dégrade vite, et c'est d'ailleurs, le principal facteur qui rend son étude difficile [225], ce qui fait que son activité diminue rapidement au cours de la conservation.

Compte tenu du spectre antimicrobien affiché par la microcine V, nous avons jugé intéressant d'explorer plus avant l'interaction du peptide avec les LPS, un composant majeur de la membrane externe des bactéries Gram-négative responsable du syndrome de réponse inflammatoire systémique et de troubles souvent mortels, qui peuvent suivre les infections à Gram négatif [230, 231]. La liaison directe de la microcine V aux LPS provenant d'*E. coli* K12 souche LCD25 a été testée en incubant la souche *E. coli* ATCC 35695 conjointement avec le peptide et différentes concentrations des LPS. Ce paramètre expérimental a révélé que la microcine V a une bonne affinité générale pour les LPS, comparable à celle de la colistine dans certains cas (surtout à fortes doses des LPS). Cette dernière constatation n'est pas nécessairement surprenante. En effet, des études antérieures ont démontré que la liaison forte d'un peptide aux LPS n'est pas suffisante pour bloquer l'activité biologique du LPS, et qu'il n'y a pas de corrélation directe entre l'activité antimicrobienne des peptides antimicrobiens et leur capacité à neutraliser les LPS [241].

Pour caractériser cinétiquement la dépolarisation du potentiel membranaire, plusieurs études [230, 242, 243] ont utilisé DiSC3 (5), une sonde fluorescente sensible au potentiel membranaire pour laquelle l'intensité de la fluorescence augmente lors de la dépolarisation membranaire, ce qui nous a incité à l'utiliser. Comme indiqué sur la figure 15, après que DiSC3 (5) a été ajoutée à la suspension de cellules bactériennes, elle a été absorbée et s'est concentrée dans la membrane en raison du potentiel membranaire, ce qui a entraîné une fluorescence stable. Après extinction de la fluorescence du DiSC3 (5), le traitement avec la microcine V a entraîné une augmentation progressive de l'intensité de fluorescence, tandis que la colistine sulfate a provoqué une augmentation rapide de l'intensité de la fluorescence, indiquant une dépolarisation membranaire. L'émission et l'augmentation de l'intensité de fluorescence de DiSC3 (5) indiquent des dommages cellulaires qui dépolarisent l'ingrédient électrique. Ces résultats ont confirmé que la microcine V causait des dommages cellulaires en perturbant le potentiel de la membrane cytoplasmique. Nous pouvons dire aussi que la

microcine V n'a pas principalement des protéines cibles mais un mécanisme membranaire pour ses effets microbicides car les mécanismes antimicrobiens ciblant les composants intracellulaires provoquent peu ou pas de dépolarisation des membranes [244].

Ensuite, et afin de construire un dérivé traçable de la MccV pour étudier l'incorporation de ce peptide dans des cellules vivantes, la microcine V purifiée est marquée avec la sonde réactive aux amines libres, la FITC. Bien que le peptide fluorescent s'avérait être moins puissant que la MccV native, mais l'activité contre *E.coli* ATCC35695 n'a pas été affectée. Les peptides doivent traverser la membrane cellulaire pour pouvoir affecter le fonctionnement d'une cible intracellulaire. Ainsi, les peptides marqués par fluorescence qui sont purement membraneux ne montreront de fluorescence que sur la membrane. Dans notre test, la fluorescence a été observée à travers des cellules entières, indiquant la capacité de la microcine V à se fixer sur la membrane externe d'*E.coli* et qu'elle rentre à travers celle-ci. Ce phénomène a été observé dans une étude réalisée par Taute [245], où deux peptides antimicrobiens synthétiques marqués par fluorescence ont été observés sur la surface cellulaire d'*E.coli*.

Les observations par la microscopie électronique à transmission ont révélé que les bactéries exposées à la microcine V avaient des membranes intactes et une morphologie intracellulaire altérée avec un grand nombre des cavités intracellulaires, qui est dû à la lyse des composés intracellulaires. Le nucléoïde n'était pas visible dans les contrôles, qui ont des parois cellulaires lisses et non cassés. Le contrôle positif pris était la colistine, pour son mode d'action connu par la dépolarisation membranaire. En effet, dans son étude sur le mode d'action de la colistine, O'Driscoll [246], avait remarqué que la souche d'*E.coli* exposée à la colistine, ne perd pas de potassium et sa membrane reste intacte.

Afin de faire une investigation sur si la microcine V provoque des altérations intracellulaires, nous avons réalisé le test de retardation de la migration de l'ADN sur gel, et celui-ci a révélé que quelques concentrations de la microcine V provoquaient une inhibition de la migration de cette molécule à des rapports (DNA: peptide) proches ou supérieurs à 1: 1. Les peptides positivement chargés ont très probablement formé des liaisons ioniques avec l'ADN chargé négativement [247]. Une molécule d'ADN moins négative se traduira par un mouvement retardé à travers le gel d'agarose, qui dans ce cas a entraîné l'apparition d'une bande juste en dessus du puits [234]. Dans d'autres études réalisées, l'ADN est soit resté partiellement dans le puits, ou ne migre pas indiquant une neutralisation complète des charges sur lui, comme par exemple NKLP27, un peptide antimicrobien induisant la dégradation de l'ADN bactérien [248]. Il a été montré qu'un autre peptide antimicrobien, l'indolicidine, provoque une

perméabilisations membranaire sans lyse cellulaire et possède des cibles intracellulaires possibles à travers lesquelles il tue les bactéries. Celui ci retarde le mouvement de l'ADN à des rapports ADN: peptide supérieurs à 1: 0,2 [249].

Enfin et pour s'assurer de la sécurité quant à l'utilisation de la microcine V, son activité hémolytique a été mesurée. La plus petite concentration testée était 3 fois la CMI, qui n'a pas été hémolytique, puis l'hémolyse a atteint un pourcentage de 10% à 12 fois la CMI. Quand on compare la microcine J25 à la microcine V, testées aux mêmes concentrations, on remarque qu'elle a un taux d'hémolyse très faible. En effet, le pourcentage maximum d'hémolyse pour elle était de 13%. Dans l'étude de Hammami [250], le pourcentage d'hémoluse causée par la Mcc J25 n'a pas dépassé 4,5%, mais la concentration testée était plus basse que la nôtre.

II.3. Chapitre 3

Effet de la supplémentation par *Lactobacillus plantarum* J34 sur la performance des poules pondeuses et la qualité des œufs

Guide de lecture :

*Ce chapitre est l'objet d'une étude in vivo sur des poules pondeuses déjà en production dont le régime est supplémenté par une souche de *Lactobacillus plantarum* J34. Une mesure de plusieurs paramètres zootechniques permettent d'évaluer l'effet sur les performances des poules, et des analyses physicochimiques estiment la qualité des œufs témoin par rapport à celles provenant du lot supplémenté.*

II.3.1 Matériel et Méthodes

II.3.1.1 Souche bactérienne

L'espèce *Lb.plantarum* J34 isolée du jabot du poulet fermier a été utilisée comme probiotique dans cette partie expérimentale. Cette souche a subi des tests d'évaluation de ses pouvoirs probiotiques, elle a été conservée à -20°C.

La souche a été revivifiée sur le milieu MRS après une incubation à 37°C pour son utilisation.

Le milieu de fermentation est composé du lait écrémé à 14% dans l'eau distillée. Le milieu a été réparti dans des bocaux de 1L en verre, stérilisé, refroidi puis inoculé à 1% de la culture bactérienne et laissé fermenter toute la nuit (18 heures). Après la fermentation le pH a été mesuré et un aliquote est prélevé pour la numération de bactéries viables, puis il a été entreposé à 4°C avant d'être destiné à l'élevage.

II.3.1.2 Effectif et conditions d'élevage

L'élevage visé est localisé dans la région de Lahmara, commune de l'Emir Abdelkader, Wilaya de Jijel, cette dernière se retrouve à 360 km à l'Est d'Alger –capitale de l'Algérie. L'élevage comptait trois milles (3000) poules de la souche ISA-Brown, qui avaient un âge de 29 semaines, et qui sont entrées en ponte à partir de la 18^{ème} semaine. Les poules sont réparties sur deux batteries de 3 étages à raison de 5 poules par cage.

Les batteries ont des dimensions de 20 m de longueur sur 1,5 m de largeur et sont surélevées de 0,25 m du sol. Les cages ont une longueur et une largeur de 40 cm et une hauteur de 50 cm. Chaque cage était équipée d'un abreuvoir à tétine individuelle. La ventilation électrique est assurée par 04 extracteurs latéraux, avec une température ambiante et l'éclairage quotidien est maintenu en continu pendant 16 heures.

Les conditions d'élevage sont défavorables avec une très mauvaise hygiène et un entretien presque inexistant. Le bâtiment d'élevage se retrouve pas loin d'un axe routier ce qui engendre un état de stress pour les poules.

II.3.1.3 Alimentation, prophylaxie et traitement expérimental

L'aliment utilisé pour l'alimentation des poules est fabriqué *in situ* par l'éleveur lui-même selon la formule donnée au tableau 11.

Tableau 11. Composition et teneur en nutriments du régime basal fourni aux poules pondeuses

CMV(Kg)	Soja (Kg)	Mais (Kg)	Calcaire (Kg)	Son (Kg)	VTS (Kg)
1,5	22	63	9	5	0,03

Les poules sont vaccinées contre la maladie de Marek, la maladie de Newcastle, la bronchite infectieuse, la maladie de Gumboro et la variole aviaire.

Pour la réalisation de notre essai *in-vivo*, nous avons sélectionné 1000 poules que nous avons réparties en 02 lots, dont un témoin et l'autre expérimental. Les deux lots sont subdivisés en 10 répétitions dont chacune contenait 50 sujets. Les différents groupes de traitement ont été également répartis uniquement sur le niveau inférieur afin de minimiser l'effet du niveau de la cage et pour pouvoir contrôler la circulation de l'eau dans les abreuvoirs.

Les deux lots recevaient l'aliment de base susmentionné, mais le lot expérimental recevait en plus, une supplémentation en bactéries lactiques à base de la souche *Lb.plantarum* J34. La distribution a été faite dans l'eau de boisson. Le lait fermenté a été dilué à 1‰ dans l'eau de boisson pour éviter le colmatage et la sédimentation des composants probiotiques dans le système d'eau potable de la batterie.

II.3.1.4 Evaluation des performances zootechniques

Les poules ont été pesées au début (29 semaines d'âge) puis chaque semaine du procès. Les taux de mortalité ont été surveillés tous les jours. Les œufs étaient collectés quotidiennement et la production d'œufs était exprimée en taux de ponte (taux de ponte par poule présente). Les poids individuels des œufs ont été enregistrés en pesant individuellement 2 œufs par répétition par semaine (un total d'environ 720 œufs pendant l'expérience) utilisés pour calculer le poids moyen des œufs pour la période expérimentale. La masse totale des œufs a été calculée en divisant le poids des œufs par le nombre d'œufs analysés.

II.3.1.5 Evaluation de la qualité de l'œuf

Les examens de qualité des œufs et des coquilles (poids de la coquille, épaisseur de la coquille, poids du jaune, indice du jaune, poids de l'albumine et unités Haugh) ont été effectués. À cette fin, 15 œufs de la ponte du matin ont été prélevés au hasard dans chaque groupe le premier jour des 3, 6, 9, 12, 15 et 18 semaines (un total de 90 œufs par groupe pendant l'expérience). Les œufs ont été pesés individuellement par une balance de précision

(OHAUS/Scout-STX622). L'index de forme a été calculé par la formule : (diamètre/longueur)×100 [251] et l'index de solidité de la coquille a été calculé selon la formule de Mongin [252] Après que les œufs aient été cassés sur un support plat en plexiglas, la hauteur de l'albumine et du jaune a été mesurée avec un télémètre laser. La moyenne des deux mesures de la hauteur de l'albumine épaisse (une près du jaune et l'autre à la fin de l'albumine dense) ainsi que le poids de l'œuf ont été utilisées pour calculer le score de l'unité Haugh pour chaque œuf selon la formule de Haugh [253]. Un pied à coulisse a été utilisé pour mesurer le diamètre du jaune.

Les jaunes ont ensuite été séparés de l'albumen à l'aide d'une cuillère en Téflon. Avant que le poids du jaune ait été déterminé, les chalazes ont été enlevées avec une spatule et chaque jaune a été roulé sur du papier absorbant pour enlever l'albumine adhérent. Le poids de l'albumine a été calculé en soustrayant le poids du jaune et de la coquille du poids total de l'œuf. Pour déterminer le poids de la coquille, les coquilles ont été nettoyées de tout albumen adhérent, la membrane a été enlevée; les coquilles d'œufs ont ensuite été séchées à température ambiante. L'épaisseur de la coquille a été mesurée à 3 endroits différents (extrémités larges et étroites et au milieu) à l'aide d'un pied à coulisse et la valeur moyenne a été prise comme épaisseur. Les analyses de qualité interne et externe des œufs ont été effectuées dans les 24 heures suivant la collecte des œufs.

II.3.1.6 Physicochimie de l'œuf

II.3.1.6.1 Mesure de pH [254]

Le pH des œufs et de la matière fécale des poules est mesuré en utilisant un pH mètre (Hanna instruments) préalablement étalonné par deux solutions tampons de pH 4 et 7. Les échantillons ont été broyés en présence de l'eau distillée (en utilisant une proportion de 1 :10, p / v) dans un broyeur homogénéisateur.

II.3.1.6.2 Teneur en eau et matière sèche

La teneur en eau est déterminée sur une partie aliquote de 2 g de l'œuf entier homogénéisé et étalée dans une capsule en porcelaine puis séchée dans une étuve (Memmert) à une température de 103±2 °C [255]. La teneur en eau est calculée par la formule :

$$TE (\%) = (M1 - M2). 100/ P$$

Avec : TE % : Teneur en eau ; M₁ : est la masse de la capsule et l'échantillon avant étuvage (g) ; M₂ : est la masse de la capsule et l'échantillon après étuvage (g) ; P : est la masse de la prise d'essai (g).

La matière sèche est déterminée de la même façon que pour l'humidité, puis en appliquant la formule suivante :

$$\text{Matière sèche (\%)} = 100 - \text{TE (\%)}$$

II.3.1.6.3 Teneur en matière minérale (MM) et en protéines

Deux grammes (2g) de chaque échantillon des œufs ont été pesés sur une balance de précision (KERN 440-35A) et placés dans un creuset déjà séché et taré. Les creusets ont été placés dans un four à moufle (Thermolyne, 6000 France) à 550°C pendant 5h jusqu'à obtention d'une couleur grise claire ou blanchâtre [256]. Le pourcentage de matière organique est calculé comme suit :

$$\text{MM \%} = (M_1 - M_2) / P \times 100.$$

Avec, MM : matière minérale ; M_1 : la masse de creuset vide ; M_2 : la masse de creuset après l'incinération et P : la prise d'essai.

La teneur en azote a été estimée par la méthode de Kjeldahl. Basée sur la détermination de la quantité d'azote réduit présents dans l'œuf. La méthode de Kjeldahl est passée par trois étapes :

- Minéralisation : 5ml de chaque échantillon d'œuf entier homogénéisé ont été placés dans un matras (Gerhardt) de 250 ml contenant des billes de verre. 25 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré et 2 g de mélange des catalyseurs (sulfate de potassium et du cuivre) ont été ajoutés. Ensuite le matras a été placé sur la rampe de minéralisation. Le col est placé dans le dispositif d'aspiration des vapeurs jusqu'à ce que la solution est devenue limpide.
A la fin de la minéralisation, le matras a été refroidi soigneusement et 40 ml d'eau ont été ajoutés lentement. Le volume a été complété à 100ml avec de l'eau distillée.
- Distillation : 5 ml d'aliquote ont été pris pour la distillation vers le ballon de l'appareil à distiller. L'allonge a été ajustée pour qu'elle plonge au fond d'un erlenmeyer contenant 20 ml d'acide borique à 40g/l et 3 à 4 gouttes d'indicateur de Tashiro. Environ 40 ml de la solution de NaOH à 40% ont été ajoutés dans le ballon de distillation. Le NH_3 s'est dégagé sous forme d'ammoniac et arrivé dans l'acide borique, qui a viré à une teinte vert alcaline.
- Titration : le contenu de l'erlenmeyer est titré avec l'HCl à 0,01N jusqu'à ce que la couleur soit devenue gris sal.

Le pourcentage en azote est donné par la formule suivante [257]:

$$N\% = 14 (V_s - V_b) \times N/m \times 100.$$

Avec, V_s : volume de l'acide utilisé dans la titration (ml) ;

V_b : volume de l'acide utilisé dans la titration du témoin (ml) ;

N : normalité de l'acide ;

m : masse de la prise d'essai (g).

La teneur en protéine est calculée en multipliant le taux d'azote totale N (%) par un facteur 6,25.

II.3.1.6.4 Teneur en matière grasse totale

L'extraction de la matière grasse a été faite au moyen d'un appareil d'extraction continue de type Soxhlet et en utilisant l'éther de pétrole comme solvant d'extraction. 20g du jaune de chaque œuf est placé dans une cartouche d'extraction ; 200 ml d'éther de pétrole est versé dans le ballon d'extraction de 500ml déjà séché et pesé ; ensuite le ballon est chauffé pendant 1h30 jusqu'à épuisement de la matière grasse. Le solvant a été éliminé par évaporateur rotatif (Heidolph) et le ballon est pesé. Le pourcentage de lipides totaux de l'échantillon est donné par la formule suivante [258]:

$$\% \text{ lipides totaux} = \frac{M_2 - M_1}{P} \times 100.$$

Avec, M_1 : est le poids du ballon vide (g),

M_2 : est le poids du ballon après l'extraction et l'évaporation de solvant (g)

P : est le poids de la prise d'essai (g).

II.3.1.6.5 Teneur en glucides totaux et en β -carotène

Le dosage des glucides a été réalisé en utilisant l'antrone (9,10-dihydro 9-oxoanthracène) comme réactif et une solution mère de glucose (2g/l) comme standard. Les dérivés furfuraliques cendrés à l'antrone donnent des composés bleu-vert dont l'absorbance à 580nm est mesurée. Brièvement 0,5 g d'échantillon est mélangé avec 1ml de l'acide trichloroacétique (20%) puis centrifugés à 6000tr/mn pendant 25 mn. 100 μ l du surnageant est mélangé avec 4 ml d'antrone, puis chauffés à 80°C pendant 10 mn. L'absorbance a été mesurée à 680 nm et la quantité des glucides totaux est calculée en se basant sur le coefficient de corrélation de la courbe standard [259].

Les caroténoïdes des jaunes d'œufs ont été obtenus par extraction solide/liquide en utilisant la mixture hexane/acétone/éthanol (50/25/25, v/v/v). L'extrait est filtré puis transféré dans une ampoule à décanter, ensuite la phase organique est séparée de la phase aqueuse pour être

filtrée sur sulfate de sodium anhydre. La concentration de β - carotène est déterminée par spectrophotomètre en utilisant l'équation [260] : $[\beta\text{- carotène}] = 4,624 \times A_{450} - 3,091 \times A_{503}$.

II.3.1.7 Traitement statistique

Les résultats ont été donnés sous forme de moyennes et écart-types. La différence entre les moyennes de différents échantillons a été déterminée par l'analyse de variance à un facteur ANOVA (one way analysis of variance) par le logiciel Origin 6.0, et par le test de Student. Toutes les analyses ont été réalisées au seuil de signification de 5%. La valeur trouvée par le calcul peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur p tel que : différence significative ($p < 0,05$), hautement significative ($p < 0,01$) ou non significative ($p > 0,05$).

II.3.2 Résultats

II.3.2.1 Nombre de cellules

Le nombre de bactéries viables dans l'eau administrée aux sujets du lot expérimental a été jugé conforme aux spécifications expérimentales. Une concentration finale de *Lb. plantarum* J34 était de $7,3 \times 10^6$ ufc par ml d'eau.

→ Mensurations et paramètres de qualité des œufs

Les mensurations des œufs récoltés durant la durée de l'expérience sont données au tableau 12.

Tableau 12. Effets du probiotique sur les mensurations des œufs

	Diamètre (cm)	Longueur (cm)	Poids (g)	Poids de coquille (g)	Poids du blanc (g)	Poids du vitellus (g)
Témoin	4,37±0,27	6,33±0,51	63,82±5,88	7,82±0,93	37,70±0,77	20,02±1,24
Probiotique	4,50±0,17	6,17±0,40	65,97±6,83	7,66±0,68	36,87±1,04	22,21±1,01

D'après ces résultats, aucune différence n'a été observée concernant les mensurations des œufs issus du lot témoin et expérimental ($p > 0,05$). La morphologie de l'œuf et le poids de ses

constituants sont inchangés. Les valeurs données au tableau sont des moyennes des 18 semaines de l'expérience.

Les résultats de l'effet du probiotique sur les paramètres de qualité des œufs sont résumés dans le tableau 13

Tableau 13. Paramètres de qualité des œufs issus des deux lots

	Hauteur du blanc (cm)	Hauteur du vitellus (cm)	Diamètre du vitellus (cm)	Chambre à air (cm)
Témoin	0,63±0,08	1,70±0,15	4,07±0,10	0,31±0,1
Probiotique	0,75±0,20	1,68±0,27	4,20±0,15	0,23±0,15
	Index de forme	Index de solidité de la coquille	Épaisseur de la coquille (mm)	Unité Haugh
Témoin	70,61±0,55	8,48±0,94	0,37±0,04	62,06±1,93
Probiotique	71,89±0,24	9,15±0,70	0,39±0,03	62,97±2,64

Certains paramètres qui déterminent la qualité et l'état de fraîcheur des œufs ont été mesurés. Les résultats montrent que les œufs provenant du lot supplémenté en *Lb. plantarum* J34 ne présentent aucun changement par rapport aux œufs témoin en ce qui concerne les paramètres de fraîcheur (hauteur du blanc, chambre à air, hauteur du vitellus et unité Haugh) et de qualité (index de forme, solidité et épaisseur de la coquille). L'analyse statistique a montré une différence non significative des moyennes ($p>0,05$).

II.3.2.2 Effets du probiotique sur les caractéristiques physicochimiques des œufs

Les effets de la supplémentation par *Lb. plantarum* J34 sur la composition des œufs récoltés du lot témoin et le lot expérimental sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14. Caractéristiques physicochimiques des œufs issus des lots témoin et expérimentaux

	pH			Teneur en eau (%)	matière sèche (%)
	Albumen	Vitellus	Entier		
Témoin	8,27±0,43	6,34±0,19	7,46±0,14	71,44±1,69	34,60±4,74
Probiotique	8,15±0,38	6,20±0,14	7,21±0,16	71,23±1,10	35,26±3,24
	Matière minérale (%)	Lipides (%)	Protéines (%)	Glucides(%)	β-carotène (µg/g)
Témoin	0,94±0,03	32,02±2,56	12,78±1,20	0,75±0,21	5,14±0,08
Probiotique	0,92±0,02	30,11±1,46	12,56±1,12	0,71±0,07	4,92±0,03

Le pH du blanc, du jaune et des œufs entiers issus des deux lots sont presque les mêmes. De point de vue statistique, la différence n'est pas significative ($p>0,05$). La supplémentation par *Lb. plantarum* J34 n'a pas d'effet sur la teneur en eau et matière sèche ($p=0,9$), la teneur en lipides ($p=0,1$), protéines, glucides et en β-carotène ($p>0,05$).

II.3.2.3 Analyse de la matière fécale des poules

Les résultats obtenus sont portés sur le tableau 15. L'analyse de la matière fécale des poules montre que le pH de celle qui provient du lot supplémenté en *Lb. plantarum* J34 est inférieur à celui de la matière fécale provenant du lot témoin. Cette différence de la valeur de pH est hautement significative ($p<0,001$).

Tableau 15. pH et dénombrement des entérobactéries de la matière fécale des poules

	pH	Nombre d'entérobactéries ($\times 10^7$ UFC/g)
Témoin	7,34±0,24	1,82±0,18
Supplémenté	6,54±0,08**	3,86±0,48**

Le tableau 15 montre aussi que le nombre des entérobactéries dans la matière fécale provenant du lot expérimental est nettement supérieur à celui du lot témoin, où la différence est hautement significative entre les deux groupes ($p<0,001$).

II.3.2.4 Effet du probiotique sur le poids des poules, le taux de ponte et la mortalité

La figure 21 montre que le poids des poules est resté stable dans le lot témoin, et de même pour le lot supplémenté durant les 04 premières semaines avec une différence non significative ($p>0,05$).

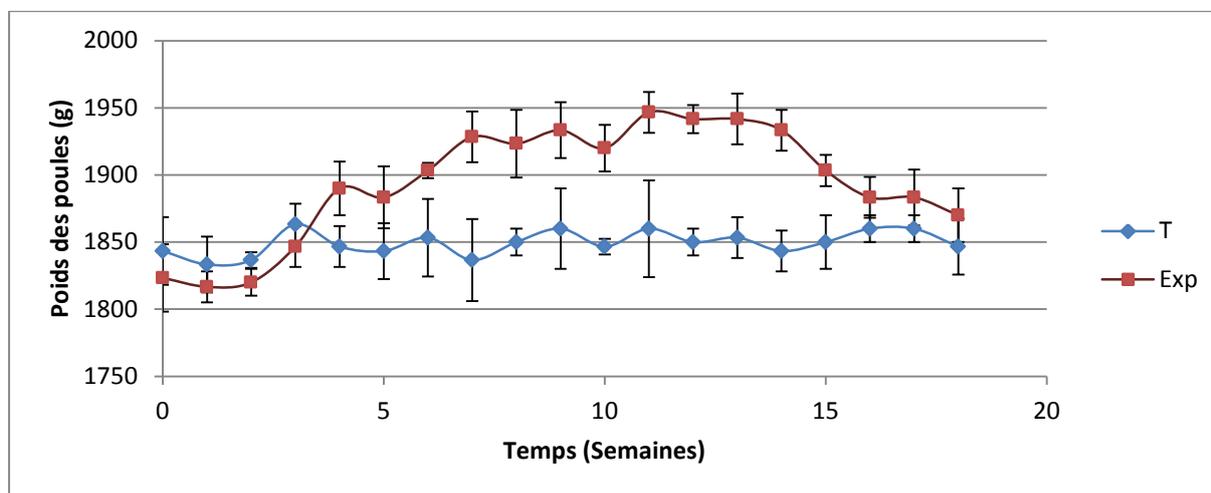


Figure 21. Variation du poids des poules durant les 18 semaines.

La supplémentation avec *Lb. plantarum* J34 a clairement démontré que cette souche améliorerait le poids corporel quotidien de poules (Figure 21). L'effet de cette souche probiotique a commencé vers la fin de la quatrième semaine. A la 11^{ème} semaine, cette supplémentation en souche a montré une augmentation significative ($p=0,008$) du poids corporel par rapport au groupe témoin du même âge (1946 g). La différence maximale du poids a été observée à la 12^{ème} semaine qui est de 91 g (avec une moyenne de 1941g au lot expérimental contre 1850 g au lot témoin). Cet effet positif du probiotique sur le poids corporel a persisté jusqu'à la fin de l'expérience (18^{ème} semaine), avec une valeur du poids corporel enregistrée de 1870 g et 1846 g dans le témoin respectivement.

Le taux de ponte dans le lot témoin et le lot supplémenté en *Lb. plantarum* J34 est présenté dans la figure 22.

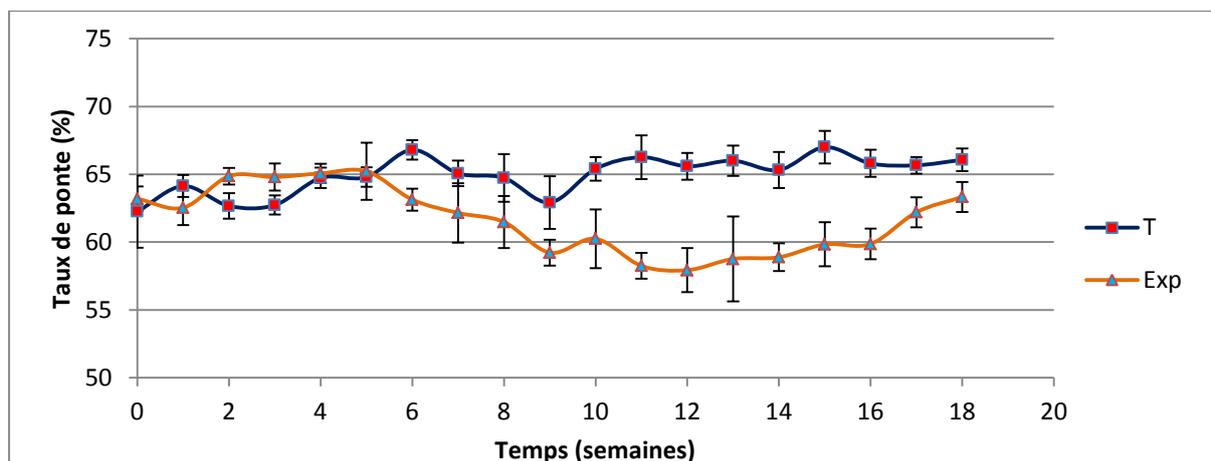


Figure 22. Evolution du taux de ponte dans les deux lots.

Le nombre des œufs pondus a été enregistré chaque semaine et exprimé en tant que taux de ponte. Celui-ci a montré de légères fluctuations autour d'une moyenne de 65% pour le lot témoin. Par contre dans le lot supplémenté en *Lb. plantarum* J34, une baisse de taux de ponte a été observée et qui est arrivée jusqu'à 58% à la 12^{ème} semaine. Une différence significative ($p < 0,05$) a été trouvée à l'analyse statistique.

Le taux de mortalité a été calculé par rapport aux poules de départ (500 sujets/lot), et le nombre des poules mortes a été enregistré chaque semaine (figure 23).

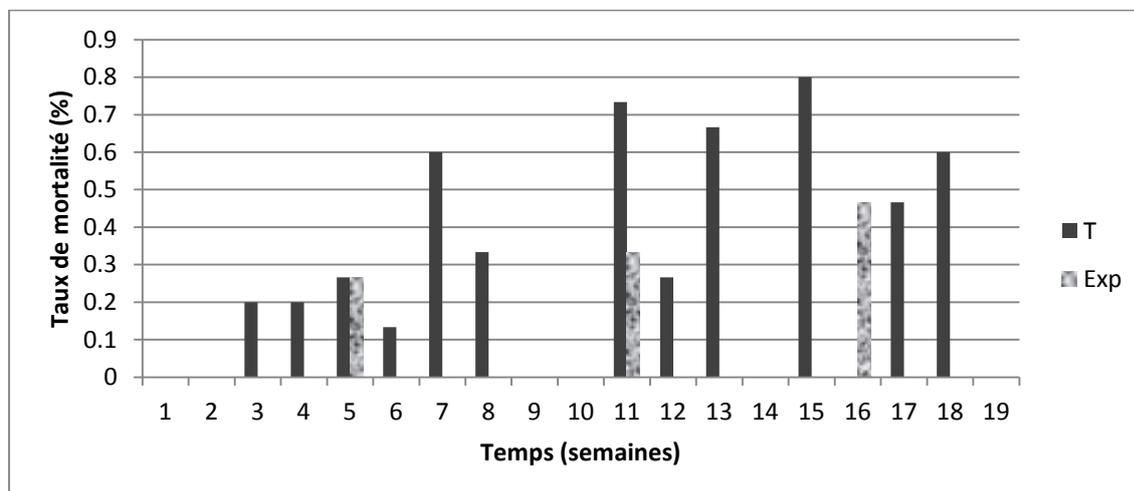


Figure 23. Taux de mortalité dans les deux lots durant les 18 semaines d'expérience.

La mortalité des poules dans le lot témoin était significativement supérieure à celle des poules du lot supplémenté ($p = 0,036$), celle-ci survient à des intervalles non réguliers et avec des

valeurs plus ou moins variables et dont le cumul chez le lot témoin est de 15,8%, alors que chez le lot expérimental il est de 3,2 % pour toute la période de l'expérience.

II.3.3 Discussion

En général, il a été suggéré que l'efficacité pour la plupart des probiotiques chez les animaux pourrait être démontrée avec un apport quotidien de 10^8 à 10^9 cellules [261]. Cependant, il est très difficile de comparer directement différentes études en utilisant différents probiotiques et différents niveaux d'administration parce que l'efficacité d'une application probiotique dépendra de nombreux autres facteurs. Parmi ces facteurs, les modes d'administration des probiotiques, pourraient affecter leur efficacité. Il semble que les probiotiques dans l'eau survivent aux conditions du système digestif supérieur, probablement en raison du temps de transit plus court par rapport à l'alimentation en particules solides. La capacité diluante de l'eau pourrait conférer un avantage supplémentaire en réduisant l'impact négatif de l'acidité gastrique et des sécrétions digestives comme la bile et les enzymes sur la capacité de survie des microorganismes probiotiques dans un milieu aqueux [81]. En outre, Les microorganismes sont plus actifs dans des conditions hydratées (dans l'eau) que dans la teneur en eau limitée des aliments secs (environ 90% de matière sèche), ce qui pourrait impliquer une plus grande sensibilité aux conditions environnementales. C'est pour ces raisons, nous avons pris le choix de distribuer notre probiotique dans l'eau de boisson. Néanmoins, l'apport continu d'un probiotique peut nécessiter de l'eau pure et peut interférer avec certains médicaments et nécessiter, de plus, un dispositif spécial pour un dosage approprié. De plus, il est à noter que certaines préparations probiotiques ne sont pas dispersibles dans l'eau et ne peuvent pas être administrées dans l'eau potable.

La supplémentation en *Lb.plantarum* J34 n'a pas amélioré significativement la forme des œufs. Ainsi, aucune différence n'a été remarquée concernant le poids et la taille des œufs issus du lot témoin et du lot supplémenté en probiotique. Le même résultat a été obtenu par Yörük et al. [98] ayant administré une culture composée de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, et *Enterococcus* spp. à des poules pondeuses mais les poids et les tailles des œufs étaient semblables à ceux du témoin. Le même constat a été évoqué par Pambuka et al. [262] qui ont utilisé deux genres *Lactobacillus* sp. et *Bacillus* spp. Dans d'autres études, une augmentation du poids a été signalée [261, 263]. Parallèlement, aucune différence n'a été observée sur les paramètres de la fraîcheur et de la qualité des œufs (hauteur du blanc, chambre à air, unité Haugh, épaisseur de la coquille et la composition physicochimique) des

deux lots. Ce qui a été déjà trouvé par Mahdavi et al. [264] qui n'ont trouvé aucune amélioration de l'épaisseur de la coquille et des unités haugh ; et par Guo et al. [265] qui ont trouvé que les hauteurs du blanc, la couleur du jaune et les unités Haugh n'ont pas changé suite à une supplémentation probiotique. C'est le cas aussi des résultats de l'étude menée par Ma et al. [266] où, ils n'ont pas obtenu une différence de qualité. Mais il y a aussi d'autres études aux résultats contradictoires, ainsi, Kalavathy et al. [267] ont observé une amélioration du poids, de la taille et de la teneur en cholestérol des œufs chez les sujets supplémenté avec des probiotiques. Yousefi et Karkoodi [82] ont montré que le poids de la coquille et son épaisseur, ainsi que le poids du jaune des œufs provenant des différents traitements étaient différents. De même, Mikulski et al. [261] ont trouvé une amélioration de la qualité des œufs chez les sujets aux probiotiques. Ceci pourrait être lié à la souche bactérienne, à la concentration et au mode d'administration des bactéries utilisées (dans l'eau ou dans l'aliment).

La supplémentation par *Lb.plantarum* J34 a clairement démontré que cette souche a amélioré le poids corporel des poules, cet effet a commencé à la cinquième semaine. C'est que, lorsqu'un inoculum de bactéries est introduit pour la première fois dans un milieu de croissance, il nécessite probablement une période d'adaptation à son nouvel environnement. Moins ces conditions sont optimales, plus la période d'adaptation est longue. La longueur de la phase de latence dépendra également de l'état des bactéries de l'inoculum. Pendant cette période, il n'y a pas d'augmentation nette du poids. Selon de nombreuses recherches, les probiotiques en tant que promoteurs de croissance ont pu augmenter le poids corporel des poules pondeuses et améliorer les indices de croissance du poulet de chair [268, 269]. Il y a une disparité quant à l'administration de probiotiques dans l'eau potable, Timmerman et al. [81] ont trouvé que ça entraîne généralement une augmentation plus faible du gain quotidien moyen comparativement aux études sur l'administration de probiotiques par voie alimentaire. Alors que Karimi Torshizi et al. [270] ont trouvé le contraire. Aussi, il a été suggéré que la présence de grands nombres des lactobacilles peut augmenter la motilité du contenu de l'intestin et améliorer la disponibilité ou l'absorption des nutriments, ce qui favorise la prise du poids [271].

L'augmentation du poids des poules a été accompagnée d'une baisse de la production des œufs, exprimée par une baisse du taux de ponte. L'étude menée par Lacin et al. [272] a montré que quand le poids corporel augmente, le poids de l'œuf augmente, mais la production d'œufs par jour diminue. Ce qui veut dire que la baisse du taux de ponte trouvée dans notre étude est peut être due à la prise de poids des poules suite à l'effet favorable du probiotique.

L'arrêt de l'administration de *Lb. plantarum* J34 est suivi par un léger retour du taux de ponte à la normale. Certaines études ont trouvé que les préparations probiotiques testées n'ont pas donné une amélioration du taux de ponte, c'est le cas des études de Ramasamy [72] qui a utilisé 12 souches de lactobacilles, et Asli [273] qui a supplémenté l'alimentation des pondeuses par 9 souches y compris *Lb. plantarum*. Par contre d'autres ont observé une augmentation de la production des œufs suite à la supplémentation par *Lb. sporogenes* [274], *Bacillus subtilis* [265] ou par *Bacillus licheniformis* [99]. Le traitement probiotique a induit une nette réduction de la mortalité, le même constat a été évoqué par Timmerman et al. [81] par ajout des probiotiques à l'eau potable chez le poulet de chair.

La présente étude a démontré l'effet de *Lb. plantarum* J34 dans la réduction des entérobactéries dans la matière fécale ($P < 0,001$) et l'abaissement du pH de celle-ci ($P < 0,001$). Comme démontré dans le chapitre I de cette partie, *Lb. plantarum* J34 produit essentiellement des acides organiques ce qui réduit considérablement le pH de son milieu de culture. Quelques études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les bactéries lactiques produisent une gamme de métabolites ayant un effet bactéricide sur les bactéries indésirables, telles que les bactériocines et les acides organiques. Les acides organiques présents dans les métabolites agissent de telle manière que, lorsque l'acide traverse la paroi cellulaire bactérienne, il se disperse dans l'environnement interne et réduit le pH [275]. Cela provoque la cessation des processus enzymatiques et l'effondrement de la force proto-motrice bactérienne. Ainsi, la croissance de la bactérie est inhibée, car son énergie restante est entièrement utilisée pour maintenir le pH interne pour la survie et non pour d'autres processus métaboliques. Ainsi, le nombre élevé des entérobactéries dans la matière fécale du lot expérimental est probablement dû à l'exclusion de celles-ci, qui ne peuvent pas s'adapter au milieu acide provoqué par la présence de *Lb. plantarum* J34. L'environnement acide favoriserait la croissance des bactéries lactiques, qui pourraient ensuite causer une production supplémentaire des acides organiques et composés antimicrobiens [276].

Conclusion générale

La résistance bactérienne aux agents antimicrobiens apparaît aujourd'hui comme l'un des principaux problèmes de santé publique. L'émergence et la propagation de souches bactériennes résistantes est résultantes de l'utilisation incontrôlée et abusive des antibiotiques conventionnels, combinée avec de nombreuses mutations génétiques qui se produisent dans le monde bactérien. L'étendue de cette résistance est renforcée par le retard dans le développement de nouveaux agents antimicrobiens pour éliminer cette résistance croissante sans cesse. Il devient impératif et urgent de développer de nouvelles classes de composés antimicrobiens. A cet égard, l'utilisation de peptides antimicrobiens est recommandée en raison de leur capacité à maîtriser l'apparition de résistances au sein des souches bactériennes impliquées. De par leur nature, leur variété et leurs différents mécanismes d'action, des peptides antimicrobiens représentent une alternative intéressante parmi les nouvelles stratégies pour contrôler la résistance bactérienne.

C'est dans cette optique que nous nous sommes fixé comme objectif la recherche de nouvelles souches bactériennes productrices de bactériocines, afin de les utiliser comme probiotiques. Pour ce faire, et dans un premier temps, nous avons criblé des souches bactériennes provenant du tractus gastro-intestinal du poulet et du porc, et les meilleures souches ont été sélectionnées.

Dans une première partie expérimentale, nous avons sélectionné six souches qui avaient une bonne activité antimicrobienne, qui a été dirigée essentiellement contre *E.coli*. Cinq de ces souches étaient des Gram- dont quatre sont des *E.coli* et une *Proteus* sp. et la sixième est un *Lb.plantarum* comme confirmé par l'analyse du 16S rDNA. Ces souches ne portaient pas de gènes de virulence sauf pour *E.coli* I1006, et étaient sensibles à la plupart des antibiotiques testés. Nous avons pu purifier la bactériocine de la souche la plus efficiente *E.coli* P2C, en utilisant un passage sur des colonnes chromatographiques C18 à basse pression et à haute pression. Après analyse de la LC-MS/MS, il s'est avéré qu'il s'agit de la microcine V. Cette dernière a montré une bonne résistance aux solvants organiques, aux variations de pH et à différents couples temps/température, mais elle était sensible aux enzymes. Cette microcine V purifiée avait une activité essentiellement anti *E.coli*, avec une CMI contre *E.coli* ATCC 35695 de 0,89 nM.

L'investigation faite au second chapitre de la partie pratique sur le mode d'action de la microcine V a permis de démontrer que cette dernière avait une activité bactériostatique à faible concentration et bactéricide à des concentrations plus élevées avoisinant 100 fois la CMI. Elle avait aussi une bonne affinité avec les LPS provenant d'une souche d'*E.coli*. Nous avons pu démontrer également en utilisant la sonde fluorescente FITC, que cette microcine se dépose sur toute la surface de la bactérie cible, puis induit une dépolarisation de la membrane bactérienne, comme démontré grâce à la sonde Disc 3(5). La microscopie électronique à transmission nous a aidé à démontrer que la microcine V provoque des lésions intracellulaires, et ceci a été confirmé par le test de retardation de la migration de l'ADN sur gel d'agarose suite aux interactions de ce dernier avec la microcine V. A la fin de cette étude, nous avons démontré que la microcine V n'est pas hémolytique à de faibles concentrations, et que l'hémolyse commence lors de l'utilisation des concentrations élevées.

La troisième partie s'est focalisée sur l'effet probiotique lié à la supplémentation de la ration de la poule pondeuse par *Lb. plantarum* J34, souche déjà criblée. Les résultats ont montré que cette supplémentation n'a pas changé les paramètres de qualité et de fraîcheur des œufs, mais elle a abouti à une diminution du pH de la matière fécale des poules, ainsi qu'à une augmentation du nombre des entérobactéries dans la matière fécale qui sont chassées suite à cet abaissement du pH. Néanmoins, la supplémentation a amélioré considérablement le poids des poules, mais ceci a conduit à une baisse de ponte traduite par une chute de taux de ponte. Elle a amélioré par contre le bien-être animal, ce qui a réduit de façon remarquable le taux de mortalité. A l'issue de ce chapitre, on peut conclure que la souche *Lb.plantarum* J34 sera de préférence destinée à l'élevage du poulet de chair.

Perspectives

Actuellement, beaucoup de laboratoires de recherche de renommées internationales travaillent sur l'axe relatif à la recherche de nouveaux agents antimicrobiens. Nous prévoyons dans un futur proche faire ce qui suit :

- Elargir l'éventail de la recherche en essayant d'isoler de nouvelles souches bactériennes avec un fort pouvoir bactériocinogène à partir des niches écologiques différentes, ce qui permettra leur utilisation dans des domaines variés, aussi bien dans le domaine alimentaire que dans l'élevage des animaux de production ;

- Quant à la microcine V, une optimisation de sa purification est nécessaire, afin d'avoir un bon rendement de purification. Ainsi qu'une amélioration des modes de sa conservation à cause de sa dénaturation ;
- Nous essayerons de continuer à chercher à comprendre son mode d'action, et surtout ses interactions avec le matériel génétique des souches sensibles comme l'ARN polymérase ;
- En ce qui concerne la souche *Lb.plantarum* J34, elle sera utilisée comme supplément dans l'alimentation du poulet de chair, afin d'évaluer son effet sur le gain du poids des carcasses et la qualité hygiénique, ainsi que sur les paramètres plasmatiques comme le taux de cholestérol. Et pourquoi ne pas, essayer de compléter l'alimentation d'autres animaux de production par cette souche pour explorer ses performances sur le bien-être animal.

Bibliographie

1. Castanon J: **History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds.** *Poultry science* 2007, **86**(11):2466-2471.
2. Dibner J, Richards J: **Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action.** *Poultry science* 2005, **84**(4):634-643.
3. Graham JP, Boland JJ, Silbergeld E: **Growth promoting antibiotics in food animal production: an economic analysis.** *Public health reports* 2007, **122**(1):79-87.
4. Cheng G, Hao H, Xie S, Wang X, Dai M, Huang L, Yuan Z: **Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?** *Front Microbiol* 2014, **5**.
5. Seal BS, Lillehoj HS, Donovan DM, Gay CG: **Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production.** *Animal health research reviews* 2013, **14**(1):78-87.
6. Millet S, Maertens L: **The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: from challenges to opportunities.** *The Veterinary Journal* 2011, **187**(2):143-144.
7. Dowarah R, Verma A, Agarwal N: **The use of Lactobacillus as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review.** *Animal Nutrition* 2017, **3**(1):1-6.
8. McCoy S, Gilliland S: **Isolation and characterization of Lactobacillus species having potential for use as probiotic cultures for dogs.** *Journal of food science* 2007, **72**(3).
9. Cho IJ, Lee NK, Hahm YT: **Characterization of Lactobacillus spp. isolated from the feces of breast-feeding piglets.** *Journal of bioscience and bioengineering* 2009, **108**(3):194-198.
10. Walter J, Schwab C, Loach DM, Gänzle MG, Tannock GW: **Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of Lactobacillus reuteri TMW1. 106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract.** *Microbiology* 2008, **154**(1):72-80.
11. Cotter PD, Hill C, Ross RP: **Bacteriocins: developing innate immunity for food.** *Nature Reviews Microbiology* 2005, **3**(10):777-788.
12. Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C: **Bacteriocin production: a probiotic trait?** *Appl Environ Microbiol* 2012, **78**(1):1-6.
13. Gillor O, Etzion A, Riley M: **The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, **81**(4):591-606.
14. Moore P, Evenson A, Luckey T, McCoy E, Elvehjem C, Hart E: **Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick.** *Journal of Biological Chemistry* 1946, **165**:437-441.
15. Anderson AD, Nelson JM, Rossiter S, Angulo FJ: **Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States.** *Microbial Drug Resistance* 2003, **9**(4):373-379.
16. Jones F, Ricke S: **Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds.** *Poultry science* 2003, **82**(4):613-617.
17. Parker D, Armstrong D: **Antibiotic feed additives and livestock production.** *Proceedings of the nutrition Society* 1987, **46**(03):415-421.
18. Starr MP, Reynolds DM: **Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin.** *American Journal of Public Health and the Nations Health* 1951, **41**(11_Pt_1):1375-1380.
19. Van den Bogaard A, London N, Driessen C, Stobberingh E: **Antibiotic resistance of faecal Escherichia coli in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers.** *J Antimicrob Chemother* 2001, **47**(6):763-771.
20. Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I: **The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health.** *J Antimicrob Chemother* 2003, **52**(2):159-161.

21. Apajalahti J, Kettunen A, Graham H: **Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken.** *World's Poultry Science Journal* 2004, **60**(2):223.
22. Ravindran V, Kornegay E, Webb K: **Effects of fiber and virginiamycin on nutrient absorption, nutrient retention and rate of passage in growing swine.** *Journal of Animal Science* 1984, **59**(2):400-408.
23. Costa E, Uwiera RR, Kastelic JP, Selinger LB, Inglis GD: **Non-therapeutic administration of a model antimicrobial growth promoter modulates intestinal immune responses.** *Gut pathogens* 2011, **3**(1):14.
24. Dumonceaux TJ, Hill JE, Hemmingsen SM, Van Kessel AG: **Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**(4):2815-2823.
25. Miles R, Butcher G, Henry P, Littell R: **Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology.** *Poultry Science* 2006, **85**(3):476-485.
26. Helmboldt C, Bryant E: **The pathology of necrotic enteritis in domestic fowl.** *Avian diseases* 1971:775-780.
27. Thomke S, Elwinger K: **Growth promotants in feeding pigs and poultry. II. Mode of action of antibiotic growth promotants.** In: *Annales de Zootechnie: 1998.* EDP Sciences: 153-167.
28. Knarreborg A, Simon MA, Engberg RM, Jensen BB, Tannock GW: **Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**(12):5918-5924.
29. Abraham EP, Chain E: **An enzyme from bacteria able to destroy penicillin.** *Nature* 1940, **146**(3713):837.
30. Courvalin P, Cuot PT: **Minimizing potential resistance: the molecular view.** *Clinical infectious diseases* 2001, **33**(Supplement 3):S138-S146.
31. Baudry C, Brézellec H: **Microbiologie, immunologie:** Wolters Kluwer France; 2006.
32. Monnet DL: **Antimicrobial Drug Use and Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Aberdeen, 1996–2000-Volume 10, Number 8—August 2004-Emerging Infectious Disease journal-CDC.** 2004.
33. Carlet J, Ali AB, Chalfine A: **Epidemiology and control of antibiotic resistance in the intensive care unit.** *Current opinion in infectious diseases* 2004, **17**(4):309-316.
34. Džidić S, Šušković J, Kos B: **Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects.** *Food Technology and Biotechnology* 2008, **46**(1):11-21.
35. Buchanan N, Hott J, Cutlip S, Rack A, Asamer A, Moritz J: **The effects of a natural antibiotic alternative and a natural growth promoter feed additive on broiler performance and carcass quality.** *The Journal of Applied Poultry Research* 2008, **17**(2):202-210.
36. Vondruskova H, Slamova R, Trckova M, Zraly Z, Pavlik I: **Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review.** *Veterinarni Medicina* 2010, **55**(5):199-224.
37. Huyghebaert G, Ducatelle R, Van Immerseel F: **An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers.** *The Veterinary Journal* 2011, **187**(2):182-188.
38. Brennan J, Skinner J, Barnum D, Wilson J: **The efficacy of bacitracin methylene disalicylate when fed in combination with narasin in the management of necrotic enteritis in broiler chickens.** *Poultry science* 2003, **82**(3):360-363.
39. George B, Quarles C, Fagerberg D: **Virginiamycin effects on controlling necrotic enteritis infection in chickens.** *Poultry Science* 1982, **61**(3):447-450.
40. Snyder D, Wostmann B: **Growth rate of male germfree Wistar rats fed ad libitum or restricted natural ingredient diet.** *Laboratory animal science* 1987, **37**(3):320-325.
41. Feighner SD, Dashkevicz MP: **Subtherapeutic levels of antibiotics in poultry feeds and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity.** *Appl Environ Microbiol* 1987, **53**(2):331-336.

42. Knarreborg A, Lauridsen C, Engberg RM, Jensen SK: **Dietary antibiotic growth promoters enhance the bioavailability of α -tocopheryl acetate in broilers by altering lipid absorption.** *The Journal of nutrition* 2004, **134**(6):1487-1492.
43. Coates ME, Fuller R, Harrison G, Lev M, Suffolk S: **A comparison of the growth of chicks in the Gustafsson germ-free apparatus and in a conventional environment, with and without dietary supplements of penicillin.** *British journal of nutrition* 1963, **17**(01):141-150.
44. Choct M, Hughes R, Wang J, Bedford M, Morgan A, Annison G: **Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens.** *British poultry science* 1996, **37**(3):609-621.
45. Choct M: **Enzymes for the feed industry: past, present and future.** *World's Poultry Science Journal* 2006, **62**(01):5-16.
46. Jackson M, Anderson D, Hsiao H, Mathis G, Fodge D: **Beneficial effect of β -mannanase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimeria* sp. and *Clostridium perfringens*.** *Avian diseases* 2003, **47**(3):759-763.
47. Gholamiandehkordi A: **A contribution to the pathogenesis and treatment of *Clostridium perfringens* associated necrotic enteritis in broilers.** Faculty of veterinary medicine, Ghent University; 2009.
48. van der Wielen PW, Biesterveld S, Notermans S, Hofstra H, Urlings BA, van Knapen F: **Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**(6):2536-2540.
49. Thompson JL, Hinton M: **Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on *Salmonellas* in the crop.** *British poultry science* 1997, **38**(1):59-65.
50. Van Immerseel F, Russell J, Flythe M, Gantois I, Timbermont L, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R: **The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy.** *Avian Pathology* 2006, **35**(3):182-188.
51. Adams MR, Hall C: **Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures.** *International Journal of Food Science & Technology* 1988, **23**(3):287-292.
52. Barbosa LN, Rall VLM, Fernandes AAH, Ushimaru PI, da Silva Probst I, Fernandes Jr A: **Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat.** *Foodborne pathogens and disease* 2009, **6**(6):725-728.
53. Penalver P, Huerta B, Borge C, Astorga R, Romero R, Perea A: **Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family.** *Apmis* 2005, **113**(1):1-6.
54. Adams CA: **Nutricines: food components in health and nutrition:** Nottingham University Press; 1999.
55. Durst L: **Inclusion of fructo- and galakto-oligosaccharides in broiler diets.** *Archiv fuer Gefluegelkunde (Germany)* 1996.
56. Schols HA, Voragen AG, Colquhoun IJ: **Isolation and characterization of rhamnogalacturonan oligomers, liberated during degradation of pectic hairy regions by rhamnogalacturonase.** *Carbohydrate research* 1994, **256**(1):97-111.
57. Van Craeyveld V, Holopainen U, Selinheimo E, Poutanen K, Delcour JA, Courtin CM: **Extensive dry ball milling of wheat and rye bran leads to in situ production of arabinoxylan oligosaccharides through nanoscale fragmentation.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2009, **57**(18):8467-8473.
58. Gibson GR, Roberfroid MB: **Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.** *The Journal of nutrition* 1995, **125**(6):1401.
59. Ganguly N, Bhattacharya S, Sesikeran B, Nair G, Ramakrishna B, Sachdev H, Batish V, Kanagasabapathy A, Muthuswamy V, Kathuria S: **ICMR-DBT guidelines for evaluation of probiotics in food.** *Indian Journal of Medical Research* 2011, **134**(1):22.
60. AFRC RF: **Probiotics in man and animals.** *Journal of applied bacteriology* 1989, **66**(5):365-378.
61. Ezema C: **Probiotics in animal production: A review.** *Journal of veterinary medicine and animal health* 2013, **5**(11):308-316.

62. Fuller R: **Probiotics**. *Journal of Applied Bacteriology* 1986, **60**(01):1-6.
63. Fuller R: **Probiotics: the scientific basis**: Springer Science & Business Media; 2012.
64. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A: **Probiotic mechanisms of action**. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2012, **61**(2):160-174.
65. Ghadban G: **Probiotics in broiler production-a review**. *Archiv fur Geflugelkunde* 2002, **66**(2):49-58.
66. Jin L, Ho Y, Abdullah N, Jalaludin S: **Probiotics in poultry: modes of action**. *World's Poultry Science Journal* 1997, **53**(04):351-368.
67. Oelschlaeger TA: **Mechanisms of probiotic actions—a review**. *International Journal of Medical Microbiology* 2010, **300**(1):57-62.
68. Ng S, Hart A, Kamm M, Stagg A, Knight S: **Mechanisms of action of probiotics: recent advances**. *Inflammatory bowel diseases* 2009, **15**(2):300-310.
69. Barrow PA: **Probiotics for chickens**. In: *Probiotics*. Springer; 1992: 225-257.
70. Apata D: **Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of Lactobacillus bulgaricus**. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2008, **88**(7):1253-1258.
71. Ashayerizadeh A, Dabiri N, Mirzadeh K, Ghorbani M: **Effect of dietary supplementation of probiotic and prebiotic on growth indices and serum biochemical parameters of broiler chickens**. *Journal of Cell and Animal Biology* 2011, **5**(8):152-156.
72. Kalavathy R, Abdullah N, Jalaludin S, Ho Y: **Effects of Lactobacillus cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens**. *British Poultry Science* 2003, **44**(1):139-144.
73. Zulkifli I, Al-Aqil A, Omar AR, Sazili AQ, Rajion MA: **Crating and heat stress influence blood parameters and heat shock protein 70 expression in broiler chickens showing short or long tonic immobility reactions**. *Poultry Science* 2009, **88**(3):471-476.
74. Lan PTN, Benno Y: **Impact of two probiotic Lactobacillus strains feeding on fecal lactobacilli and weight gains in chicken**. *The Journal of general and applied microbiology* 2003, **49**(1):29-36.
75. Shareef A, Al-Dabbagh A: **Effect of probiotic (Saccharomyces cerevisiae) on performance of broiler chicks**. *Iraqi J Vet Sci* 2009, **23**(Suppl 1):23-29.
76. Banday M, Risam K: **Growth performance and carcass characteristics of broiler chicken fed with probiotics**. *Indian Journal of Poultry Science* 2001, **36**(3):252-255.
77. Nikpiran H, Vahdatpour T, Babazadeh D, Vahdatpour S: **Effects of Saccharomyces Cerevisiae, Thepax and Their Combination on Blood Enzymes and Performance of Japanese Quails (Coturnix Japonica)**. *J Anim Plant Sci* 2013, **23**:369-375.
78. Zhang Z, Kim I: **Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers**. *Poultry science* 2014, **93**(2):364-370.
79. Mansoub NH: **Effect of probiotic bacteria utilization on serum cholesterol and triglycerides contents and performance of broiler chickens**. *Global Vet* 2010, **5**(3):184-186.
80. Murry A, Hinton A, Buhr R: **Effect of botanical probiotic containing lactobacilli on growth performance and populations of bacteria in the ceca, cloaca, and carcass rinse of broiler chickens**. *International Journal of Poultry Science* 2006, **5**(4):344-350.
81. Timmerman H, Veldman A, Van den Elsen E, Rombouts F, Beynen A: **Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics**. *Poultry Science* 2006, **85**(8):1383-1388.
82. Yousefi M, Karkoodi K: **Effect of probiotic Thepax® and Saccharomyces cerevisiae supplementation on performance and egg quality of laying hens**. *International Journal of Poultry Science* 2007, **6**(1):52-54.
83. Idoui T, Boudjerda D, Leghouchi E, Karam N: **Probiotic activity of Lactobacillus plantarum BJ002: study carried out on ISA 15 broilers**. *World Poultry Science Association (WPSA), Proceedings of the 8th Avian French Research Days, St Malo, France, 25-26 March 2009* 2009.

84. Naik D, Shivakumar M: **Performance of broilers supplemented with probiotics.** *Karnataka Journal of Agricultural Sciences* 2000, **13**(4):957-960.
85. Safalaoh ACL SG, Senanayake YDA and Sangakkara Uurlings, Bert AP: **Effective microorganisms as an alternative to antibiotics in broiler diets: effect on broiler growth performance, feed utilization and serum cholesterol.** *Sixth International Conference on Kyusei farming* 2001, **University of Pretoria, Pretoria, S. Africa. 28-31 October**:150-155.
86. S UHaY: **Effect of probiotic preparation (Lacto-Sacc) on performance and livability in broiler chicks under field conditions.** *The Veterinarian* 2002, **26**:11-14.
87. Chitra P, Mohan B, Viswanathan K: **Effect of probiotic with ascorbic acid on the growth performance of broilers in summer season.** *Indian Journal of Poultry Science* 2004, **39**(3):281-284.
88. Anjum M, Khan A, Azim A, Afzal M: **Effect of dietary supplementation of multi-strain probiotic on broiler growth performance.** *Pak Vet J* 2005, **25**(1):25-29.
89. Shome B, Senani S, Shome R, Padhi M, Kumar A, Verma N, Saha S: **Effect of probiotics on performance of native chicken of Andaman.** *Indian Journal of Poultry Science* 2000, **35**(3):258-261.
90. Bhatt R, Katoch B, Dogra K, Gupta R, Sharma K, Sharma C: **Effect of dietary supplementation of different strains of Lactobacillus bulgaricus on the performance of broilers.** *Indian Journal of Poultry Science* 1995, **30**:117-121.
91. Kaistha M, Katoch S, Katoch B, Kumari M, Dogra K, Sharma C: **Effect of dietary supplementation of useful microbes isolated from Luffa cylindrica and Momordica charantia on the performance of broilers.** *Indian Journal of Poultry Science* 1996, **31**(3):156-162.
92. Samanta M, Biswas P: **Effect of feeding Streptococcus culture on the performance of broilers.** *J Interacademia* 1997, **1**(2):118-120.
93. Sabiha M, Elizabeth V, Jalaludeen A: **Effect of supplementation of probiotic on the growth performance of broiler chicken.** *Indian Journal of Poultry Science* 2005, **40**(1):73-75.
94. Temim S, Bedrani L, Sahraoui L, Kaddour R, Boudina H, Khelef D, Adjou K, Baziz H: **Evaluation de l'efficacité du probiotique Pediococcus acidilactici sur les performances de croissance la morphométrie et la flore Lactobacillaire de l'intestin du poulet de chair.** *European Journal of Scientific Research* 2009, **38**(1):119-128.
95. Daneshyar M, Kermanshahi H, Golian A: **Changes of biochemical parameters and enzyme activities in broiler chickens with cold-induced ascites.** *Poultry Science* 2009, **88**(1):106-110.
96. Ramasamy K, Abdullah N, Wong MC, Karuthan C, Ho YW: **Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by Lactobacillus strains used as probiotics in chickens.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2010, **90**(1):65-69.
97. Davis G, Anderson K: **The effects of feeding the direct-fed microbial, primalac, on growth parameters and egg production in single comb white leghorn hens.** *Poultry science* 2002, **81**(6):755-759.
98. Yörük M, Gül M, Hayirli A, Macit M: **The effects of supplementation of humate and probiotic on egg production and quality parameters during the late laying period in hens.** *Poultry Science* 2004, **83**(1):84-88.
99. Kurtoglu* V, Kurtoglu F, Seker E, Coskun B, Balevi T, Polat E: **Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol.** *Food additives and contaminants* 2004, **21**(9):817-823.
100. Corcoran B, Stanton C, Fitzgerald G, Ross R: **Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**(6):3060-3067.
101. Gilliland S, Nelson C, Maxwell C: **Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus.** *Appl Environ Microbiol* 1985, **49**(2):377-381.
102. Guarner F, Schaafsma G: **Probiotics.** *Int J Food Microbiol* 1998, **39**(3):237-238.

103. Siggers RH, Thymann T, Siggers J, Schmidt M, Hansen AK, Sangild PT: **Bacterial colonization affects early organ and gastrointestinal growth in the neonate.** *Livestock Science* 2007, **109**(1):14-18.
104. Impey C, Mead G, George S: **Evaluation of treatment with defined and undefined mixtures of gut microorganisms for preventing Salmonella colonization in chicks and turkey poults.** *Food Microbiology* 1984, **1**(2):143-147.
105. Schneitz C, Nuotio L: **Efficacy of different microbial preparations for controlling Salmonella colonisation in chicks and turkey poults by competitive exclusion.** 1992.
106. Fuller R: **Nature of the determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cells.** *Microbiology* 1975, **87**(2):245-250.
107. Fuller R: **Probiotics: their development and use.** In: *Old Herborn University Seminar Monograph: 1995.* 1-8.
108. Mills S, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross R: **Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again.** *Microbial cell factories* 2011, **10**(1):S19.
109. Corcoran B, Stanton C, Fitzgerald G, Ross R: **Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated.** *Current pharmaceutical design* 2008, **14**(14):1382-1399.
110. Dilworth B, Day E: **Lactobacillus cultures in broiler diets.** In: *Poultry Science: 1978.* POULTRY SCIENCE ASSOC INC 1111 NORTH DUNLAP AVE, SAVOY, IL 61874: 1101-1101.
111. Mohan B, Kadirvel R, Natarajan A, Bhaskaran M: **Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilisation and serum cholesterol in broilers.** *British poultry science* 1996, **37**(2):395-401.
112. Siriken B, Bayram I, Önoğ AG: **Effects of probiotics: alone and in a mixture of Biosace® plus Zinc Bacitracin on the caecal microflora of Japanese quail.** *Research in veterinary science* 2003, **75**(1):9-14.
113. Lee J, Yun HS, Cho KW, Oh S, Kim SH, Chun T, Kim B, Whang KY: **Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated Lactobacillus spp.: immune modulation and longevity.** *Int J Food Microbiol* 2011, **148**(2):80-86.
114. Gueimonde M, Delgado S, Mayo B, Ruas-Madiedo P, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG: **Viability and diversity of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium populations included in commercial fermented milks.** *Food Res Int* 2004, **37**(9):839-850.
115. Mead GC, Barrow PA, Hinton MH, Humbert F, Impey CS, Lahellec C, Mulder RW, Stavric S, Stern NJ: **Recommended assay for treatment of chicks to prevent Salmonella colonization by 'competitive exclusion'.** *Journal of Food Protection®* 1989, **52**(7):500-502.
116. Rantala M: **Cultivation of a bacterial flora able to prevent the colonization of Salmonella infantis in the intestines of broiler chickens, and its use.** *APMIS* 1974, **82**(1):75-80.
117. Seuna E, Raevuori M, Nurmi E: **An epizootic of Salmonella typhimurium var. copenhagen in broilers and the use of cultured chicken intestinal flora for its control.** *British poultry science* 1978, **19**(3):309-314.
118. Arena MP, Silvain A, Normanno G, Grieco F, Drider D, Spano G, Fiocco D: **Use of Lactobacillus plantarum strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms.** *Front Microbiol* 2016, **7**.
119. Gould GW, Hurst A: **The bacterial spore.** *The bacterial spore* 1969.
120. Kozasa M: **Toyocerin (Bacillus toyoi) as growth promotor for animal feeding.** *Microbiol Aliment Nutr* 1986, **4**(1):121-135.
121. Bajagai Y, Klieve A, Dart P, Bryden W: **Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation:** FAO; 2016.
122. Pivnick H, Nurmi E: **Nurmi concept and its role in the control of Salmonellae in poultry.** *Developments in food microbiology* 1982.
123. Goren E, De Jong W, Doornenbal P, Koopman J, Kennis H: **Protection of chicks against Salmonella infection induced by spray application of intestinal microflora in the hatchery.** *Veterinary Quarterly* 1984, **6**(2):73-79.

124. Schneitz C, Hakkinen M, Nuotio L, Nurmi E, Mead G: **Droplet application for protecting chicks against Salmonella colonisation by competitive exclusion.** *Veterinary Record* 1990, **126**(20).
125. Schneitz C, Nuotio L, Mead G, Nurmi E: **Competitive exclusion in the young bird: challenge models, administration and reciprocal protection.** *Int J Food Microbiol* 1992, **15**(3-4):241-244.
126. Ghadban G: **Studying on productivity of chickens broilers treated by biological products.** Ph. D. thesis 1999. Thracian University; 1999.
127. O'Shea EF, Gardiner GE, O'Connor PM, Mills S, Ross RP, Hill C: **Characterization of enterocin- and salivaricin-producing lactic acid bacteria from the mammalian gastrointestinal tract.** *FEMS Microbiol Lett* 2009, **291**(1):24-34.
128. Riley MA, Wertz JE: **Bacteriocins: evolution, ecology, and application.** *Annu Rev Microbiol* 2002, **56**(1):117-137.
129. Jacob F, Lwoff A, Siminovitch A, Wollman E: **Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie.** In: *ANNALES DE L INSTITUT PASTEUR: 1953.* MASSON EDITEUR 120 BLVD SAINT-GERMAIN, 75280 PARIS 06, FRANCE: 222-224.
130. Drider D, Rebuffat S: **Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications:** Springer Science & Business Media; 2011.
131. Rea MC, Ross RP, Cotter PD, Hill C: **Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria.** In: *Prokaryotic antimicrobial peptides.* Springer; 2011: 29-53.
132. Meindl K, Schmiederer T, Schneider K, Reicke A, Butz D, Keller S, Gühring H, Vértesy L, Wink J, Hoffmann H: **Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics.** *Angewandte Chemie International Edition* 2010, **49**(6):1151-1154.
133. Kawulka K, Sprules T, McKay RT, Mercier P, Diaper CM, Zuber P, Vederas JC: **Structure of Subtilosin A, an Antimicrobial Peptide from Bacillus subtilis with Unusual Posttranslational Modifications Linking Cysteine Sulfurs to α -Carbons of Phenylalanine and Threonine.** *Journal of the American Chemical Society* 2003, **125**(16):4726-4727.
134. Marx R, Stein T, Entian K-D, Glaser SJ: **Structure of the Bacillus subtilis peptide antibiotic subtilosin A determined by 1H-NMR and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Journal of protein chemistry* 2001, **20**(6):501-506.
135. Drider D, Fimland G, Héchard Y, McMullen LM, Prévost H: **The continuing story of class IIa bacteriocins.** *Microbiology and molecular biology reviews* 2006, **70**(2):564-582.
136. Nissen-Meyer J, Rogne P, Oppegard C, Haugen H, Kristiansen P: **Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria.** *Current pharmaceutical biotechnology* 2009, **10**(1):19-37.
137. Tahara T, Oshimura M, Umezawa C, Kanatani K: **Isolation, partial characterization, and mode of action of Acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus JCM 1132.** *Appl Environ Microbiol* 1996, **62**(3):892-897.
138. Simon L, Fremaux C, Cenatiempo Y, Berjeaud J: **Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**(12):6416-6420.
139. Jiménez-Díaz R, Ruiz-Barba JL, Cathcart DP, Holo H, Nes IF, Sletten KH, Warner PJ: **Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides.** *Appl Environ Microbiol* 1995, **61**(12):4459-4463.
140. Nissen-Meyer J, Holo H, Håvarstein L, Sletten K, Nes I: **A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides.** *J Bacteriol* 1992, **174**(17):5686-5692.
141. Kawai Y, Saitoh B, Takahashi O, Kitazawa H, Saito T, Nakajima H, Itoh T: **Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by Lactobacillus gasseri SBT2055.** *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2000, **64**(10):2201-2208.

142. Muriana P, Klaenhammer T: **Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088.** *Appl Environ Microbiol* 1991, **57**(1):114-121.
143. Duitman EH, Hamoen LW, Rembold M, Venema G, Seitz H, Saenger W, Bernhard F, Reinhardt R, Schmidt M, Ullrich C: **The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, **96**(23):13294-13299.
144. Mogi T, Kita K: **Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics.** *Cellular and molecular life sciences* 2009, **66**(23):3821.
145. Heng NC, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW, Tagg JR: **The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria.** In: *Bacteriocins*. Springer; 2007: 45-92.
146. Rebuffat S: **Bacteriocins from Gram-Negative Bacteria: A Classification?** In: *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. Springer; 2011: 55-72.
147. Braun V, Patzer SI, Hantke K: **Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution.** *Biochimie* 2002, **84**(5):365-380.
148. Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Lloubes R, Postle K, Riley M, Slatin S, Cavard D: **Colicin biology.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2007, **71**(1):158-229.
149. Duche D, Letellier L, Géli V, Bénédicti H, Baty D: **Quantification of group A colicin import sites.** *J Bacteriol* 1995, **177**(17):4935-4939.
150. Barreteau H, Bouhss A, Gérard F, Duché D, Boussaid B, Blanot D, Lloubès R, Mengin-Lecreux D, Touzé T: **Deciphering the catalytic domain of colicin M, a peptidoglycan lipid II-degrading enzyme.** *Journal of Biological Chemistry* 2010, **285**(16):12378-12389.
151. Arnold T, Zeth K, Linke D: **Structure and function of colicin S4, a colicin with a duplicated receptor-binding domain.** *Journal of Biological Chemistry* 2009, **284**(10):6403-6413.
152. Duquesne S, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, Rebuffat S: **Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria.** *Nat Prod Rep* 2007, **24**(4):708-734.
153. Baquero F, Bouanchaud D, Martinez-Perez M, Fernandez C: **Microcin plasmids: a group of extrachromosomal elements coding for low-molecular-weight antibiotics in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1978, **135**(2):342-347.
154. San Millan JL, Hernandez-Chico C, Pereda P, Moreno F: **Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin B17 production and immunity.** *J Bacteriol* 1985, **163**(1):275-281.
155. García-Bustos J, Pezzi N, Asensio C: **Microcin 7: purification and properties.** *Biochem Biophys Res Commun* 1984, **119**(2):779-785.
156. Novoa MA, Díaz-Guerra L, San Millán JL, Moreno F: **Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin C7 production and immunity.** *J Bacteriol* 1986, **168**(3):1384-1391.
157. Kurepina NE, Basyuk EI, Metlitskaya AZ, Zaitsev DA, Khmel IA: **Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin C51 production and immunity.** *Molecular and General Genetics MGG* 1993, **241**(5):700-706.
158. Salomon R, Farías RN: **Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1992, **174**(22):7428-7435.
159. Vassiliadis G, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J: **Class II microcins.** In: *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. Springer; 2011: 309-332.
160. Gaggero C, Moreno F, Lavina M: **Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system.** *J Bacteriol* 1993, **175**(17):5420-5427.
161. Gilson L, Mahanty HK, Kolter R: **Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V.** *The EMBO journal* 1990, **9**(12):3875.
162. Gratia A: **Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille.** *CR Soc Biol* 1925, **93**:1040-1041.
163. Fredericq P, Joiris E, BETZBARREAU M, Gratia A: *** RECHERCHE DES GERMES PRODUCTEURS DE COLICINES DANS LES SELLES DE MALADES ATTEINTS DE FIEVRE PARATYPHOIDE-B. COMPTES RENDUS DES SEANCES DE LA SOCIETE DE BIOLOGIE ET DE SES FILIALES** 1949, **143**(7-8):556-559.

164. Yang C-C, Konisky J: **Colicin V-treated Escherichia coli does not generate membrane potential.** *J Bacteriol* 1984, **158**(2):757-759.
165. Waters VL, Crosa JH: **Colicin V virulence plasmids.** *Microbiol Rev* 1991, **55**(3):437-450.
166. Chehade H, Braun V: **Iron-regulated synthesis and uptake of colicin V.** *FEMS Microbiol Lett* 1988, **52**(3):177-181.
167. Gilson L, Mahanty HK, Kolter R: **Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity.** *J Bacteriol* 1987, **169**(6):2466-2470.
168. Guo X, Harrison RW, Tai PC: **Nucleotide-dependent dimerization of the C-terminal domain of the ABC transporter CvaB in colicin V secretion.** *J Bacteriol* 2006, **188**(7):2383-2391.
169. Zhang LH, Fath MJ, Mahanty H, Tai P, Kolter R: **Genetic analysis of the colicin V secretion pathway.** *Genetics* 1995, **141**(1):25-32.
170. Skvirsky RC, Reginald S, Shen X: **Topology analysis of the colicin V export protein CvaA in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 1995, **177**(21):6153-6159.
171. Boyer AE, Tai PC: **Characterization of the *cvaA* and *cvi* Promoters of the Colicin V Export System: Iron-Dependent Transcription of *cvaA* Is Modulated by Downstream Sequences.** *J Bacteriol* 1998, **180**(7):1662-1672.
172. Hammami R, Zouhir A, Le Lay C, Hamida JB, Fliss I: **BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization.** *BMC Microbiol* 2010, **10**(1):22.
173. Gaillard-Gendron S, Vignon D, Cottenceau G, Graber M, Zorn N, van Dorsseleer A, Pons A-M: **Isolation, purification and partial amino acid sequence of a highly hydrophobic new microcin named microcin L produced by Escherichia coli.** *FEMS Microbiol Lett* 2000, **193**(1):95-98.
174. Sablé S, Duarte M, Bravo D, Lanneluc I, Pons A, Cottenceau G, Moreno F: **Wild-type Escherichia coli producing microcins B17, D93, J25, and L; cloning of genes for microcin L production and immunity.** *Can J Microbiol* 2003, **49**(5):357-361.
175. O'Brien GJ, Mahanty HK: **Colicin 24, a new plasmid-borne colicin from a uropathogenic strain of Escherichia coli.** *Plasmid* 1994, **31**(3):288-296.
176. Destoumieux-Garzón D, Thomas X, Santamaria M, Goulard C, Barthélémy M, Boscher B, Bessin Y, Molle G, Pons AM, Letellier L: **Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on Escherichia coli.** *Molecular microbiology* 2003, **49**(4):1031-1041.
177. Trujillo M, Rodríguez E, Laviña M: **ATP synthase is necessary for microcin H47 antibiotic action.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**(11):3128-3131.
178. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML: **Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation.** *Int J Food Microbiol* 2001, **71**(1):1-20.
179. Gálvez A, Abriouel H, López RL, Omar NB: **Bacteriocin-based strategies for food biopreservation.** *Int J Food Microbiol* 2007, **120**(1-2):51-70.
180. Robertson A, Tirado C, Lobstein T, Jermini M, Knai C, Jensen J, Ferro-Luzzi A, James W: **Food and Health in Europe: A New Basis for Action.** WHO Regional Publications European Series. 2004.
181. Ananou S, Muñoz A, Martínez-Bueno M, González-Tello P, Gálvez A, Maqueda M, Valdivia E: **Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying.** *Food microbiology* 2010, **27**(1):58-63.
182. Morgan SM, Galvin M, Kelly J, Ross RP, Hill C: **Development of a lactacin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens.** *Journal of Food Protection* 1999, **62**(9):1011-1016.
183. Wessels S, Axelsson L, Hansen EB, De Vuyst L, Laulund S, Lähteenmäki L, Lindgren S, Mollet B, Salminen S, von Wright A: **The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation.** *Trends in food science & technology* 2004, **15**(10):498-505.
184. Adams M, Smid E: **Nisin in multifactorial food preservation.** In: *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods.* Elsevier; 2003: 11-33.
185. Fuller R: **Microbial activity in the alimentary tract of birds.** *Proceedings of the Nutrition Society* 1984, **43**(01):55-61.

186. Gabriel I, Mallet S, Sibille P: **La microflore digestive des volailles: facteurs de variation et conséquences pour l'animal.** *PRODUCTIONS ANIMALES-PARIS-INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE*- 2005, **18**(5):309.
187. Choi J, Kim G, Cha C: **Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens.** *Poultry science* 2014:PS3974.
188. Atassi F, Servin AL: **Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120. 1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathogens.** *FEMS Microbiol Lett* 2010, **304**(1):29-38.
189. Chenoll E, Casinos B, Bataller E, Astals P, Echevarría J, Iglesias J, Balbarie P, Ramón D, Genovés S: **Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**(4):1335-1343.
190. Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CG: **Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, **104**(18):7617-7621.
191. Gillor O, Giladi I, Riley MA: **Persistence of colicinogenic *Escherichia coli* in the mouse gastrointestinal tract.** *BMC Microbiol* 2009, **9**(1):165.
192. Riley MA, Wertz JE: **Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives.** *Biochimie* 2002, **84**(5):357-364.
193. Majeed H, Gillor O, Kerr B, Riley MA: **Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins.** *The ISME journal* 2011, **5**(1):71-81.
194. Gobbetti M, De Angelis M, Di Cagno R, Minervini F, Limitone A: **Cell-cell communication in food related bacteria.** *Int J Food Microbiol* 2007, **120**(1):34-45.
195. Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F: **Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm.** *J Bacteriol* 2005, **187**(21):7193-7203.
196. Dabour N, Zihler A, Kheadr E, Lacroix C, Fliss I: **In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*.** *Int J Food Microbiol* 2009, **133**(3):225-233.
197. Gillor O, Ghazaryan L: **Recent advances in bacteriocin application as antimicrobials.** *Recent patents on anti-infective drug discovery* 2007, **2**(2):115-122.
198. Sturme MH, Kleerebezem M, Nakayama J, Akkermans AD, Vaughan EE, de Vos WM: **Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002, **81**(1):233-243.
199. Fajardo A, Martínez JL: **Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses.** *Current opinion in microbiology* 2008, **11**(2):161-167.
200. Hanchi H, Hammami R, Kourda R, Hamida JB, Fliss I: **Bacteriocinogenic properties and in vitro probiotic potential of enterococci from Tunisian dairy products.** *Arch Microbiol* 2014, **196**(5):331-344.
201. Hammami R, Zouhir A, Hamida JB, Neffati M, Vergoten G, Naghmouchi K, Fliss I: **Antimicrobial properties of aqueous extracts from three medicinal plants growing wild in arid regions of Tunisia.** *Pharm Biol* 2009, **47**(5):452-457.
202. Ennaas N, Hammami R, Gomaa A, Bédard F, Biron É, Subirade M, Beaulieu L, Fliss I: **Collagencin, an antibacterial peptide from fish collagen: Activity, structure and interaction dynamics with membrane.** *Biochem Biophys Res Commun* 2016, **473**(2):642-647.
203. Herigstad B, Hamilton M, Heersink J: **How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria.** *J Microbiol Methods* 2001, **44**(2):121-129.
204. Andrews JM: **Determination of minimum inhibitory concentrations.** *J Antimicrob Chemother* 2001, **48**(suppl 1):5-16.
205. CLSI: **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition.** *M07-A9* 2012, **32**
206. EUCAST: **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0.** Available from:

- http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_60_Breakpoint_table.pdf 2016.
207. Todorov SD, Danova ST, Van Reenen CA, Meincken M, Dinkova G, Ivanova IV, Dicks LM: **Characterization of bacteriocin HV219, produced by Lactococcus lactis subsp. lactis HV219 isolated from human vaginal secretions.** *J Basic Microbiol* 2006, **46**(3):226-238.
208. Vimont A, Fernandez B, Hammami R, Ababsa A, Daba H, Fliss I: **Bacteriocin-Producing Enterococcus faecium LCW 44: A High Potential Probiotic Candidate from Raw Camel Milk.** *Front Microbiol* 2017, **8**:865.
209. Pons A-M, Lanneluc I, Cottenceau G, Sable S: **New developments in non-post translationally modified microcins.** *Biochimie* 2002, **84**(5):531-537.
210. Waterborg JH: **The Lowry method for protein quantitation.** In: *The protein protocols handbook*. Springer; 2009: 7-10.
211. Sahoo TK, Jena PK, Patel AK, Seshadri S: **Purification and molecular characterization of the novel highly potent bacteriocin TSU4 produced by Lactobacillus animalis TSU4.** *Appl Biochem Biotechnol* 2015, **177**(1):90-104.
212. Albano H, Todorov SD, van Reenen CA, Hogg T, Dicks LM, Teixeira P: **Characterization of two bacteriocins produced by Pediococcus acidilactici isolated from "Alheira", a fermented sausage traditionally produced in Portugal.** *Int J Food Microbiol* 2007, **116**(2):239-247.
213. Bizani D, Brandelli A: **Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated Bacillus sp. Strain 8 A.** *J Appl Microbiol* 2002, **93**(3):512-519.
214. Cherif A, Rezgui W, Raddadi N, Daffonchio D, Boudabous A: **Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from Bacillus thuringiensis subsp. Entomocidus HD110.** *Microbiol Res* 2008, **163**(6):684-692.
215. Dho-Moulin M, Fairbrother JM: **Avian pathogenic Escherichia coli (APEC).** *Vet Res* 1999, **30**(2):299-316.
216. Pinou T, Riley MA: **Nucleotide polymorphism in microcin V plasmids.** *Plasmid* 2001, **46**(1):1-9.
217. Baquero F, Moreno F: **The microcins.** *FEMS Microbiol Lett* 1984, **23**(2-3):117-124.
218. Chalasani AG, Dhanarajan G, Nema S, Sen R, Roy U: **An Antimicrobial Metabolite from Bacillus sp.: Significant Activity Against Pathogenic Bacteria Including Multidrug-Resistant Clinical Strains.** *Front Microbiol* 2014, **6**:1335-1335.
219. Elayaraja S, Annamalai N, Mayavu P, Balasubramanian T: **Production, purification and characterization of bacteriocin from Lactobacillus murinus AU06 and its broad antibacterial spectrum.** *Asian Pac J Trop Biomed* 2014, **4**:S305-S311.
220. Gaaloul N, Braiek O, Hani K, Volski A, Chikindas M, Ghrairi T: **Isolation and characterization of large spectrum and multiple bacteriocin-producing Enterococcus faecium strain from raw bovine milk.** *J Appl Microbiol* 2015, **118**(2):343-355.
221. Ge J, Sun Y, Xin X, Wang Y, Ping W: **Purification and partial characterization of a novel bacteriocin synthesized by Lactobacillus paracasei HD1-7 isolated from Chinese sauerkraut juice.** *Sci Rep* 2016, **6**.
222. Goh HF, Philip K: **Purification and characterization of bacteriocin produced by Weissella confusa A3 of dairy origin.** *PLoS one* 2015, **10**(10):e0140434.
223. Liu G, Ren L, Song Z, Wang C, Sun B: **Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by Bifidobacterium animalis BB04 from centenarians' intestine.** *Food Control* 2015, **50**:889-895.
224. Corsini G, Karahanian E, Tello M, Fernandez K, Rivero D, Saavedra JM, Ferrer A: **Purification and characterization of the antimicrobial peptide microcin N.** *FEMS Microbiol Lett* 2010, **312**(2):119-125.
225. Håvarstein LS, Holo H, Nes IF: **The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria.** *Microbiology* 1994, **140**(9):2383-2389.
226. Fath M, Zhang L, Rush J, Kolter R: **Purification and characterization of colicin V from Escherichia coli culture supernatants.** *Biochemistry* 1994, **33**(22):6911.

227. Chalón MC, Acuña L, Morero RD, Minahk CJ, Bellomio A: **Membrane-active bacteriocins to control Salmonella in foods: Are they the definite hurdle?** *Food Res Int* 2012, **45**(2):735-744.
228. Ling H, Saeidi N, Rasouliha BH, Chang MW: **A predicted S-type pyocin shows a bactericidal activity against clinical Pseudomonas aeruginosa isolates through membrane damage.** *FEBS letters* 2010, **584**(15):3354-3358.
229. Bruschi M, Pirri G, Giuliani A, Nicoletto SF, Baster I, Scorciapino MA, Casu M, Rinaldi AC: **Synthesis, characterization, antimicrobial activity and LPS-interaction properties of SB041, a novel dendrimeric peptide with antimicrobial properties.** *Peptides* 2010, **31**(8):1459-1467.
230. Lee W, Hwang J-S, Lee DG: **A novel antimicrobial peptide, scolopendin, from Scolopendra subspinipes mutilans and its microbicidal mechanism.** *Biochimie* 2015, **118**:176-184.
231. Dupuy FG, Chirou MVN, de Arcuri BF, Minahk CJ, Morero RD: **Proton motive force dissipation precludes interaction of microcin J25 with RNA polymerase, but enhances reactive oxygen species overproduction.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2009, **1790**(10):1307-1313.
232. Zhang X, Wang Y, Liu L, Wei Y, Shang N, Zhang X, Li P: **Two-peptide bacteriocin PlnEF causes cell membrane damage to Lactobacillus plantarum.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2016, **1858**(2):274-280.
233. El Arbi M, Théolier J, Pigeon P, Jellali K, Trigui F, Top S, Aifa S, Fliss I, Jaouen G, Hammami R: **Antibacterial properties and mode of action of new triaryl butene citrate compounds.** *European journal of medicinal chemistry* 2014, **76**:408-413.
234. Shi W, Li C, Li M, Zong X, Han D, Chen Y: **Antimicrobial peptide melittin against Xanthomonas oryzae pv. oryzae, the bacterial leaf blight pathogen in rice.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2016, **100**(11):5059-5067.
235. Braun V, Patzer SI, Hantke K: **Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution.** *Biochimie* 2002, **84**(5-6):365-380.
236. Salomón RA, Farías RN: **The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake.** *J Bacteriol* 1993, **175**(23):7741-7742.
237. Patzer S, Baquero M, Bravo D, Moreno F, Hantke K: **The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and Iron.** *Microbiology* 2003, **149**(9):2557-2570.
238. Vassiliadis G, Destoumieux-Garzón D, Lombard C, Rebuffat S, Peduzzi J: **Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**(1):288-297.
239. Jeziorowski A, Gordon DM: **Evolution of microcin V and colicin Ia plasmids in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 2007, **189**(19):7045-7052.
240. Gérard F, Pradel N, Wu L-F: **Bactericidal activity of colicin V is mediated by an inner membrane protein, SdaC, of Escherichia coli.** *J Bacteriol* 2005, **187**(6):1945-1950.
241. Rosenfeld Y, Papo N, Shai Y: **Endotoxin (Lipopolysaccharide) Neutralization by Innate Immunity Host-Defense Peptides** PEPTIDE PROPERTIES AND PLAUSIBLE MODES OF ACTION. *Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**(3):1636-1643.
242. Lee H, Ji YR, Ryoo ZY, Choi M-S, Woo E-R, Lee DG: **Antibacterial Mechanism of (-)-Nortrachelogenin in Escherichia coli O157.** *Curr Microbiol* 2016, **72**(1):48-54.
243. Winkel JD, Gray DA, Seistrup KH, Hamoen LW, Strahl H: **Analysis of antimicrobial-triggered membrane depolarization using voltage sensitive dyes.** *Frontiers in cell and developmental biology* 2016, **4**:29.
244. Wang P, Bang J-K, Kim HJ, Kim J-K, Kim Y, Shin SY: **Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide Ib-AMP1.** *Peptides* 2009, **30**(12):2144-2149.
245. Taute H, Bester MJ, Neitz AW, Gaspar AR: **Investigation into the mechanism of action of the antimicrobial peptides Os and Os-C derived from a tick defensin.** *Peptides* 2015, **71**:179-187.

246. O'Driscoll NH, Cushnie TT, Matthews KH, Lamb AJ: **Colistin causes profound morphological alteration but minimal cytoplasmic membrane perforation in populations of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa***. *Arch Microbiol* 2018;1-10.
247. Park CB, Kim HS, Kim SC: **Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions**. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **244**(1):253-257.
248. Zhang M, Li M-f, Sun L: **NKLP27: a teleost NK-lysin peptide that modulates immune response, induces degradation of bacterial DNA, and inhibits bacterial and viral infection**. *PLoS one* 2014, **9**(9):e106543.
249. Hsu C-H, Chen C, Jou M-L, Lee AY-L, Lin Y-C, Yu Y-P, Huang W-T, Wu S-H: **Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA**. *Nucleic acids research* 2005, **33**(13):4053-4064.
250. Hammami R, Bédard F, Gomaa A, Subirade M, Biron E, Fliss I: **Lasso-inspired peptides with distinct antibacterial mechanisms**. *Amino acids* 2015, **47**(2):417-428.
251. Sauveur B: **Reproduction des volailles et production d'oeufs**: (INRA), Paris; 1988.
252. Mongin P: **Index de solidité de la coquille de l'oeuf ses significations-sa précision**. In: *Annales de zootechnie: 1965*. 319-325.
253. Haugh R: **The Haugh unit for measuring egg quality**. 1937.
254. Ayoola MO, Olufemi AM, Foluke A, Oguntunji A: **Relationship of temperature and length of storage on pH of internal contents of chicken table egg in humid tropics**. *Biotechnology in Animal Husbandry* 2016, **32**(3):285-296.
255. Ahn J, Kil D, Kong C, Kim B: **Comparison of oven-drying methods for determination of moisture content in feed ingredients**. *Asian-Australasian journal of animal sciences* 2014, **27**(11):1615.
256. Zhao Y, Tu Y, Xu M, Li J, Du H: **Physicochemical and nutritional characteristics of preserved duck egg white**. *Poultry science* 2014, **93**(12):3130-3137.
257. AOAC: **Official Methods of Analysis**. Association of Official Analytical Chemists 2005, **18th ed**(Arlington, VA, USA).
258. Aquino JdS, Silva JAd: **Total lipids, cholesterol and fatty acids composition of ostrich eggs: a methodological approach**. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)* 2010, **69**(4):588-594.
259. Degli Agosti R, Greppin H: **Extraction, identification et dosage des sucres du pétiole de l'épinard (*Spinacia oleracea* cv. Nobel) pendant la variation de photopériode**. *Botanica helvetica* 1987, **97**:329-340.
260. Jiang YH, McGeachin RB, Bailey CA: **α -Tocopherol, β -Carotene, and Retinol Enrichment of Chicken Eggs**. *Poultry Science* 1994, **73**(7):1137-1143.
261. Mikulski D, Jankowski J, Naczmanski J, Mikulska M, Demey V: **Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens**. *Poultry science* 2012, **91**(10):2691-2700.
262. Pambuka SR, Sjojfan O, Radiati LE: **Effect of Liquid Probiotics Mixed Culture Supplements through Drinking Water on Laying Hens Performance and Yolk Cholesterol**. 2014.
263. Zhang J, Xie Q, Ji J, Yang W, Wu Y, Li C, Ma J, Bi Y: **Different combinations of probiotics improve the production performance, egg quality, and immune response of layer hens**. *Poultry science* 2012, **91**(11):2755-2760.
264. Mahdavi A, Rahmani H, Pourreza J: **Effect of probiotic supplements on egg quality and laying hen's performance**. *Int J Poult Sci* 2005, **4**(4):488-492.
265. Guo J, Dong X, Liu S, Tong J: **Effects of long-term *Bacillus subtilis* CGMCC 1.921 supplementation on performance, egg quality, and fecal and cecal microbiota of laying hens**. *Poultry science* 2016, **96**(5):1280-1289.
266. Ma Q, Gao X, Zhou T, Zhao L, Fan Y, Li X, Lei Y, Ji C, Zhang J: **Protective effect of *Bacillus subtilis* ANSB060 on egg quality, biochemical and histopathological changes in layers exposed to aflatoxin B1**. *Poultry science* 2012, **91**(11):2852-2857.

267. Ramasamy K, Abdullah N, Jalaludin S, Wong M, Ho YW: **Effects of Lactobacillus cultures on performance of laying hens, and total cholesterol, lipid and fatty acid composition of egg yolk.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2009, **89**(3):482-486.
268. Jadhav K, Sharma K, Katoch S, Sharma V, Mane B: **Probiotics in broiler poultry feeds: A review.** *Journal of Animal Nutrition and Physiology| Year* 2015, **1**:04-16.
269. Trabelsi I, Ktari N, Slima SB, Bouchaala K, Salah RB: **Effects of supplementation with L. plantarum TN8 encapsulated in alginate-chitosan in broiler chickens.** *International journal of biological macromolecules* 2016, **89**:677-681.
270. Karimi Torshizi M, Moghaddam A, Rahimi S, Mojangani N: **Assessing the effect of administering probiotics in water or as a feed supplement on broiler performance and immune response.** *British poultry science* 2010, **51**(2):178-184.
271. Haddadin M, Abdulrahim S, Hashlamoun E, Robinson R: **The effect of Lactobacillus acidophilus on the production and chemical composition of hen's eggs.** *Poultry Science* 1996, **75**(4):491-494.
272. Lacin E, Yildiz A, Esenbuga N, Macit M: **Effects of differences in the initial body weight of groups on laying performance and egg quality parameters of Lohmann laying hens.** *Czech J Anim Sci* 2008, **53**(11):466-471.
273. Asli MM, Hosseini SA, Lotfollahian H, Shariatmadari F: **Effect of probiotics, yeast, vitamin E and vitamin C supplements on performance and immune response of laying hen during high environmental temperature.** *International Journal of Poultry Science* 2007, **6**(12):895-900.
274. Panda AK, Rama Rao SS, Raju MV, Sharma SS: **Effect of probiotic (Lactobacillus sporogenes) feeding on egg production and quality, yolk cholesterol and humoral immune response of White Leghorn layer breeders.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2008, **88**(1):43-47.
275. Beal J, Niven S, Campbell A, Brooks P: **The effect of temperature on the growth and persistence of Salmonella in fermented liquid pig feed.** *Int J Food Microbiol* 2002, **79**(1):99-104.
276. Papadimitriou K, Alegría Á, Bron PA, De Angelis M, Gobbetti M, Kleerebezem M, Lemos JA, Linares DM, Ross P, Stanton C: **Stress physiology of lactic acid bacteria.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2016, **80**(3):837-890.