

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE DES SCIENCES ALIMENTAIRES

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**KEDDAR Kawtar**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES**

**Spécialité: nutrition et Pathologies (NP)**

THÈME

Caractérisation De Bactéries Lactiques A Statut  
Probiotique Isolées De Poisson D'eau Salée  
Anchois « *Engraulis encasicolus* »

Soutenue publiquement le 07/07/2019

DEVANT LE JURY

Président	Pr RIAZI Ali	Professeur	U. Mostaganem
Encadreur	Dr YAHLA Iméne	MCB	U. Mostaganem
Examineurs	Dr CHAALEL Abedlmlek	MCA	U. Mostaganem

Thème réalisé au LMBAFS à L'INES

# **Remerciement**

## **A mon encadrante**

Dr I.YAHLA, Je ne pourrais jamais assez vous remercier pour tout le temps que vous m'avez consacré, votre gentillesse, votre disponibilité et vos précieux conseils m'auront été d'une aide inestimable tout au long de la rédaction de ce projet. Veuillez accepter mes remerciements les plus sincères pour votre investissement dans un mémoire qui me tenait particulièrement à cœur, et que vous avez personnellement inspiré.

A Pr RIAZI d'avoir accepté de présider le jury et à Dr CHAALAL d'avoir accepté d'examiner de modeste travail.

## **A mes profs de département des sciences alimentaires**

Je remercie particulièrement tous mes enseignants chacun par son nom qui depuis mon entrée à l'université ont contribué au savoir auquel j'ai acquis, je leur exprime ma gratitude la plus sincère, ainsi qu'à tout le personnel du laboratoire de recherche LMBAFS à l'INES, aux techniciens des différents laboratoires de recherche qui ont toujours répondu présents.

## **DEDICACES**

### **A mes parents, Mama et Abi**

Je vous remercie du fond du cœur pour tout le soutien, tout l'amour, tous les conseils et toute la patience dont vous avez fait preuve durant mes études. Je sais tout ce que je vous dois, je n'en serais pas arrivée là sans vous, vous m'avez donné la force de faire ce que je voulais de ma vie, et pour tout cela, je vous en serais éternellement reconnaissante.

### **A mes frère, Meriem El Batoul, Mohamed Redouane, et Ferdouasse**

Avoir des frères c'est un cadeau pour le cœur ! Merci pour votre amour, votre soutien infaillible, merci de m'aimer et d'être toujours présents quand j'en ai besoin. Je vous'aime.

### **A mes copines de fac,**

A BOUDANI Rahma , sans qui ces études auraient été bien tristes, tu as été une binôme de TP et de exposé au top ! Je te souhaite une vie remplie de bonheur avec ta magnifique famille. A Nsseumer et Merièmè un grand merci à vous les filles

### **A ma meilleure amie, mes Cousins**

Mansor et Soria, Hadjer et Mehdi, Sarah et Hassan, Zina et Tata, Med et Zerouki, Didouche et Abdou, Bendhiba et Ismahan, Kenza et Zaki nous sommes inséparables, vous êtes mes frères de cœur et je voulais vs remercier pour votre soutien, vous êtes toujours crus en moi.

### **A mes collègues,**

Merci à Hadjer, Cherifa, Salima, Racha, Zoulikha, Tidjani et Yassine! Merci pour votre patience avec moi et pour votre gentillesse à toute épreuve, merci de m'accueillir parmi vous

### **A ma mamie,**

Tu es partie bien trop vite, mais je me souviendrais toujours de ce que tu m'as dit la dernière fois que je t'ai vu. Tu as toujours cru en moi, tu savais que je parviendrais à réaliser tous mes projets...

Je t'aime et ne t'oublierais jamais.

### **A ma tata Aicha,**

Tu es comme ma grand-mère, pas par le sang mais par le cœur, tu m'as toujours soutenue et cela depuis ma plus tendre enfance. Tu as toujours répondu présente quand j'avais besoin d'une épaule pour pleurer ou tout simplement d'une oreille quand j'en avais gros sur le cœur. Merci d'être là, je t'aime de tout mon cœur

### **A mes onles, mes Tantes**

Kelthoum et Ahmed, Rachida et Mustapha, Nawel et Omar et Amel la petite vous êtes mon cœur merci pour votre soutien.

**A tonton Bachir, et l'ange Idrissou**

C'est si difficile, vous êtes les 2 au coeur de la tempête dans même pas 15 jours, la douleur et la violence semblent nous engloutir. Que Dieu garde dans son vaste paradis.

**Merci à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin et surtout BELHAMITI Mustapha et BELHAMITI Omar.**

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Micro-organismes considérés comme probiotiques (Hozalpfel et <i>al.</i> , 1998).....	1
<b>Tableau 2</b> : Proposition de critères de sélection des probiotiques à application intestinale (Mattila-Sandholm <i>et al.</i> , 1999 ; Saarela <i>et al.</i> , 2000).....	10
<b>Tableau 3</b> : Liste des souches bactériennes et fongiques étudiées.....	30
<b>Tableau 4</b> : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des BL isolées.....	36
<b>Tableau 05</b> : Diamètres des zones d'inhibition (mm).....	43
<b>Tableau 06</b> : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des surnageants avant et après neutralisation.....	43

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Arbre phylogénique des bactéries lactiques avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i> (Axelsson, 2004).....	3
<b>Figure 2</b> : Mécanismes d'action proposés des micro-organismes probiotiques dans le traitement des infections entériques (adapté de Calder et Kew, 2002; Kaur et <i>al.</i> , 2002).....	5
<b>Figure 3</b> : Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière dû à l'adhésion spécifique (a) et non spécifique (b) des probiotiques. (Servin et Coconnier, 2003).....	12
<b>Figure 4</b> : Mode d'action des acides organiques produits par les probiotiques contre les pathogènes bactériens (Servin et Coconnier, 2003)*X-COOH = CH <sub>3</sub> -CHOH-COOH dans le cas de l'acide lactique ou CH <sub>3</sub> COOH dans le cas de l'acide acétique.....	13
<b>Figure 5</b> : Organisation interne d'un poisson omnivore.(Beaumont et cassier, 1997).....	18
<b>Figure 6</b> : Photographie illustrant d' <i>E. encrasicolus</i> .....	22
<b>Figure 7</b> : Photo illustrant le matériel utilisé pour la dissection des poissons. ....	25
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique des étapes de coloration de Gram.....	26
<b>Figure 9</b> : Représentation schématique des halos d'inhibitions.....	31
<b>Figure 10</b> : Aspect macroscopique des isolats sur milieu MRS et M17.....	33
<b>Figure 11</b> : Test de catalase.....	34
<b>Figure 12</b> : Observation microscopiques (Objectif X100) des isolats lactiques après coloration de Gram.....	35
<b>Figure 13</b> : Résultat du type fermentaire pour les isolats (test production du CO <sub>2</sub> ).....	37
<b>Figure 14</b> : Résultat de la production de CO <sub>2</sub> .....	37
<b>Figure 15</b> : Résultat de la production d'acétoïne.....	38
<b>Figure 16</b> : Résultat de la croissance en présence de bleu de méthylène.....	38
<b>Figure 17</b> : Résultat de la mise en évidence d'arginine décarboxylase.....	39
<b>Figure 18</b> : Résultats API 20A (a) Galerie témoin (b) Résultats des isolats.....	40
<b>Figure 19</b> : Résultat de la résistance aux sels biliaires.....	42
<b>Figure 20</b> : Résultat des zones d'inhibition. ....	42
<b>Figure 21</b> : Résultat des zones d'inhibition de surnageant avant et après.....	45

## Liste Des Abréviation

**ACT:** acétoïne

**ADH:** Arginine dihydrolase

**ADN:** Acide désoxyribonucléique

**ATCC :** American Type Culture Collection

**ATP:** Adénosine Triphosphate

**°C:** Degré Celsius

**LAB :** Lactic acid bacteria

**Lb.:** *Lactobacillus*

**Lc.:** *Lactococcus*

**M.H.:** Mueller Hinton

**ml:** millilitre

**NaCl:** Chlorure de sodium

**pH:** potentiel d'hydrogène

**UFC:** Unité Formant Colonie

**UV:** ultrat-violet

**µL :** microlitre,

## TABLE DES MATIERES

DEDICACE

REMERCIEMENT

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

### CHAPITRE I : BACTERIES LACTIQUES ET PROBIOTIQUES

Généralités .....	01
Historique et taxonomie.....	02
Propriétés technologiques.....	03
a. Capacité acidifiante .....	03
b. Capacité texturante .....	05
c. Capacité aromatisante .....	05
Les probiotiques.....	07
Critères de sélection des souches probiotiques.....	07
Innocuité totale .....	07
Survie au cours du transit digestif .....	08
I.5.1.3. Adhésion à la muqueuse intestinale .....	08
I.5.1.4. Viabilité et stabilité des micro-organismes .....	09
I.5.1.5. Pas de résistances aux antibiotiques .....	09
I.5.1.6. Activité anti-microbienne.....	09
I.5.2. Mécanismes d'action des probiotiques .....	09
I.5.2.1. Compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhésion.....	10
I.5.2.2. Production de substances antimicrobiennes.....	12
I.5.2.3. Compétition au niveau de l'utilisation des nutriments.....	13
I.5.3. Les probiotiques en aquaculture.....	14

### CHAPITRE II : FLORE LACTIQUE D'*Engraulis encrasicolus*

II.1. Les interactions entre les bactéries et les poissons.....	16
II.2. Développement du tractus gastro-intestinal des larves de poisson.....	16
II.3. La mise en place de la flore intestinale des larves de poisson.....	17
II.4. Composition de la microflore intestinale.....	18
II.5. Rôle de la microflore intestinale.....	19
II.6. Présentation de l'anchois <i>Engraulis encrasicolus</i> .....	20
II.6.1. Introduction.....	20
II.6.2. Description de l'anchois.....	21
II.6.3. Classification.....	22
II.6.4. Mode de vie et la biologie de l'anchois.....	22
CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES	
III.1. l'objectif du travail .....	24
III.2. Matériels biologiques .....	24
III.3. Milieux de culture .....	24
III.4. Isolement des bactéries lactiques.....	24
III.5. Purification des isolats bactériens .....	25
III.6. Pré-identification des isolats.....	25
III.6.1. Caractérisation macroscopique.....	25
III.6.2. Caractérisation microscopique.....	25
III.6.3. Test de catalase .....	26
III.7. Conservation des isolats.....	26
III.7.1. Conservation de courte durée (quelques semaines).....	26
III.7.2. Conservation de longue durée (quelques mois à plusieurs années).....	26
III.8. Identification des bactéries lactiques.....	27
III.8.1. Tests physiologiques .....	27
A. Test de croissance à différentes températures (15 et 37°C).....	27
B. Test de croissance en présence de 2,5 ; 4 et 6,5 % de Na Cl.....	27
C. Test de croissance à un milieu hyperalcalin .....	27
III.8.2. Tests biochimiques .....	27
A. Test de production de CO <sub>2</sub> à partir du glucose .....	27

B. Test de production de CO <sub>2</sub> à partir du citrate .....	28
III.8. 3. Tests technologiques.....	28
A. Production d'Acétoïne .....	28
B. Hydrolyse de l'arginine (ADH).....	28
C. Production des exopolysaccharides .....	28
D. Test de la thermorésistance.....	29
E. Test de croissance en présence de bleu de méthylène.....	29
F. test de fermentation des sucres .....	29
G. Test d'oxydase.....	29
III.9. Sélection des souches probiotiques.....	29
A. Test de résistance aux sels biliaires .....	29
B. Test de Résistance aux pH acides.....	30
C. la recherche d'une activité antimicrobienne .....	30
D. Réactivation de souches pathogènes.....	30
E. Méthode de diffusion en puits AWDT (method de Barefoot et Kaenhammer, 1983).....	31
F. Activité anti bactérienne des surnageants bactériens (effet bactériocine).....	31
G. CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION	
H. IV.1.Caractérisation phénotypique des isolats.....	33
a)- Aspect macroscopique .....	33
b)- Observation microscopique .....	33
IV.2. Caractérisation biochimique des isolats.....	34
Tests de production de CO <sub>2</sub> et types fermentaires.....	36
La production d'acétoïne.....	37
Test de croissance en présence du bleu de méthylène.....	38
Fermentation des sucres.....	40
IV.3. la sélection des souches probiotiques.....	41
la résistance aux conditions de tractus intestinal.....	41
Résistance au pH=3.....	41
Résistance aux sels biliaires.....	41
L'activité antibactérienne .....	42
résultats Activité anti bactérienne des surageants bactériens (effet bactériocine).....	43

CONCLUSION

ANNEXE

LISTE DES REFERENCES

## RESUME

L'objectif de notre travail était l'isolement et l'identification des souches lactiques à partir du tractus gastro-intestinal et de la chair du poisson marin : l'anchois (*Engraulis encrasicolus*). Après leur isolement, les souches ont été caractérisées et identifiées par des méthodes physiologiques, biochimiques et technologiques.

Les huit souches isolées ont été évaluées pour leur capacité de résister aux conditions digestives, et pour leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de cinq germes pathogènes. Les résultats de cette étude ont montré que les souches lactiques, isolées d'*Engraulis encrasicolus*, résistent et survivent aux conditions digestives simulées et possèdent un bon pouvoir inhibiteur. En effet, ces souches sont capables d'inhiber la croissance d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*. Mais, l'effet inhibiteur de ces souches était moins important vis à vis *staphylococcus aureus* et absent contre *Candida albicans*.

**Mots clés :** bactéries lactiques, *Engraulis encrasicolus*, germes pathogènes, tractus gastro-intestinal, effet anti bactérien.

## ABSTRACT

The aim of our work was the isolation and identification of lactic acid strains from the gastrointestinal tract and the flesh of marine fish: anchovies (*Engraulis encrasicolus*). After their isolation, the strains were characterized and identified by physiological, biochemical and technological methods.

The eight isolated strains were evaluated for their ability to withstand digestive conditions, and for their inhibitory power against five pathogens. The results of this study have shown that lactic strains, isolated from *Engraulis encrasicolus*, resist and survive simulated digestive conditions and have a good inhibiting power. Indeed, these strains are capable of inhibiting the growth of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*. But, the inhibitory effect of these strains was less important against *staphylococcus aureus* and absent against *Candida albicans*.

Key words: lactic acid bacteria, *Engraulis encrasicolus*, pathogenic germs, gastrointestinal tract, anti-bacterial effect.

# **Introduction**

## INTRODUCTION

Un probiotique est défini comme un adjuvant microbien vivant ayant un effet bénéfique sur l'hôte en modifiant la communauté microbienne associée à l'hôte ou microbienne ambiante, en assurant une meilleure utilisation de l'aliment ou en augmentant sa valeur nutritionnelle, en renforçant la réponse de l'hôte à la maladie, (Verschuere *et al.*, 2000). Depuis quelques années, l'utilisation de probiotiques comme agents de lutte biologique est devenue une technique populaire pour améliorer et maintenir un environnement sain ainsi que la santé. Cependant, l'utilisation de probiotiques en aquaculture est un concept plus récent par rapport à leur utilisation dans la nutrition humaine, porcine, bovine et avicole.

Les **anchois** ou *Engraulis encrasicolus* forment une famille de poisson dont de nombreuses espèces sont consommées par l'homme et les animaux terrestres. On les rencontre dans les océans Atlantique, Indien et Pacifique, principalement près des côtes et dans les estuaires.

Les anchois contiennent de nombreux microbes intestinaux bénéfiques (Moss et al. 2000; Oxley et al. 2002). Parmi celles-ci, les bactéries lactiques (LAB), les bâtonnets ou les cocci à Gram positif, non sporulant et à catalase négative (Vijayabaskar et Somasundaram 2008) constituent un groupe majeur. Elles jouent un rôle bénéfique dans l'environnement intestinal de l'hôte en produisant des substances antibactériennes telles que l'acide lactique, l'acide acétique, le peroxyde d'hydrogène et la bactériocine, qui inhibent la croissance des bactéries concurrentes (Ouwehand et Vesterlund, 2004). Dans Cette étude le but était d'isoler des bactéries lactiques à partir de la chair et des intestins des anchois, ensuite vérifier leurs caractères probiotiques.

**Partie I**  
**Etude bibliographique**

# **CHAPITRE I**

## **Bactéries lactiques et probiotiques**

## **CHAPITRE I : BACTERIES LACTIQUES ET PROBIOTIQUES**

### **I.1. Les bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, qui se trouvent partout dans la nature ainsi que dans le système digestif de l'homme. Depuis des millénaires, elles sont utilisées dans l'alimentation humaine. Actuellement, dans l'industrie agroalimentaire, les bactéries lactiques occupent une place importante parmi les auxiliaires de fabrication. Si elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans le secteur laitier (Dortu & Thonart, 2009; Moraes *et al.*, 2010), elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, les salaisons des viandes et des poissons, ainsi qu'en boulangerie et dans la fabrication du vin. Elles disposent généralement du statut GRAS (Vescovo *et al.*, 1996).

### **I.2. Généralités**

Les bactéries lactiques sont des microorganismes unicellulaires procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont à Gram positif, peuvent avoir des formes coccoïdes, coccobacillaires, ou bacillaires (Klein *et al.*, 1998; Badis, *et al.*, 2005), sont non pigmentées, immobiles et non sporulantes. Les bactéries lactiques tolèrent des pH acides, ne possèdent pas de catalase et possèdent un métabolisme anaérobie strict ou aérotolérant (Hardie & Whiley, 1997). De trop grandes teneurs en oxygène peuvent leur être néfastes en raison de l'absence de chaîne respiratoire. La plupart des bactéries lactiques sont équipées génétiquement pour avoir un métabolisme respiratoire, mais elles sont incapables de respirer si l'hème, n'est pas présent dans le milieu (Lechardeur *et al.*, 2011). L'hème est un cofacteur indispensable au cytochrome c-oxydase le dernier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire.

Les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique (Kandler & Weiss, 1986) comme produit principal du métabolisme en fermentant les sucres (glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose) chez les bactéries homofermentaires, en plus de l'éthanol et CO<sub>2</sub> chez les bactéries hétérofermentaires. Leur ADN présente un pourcentage de G + C compris entre 30 et 60% (Stiles & Holzapfel, 1997) et une taille de génome comprise entre 1,8 et 3,3 Mpb. Les bactéries lactiques se caractérisent par de faibles activités protéolytique et lipolytique et sont très exigeantes en acides aminés et en vitamine B (Caplice & Fitzgerald, 1999). Elles sont ubiquistes et se trouvent soit libres dans l'environnement, soit en association avec un hôte.

Le principal atout que représentent les bactéries lactiques pour l'industrie alimentaire, réside dans l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques et en augmentant leur durée de conservation (Stiles, 1996). Elles participent à l'inhibition de certains microorganismes pathogènes, en produisant plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne (Dortu & Thonart, 2009; Moraes *et al.*, 2010).

### **I.3. Historique et taxonomie**

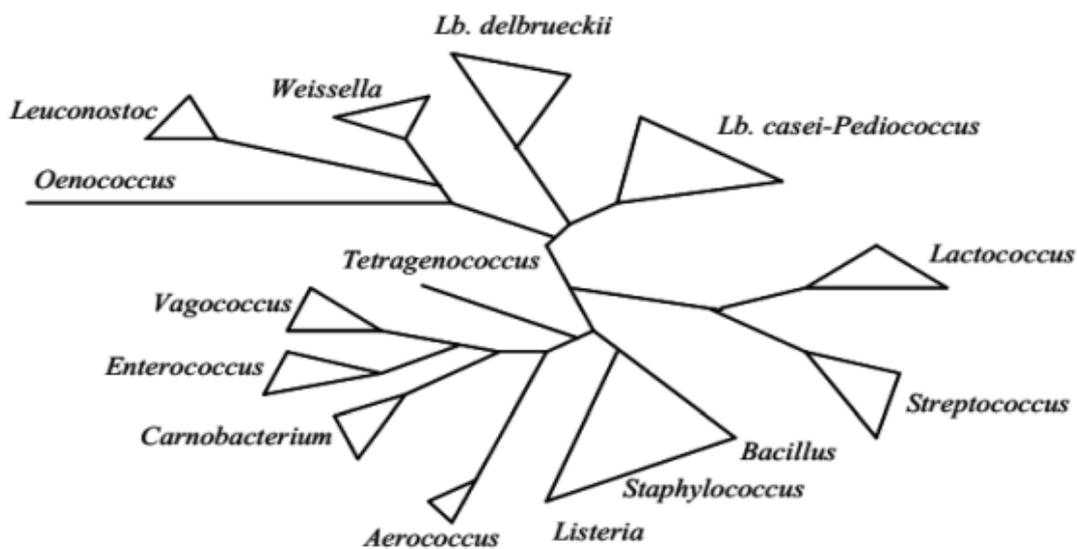
Les bactéries lactiques sont de très anciens micro-organismes découverts dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années, avant l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (Quiberoni *et al.*, 2001). Elles sont apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques (Quiberoni *et al.*, 2001; Drider & Prevost, 2009).

La classification phénotypique des bactéries lactiques est fondée sur la morphologie, la croissance à différentes températures, le mode de fermentation des sucres, la capacité de croissance à différentes concentrations de sel, la tolérance aux pH acides et alcalins, la configuration de l'acide lactique, l'hydrolyse de l'arginine et la formation d'acétoïne. Par ailleurs, une classification selon la composition de la paroi cellulaire (de Ambrosini *et al.*, 1996) incluant la nature des acides gras qui la composent, a été proposée (Gilarová *et al.*, 1994; König & Fröhlich, 2009). Une autre classification, basée sur la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides a subdivisé les bactéries lactiques en trois groupes (McLeod *et al.*, 2008). Le groupe I renferme majoritairement les Lactobacilles homofermentaires. Le groupe II contient les bactéries hétérofermentaires et regroupe les espèces des genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et *Weissella*, ainsi que quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*. Le groupe III regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant aux genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce dernier qui occupe une position intermédiaire entre les groupes I et II, renferment ainsi des espèces capables d'être homo- ou hétérofermentaires selon les conditions environnementales (McLeod *et al.*, 2008).

Selon la seconde édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (Vos *et al.*, 2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilli et l'Ordre des Lactobacillales renfermant trente-cinq genres répartis en six familles :

*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*. Seuls douze genres sont utilisés en technologie alimentaire (Figure 1), il s'agit de : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* et *Weissella* (Vandamme *et al.*, 1996).

L'appellation bactérie lactique est aussi souvent étendue aux genres *Bifidobacterium*, *Macrococcus*, *Brevibacterium* et *Propionibacterium* qui leur sont apparentés et qui sont également utilisés pour la fabrication de divers produits fermentés (Klaenhammer *et al.*, 2005; Pfeiler & Klaenhammer, 2007). Ils bénéficient également du statut GRAS (Adams & Marteau, 1995; Klaenhammer *et al.*, 2005). Quelques espèces du genre *Streptococcus*, *Enterococcus* et certains *Lactobacillus* sont néanmoins considérées comme des pathogènes opportunistes pouvant provoquer des maladies (Aguirre & Collins, 1993; König & Fröhlich, 2009).



**Figure 1** : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* (Axelsson, 2004).

#### **I.4. Propriétés technologiques**

##### **a. Capacité acidifiante**

Les bactéries lactiques possèdent de nombreuses propriétés technologiques qui en font les premiers intervenants dans l'élaboration des aliments fermentés (Stiles & Holzapfel, 1997).

Elles interviennent par fermentation des substrats, en transformant les glucides en acide lactique. Suivant les espèces, les sucres sont ensuite catabolisés selon deux voies différentes :

-soit la voie homofermentaire, soit la voie hétérofermentaire (**Figure 2**).

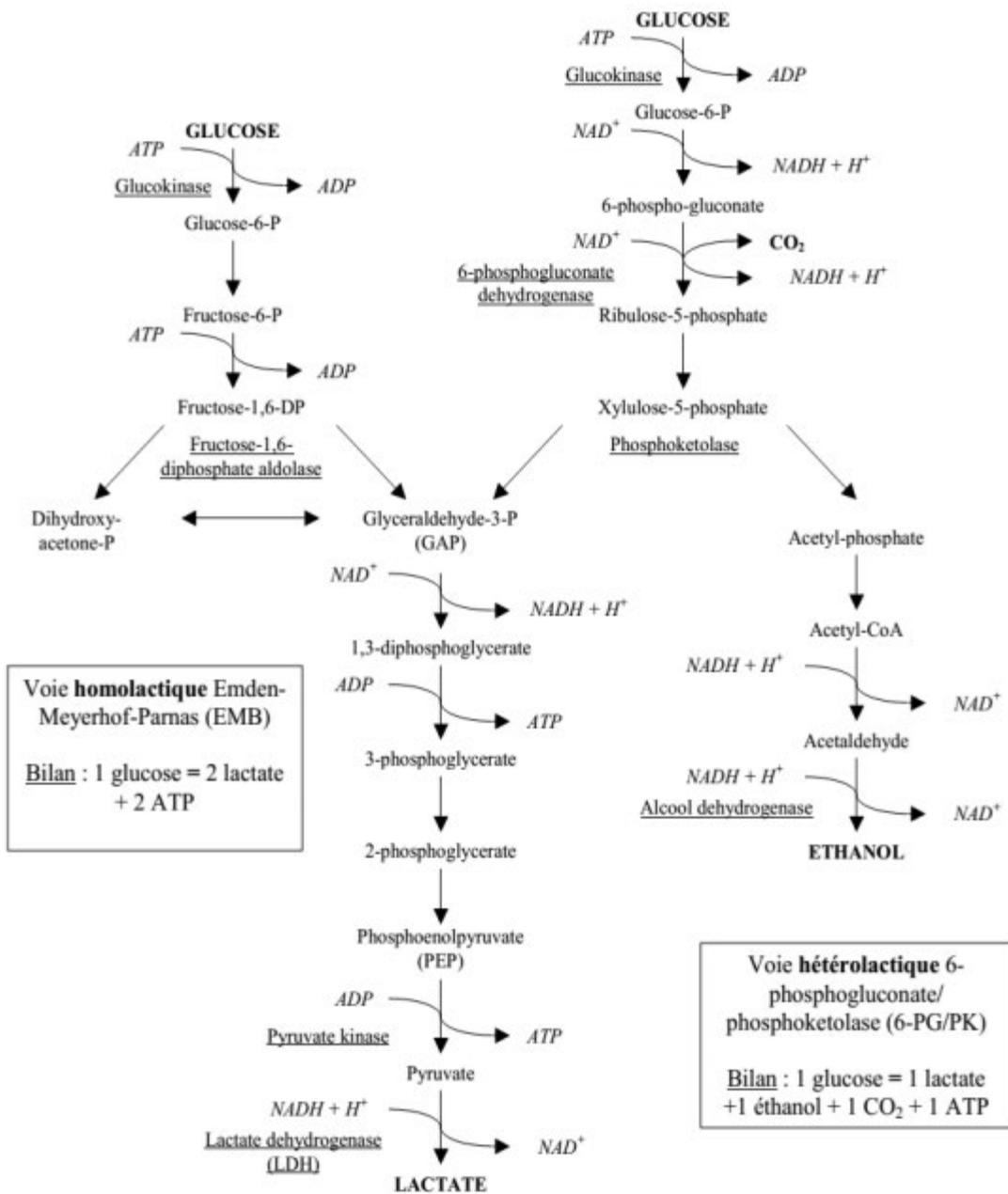
Elle est généralement associée aux bactéries des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Celles-ci utilisent la glycolyse pour dégrader les hexoses. En conditions optimales de croissance, cette voie produit deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. Pour être qualifiée d'homolactique, cette voie doit convertir au moins 90 % du glucose consommé en lactate. D'autres sucres que le glucose peuvent également être fermentés via cette voie : monosaccharides, disaccharides, hexitols (Thompson & Gentry-Weeks, 1994). Dans les conditions défavorables (milieu appauvri, souches mutées), ces bactéries lactiques homofermentaires peuvent présenter un métabolisme mixte, caractérisé par la production d'acide lactique, d'acide acétique, d'éthanol et d'acide formique et/ou de CO<sub>2</sub> (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996; Mozzi *et al.*, 2010).

La voie hétérofermentaire :

Les principaux groupes de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les Leuconostocs et certains lactobacilles. Ces bactéries utilisent la voie des pentoses phosphate (ou 6-phosphogluconate) qui permet l'obtention en plus d'une molécule l'acide lactique, de CO<sub>2</sub>, d'une molécule d'ATP et d'une molécule d'éthanol ou de l'acétate, à partir d'une molécule de glucose (Thompson & Gentry-Weeks, 1994; Salminen *et al.*, 2004). La voie fermentaire bifide (ou voie de la fructose-6-P phosphocétolase FPC) est une voie empruntée par les bactéries du genre *Bifidobacterium*. Pour une molécule d'hexose consommée, cette voie produit 1,5 molécule d'acétate et 2,5 molécules d'ATP (Drider & Prevost, 2009).

Grace à la production d'acides, les bactéries lactiques jouent un rôle primordial dans la fermentation des produits alimentaires, ainsi que dans leur conservation. Elles sont utilisées en tant que ferments. Au fur et à mesure du processus, la quantité d'acide lactique augmente, le milieu devient de plus en plus acide et le produit devient stable, ce qui permet une conservation prolongée de l'aliment (Abee *et al.*, 1995; Hugenholtz & Kleerebezem, 1999). L'acidification des aliments présente plusieurs avantages: elle fait précipiter les protéines, ce qui rend les aliments plus digestes, elle prolonge leur durée de conservation en limitant la prolifération des microorganismes responsables d'altérations. Elle contribue également au développement des arômes. Pour des applications agroalimentaires, les souches utilisées

doivent répondre à certains critères tels que: l'absence de pathogénicité ou de facteurs de virulence, la capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques de l'aliment, la facilité de culture et de conservation et le maintien des propriétés désirables durant le stockage (Marth & Steele, 2001).



**Figure 2.** Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques (Dellaglio et al., 1994).

### **b. Capacité texturante**

Certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser des exopolysaccharides (EPS) qui jouent un rôle important dans la texture et la rhéologie des produits transformés. La présence de ces souches productrices d'EPS dans les produits fermentés présente un intérêt technologique important pour les différentes industries de la fermentation, notamment laitière. Elles permettent ainsi d'améliorer la texture (Ricciardi & Clement, 2000), de diminuer la synérèse et d'augmenter la viscosité et l'onctuosité du produit. Les EPS ont la capacité de retenir les molécules d'eau et de diminuer la séparation du lactosérum et des caséines coagulées du lait. Leur présence dans les yaourts améliore leur homogénéité (Desmazeaud, 1990). La majorité des études portant sur la production d'EPS par les bactéries lactiques portent sur les genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Ruas & de Los Reyes, 2005; Badel *et al.*, 2011).

Les bactéries lactiques produisent deux types d'EPS: les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides. Les dextrans et les glucanes produits respectivement par *Leuconostoc mesenteroides* et *Streptococcus mutans* sont des homopolysaccharides de glucose tandis que les levanes produits par *Streptococcus salivarius* sont des homopolysaccharides de fructose. Les hétéropolysaccharides contenant deux ou plusieurs types d'oses constitutifs forment un groupe très hétérogène de polysaccharides élaborés par différentes bactéries lactiques thermophiles et mésophiles (Cerning, 1994).

### **c. Capacité aromatisante**

La production de composés aromatiques est liée à l'activité microbienne. Plusieurs espèces de bactéries lactiques, telles que *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *L. mesenteroides* ssp. *cremoris* sont capables de synthétiser, à partir du citrate notamment, divers composés tels que le diacétyle, l'acétoïne, l'acétate, principaux composés responsables de l'arôme des produits laitiers fermentés (Leveau, 1991).

D'autres travaux (Tanous *et al.*, 2005; Tanous *et al.*, 2006) ont montré la capacité de certaines bactéries lactiques à convertir les acides aminés en molécules aromatiques, ce qui permet de diversifier les arômes des produits dans lesquels se développent ces bactéries (Gripon & Yvon, 1998).

## **I.5. Les probiotiques**

Le concept des probiotiques provient d'un chercheur et Prix Nobel Russe, Elie Metchnikoff (1907) qui avait pour théorie que la longévité des paysans bulgares était directement liée à leur consommation de laits fermentés (Sanders, 2000). Ainsi, Metchnikoff (1907) avait proposé l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des bactéries lactiques, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie (Gournier-Chateau et al., 1994). Le terme probiotique dérive des deux mots grec (pros) et (bios) qui signifie littéralement " pour la vie" contrairement au terme antibiotique qui signifiait contre la vie.

Récemment, le groupe de travail mixte formé par la FAO (Food and Agriculture Organization) (2002) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé ; WHO) (2002) ont établi des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et formulent la définition suivante : « micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère» (FAO/OMS,2002).

Les principaux microorganismes probiotiques connus à ce jour sont des bactéries lactique (lactobacilles, bifidobactéries, propionibactéries, *Escherichia coli* et entérocoques) et des levures (*Saccharomyces boulardii*) (Ouwehand et al., 2002). Le tableau 1 résume les espèces microbiennes considérées comme probiotiques.

Les effets bénéfiques attribués aux probiotiques sont nombreux, mais les preuves confirmant les différentes allégations qui leur sont attribuées nécessitent de plus amples investigations. Néanmoins, plusieurs études ont abouti à la commercialisation des probiotiques alimentaires.

### **I.5.1. Critères de sélection des souches probiotiques**

Pour qu'un organisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique, il doit présenter les caractéristiques suivantes (tableau numero 1) :

#### **I.5.1.1. Innocuité totale**

Un probiotique ne doit pas être nocif pour l'organisme et ne doit présenter aucun risque pour la santé. Ce critère semble évident, mais il est important de le vérifier surtout si le choix de la bactérie administrée n'appartient pas à la microflore normale de l'hôte. Les bactéries lactiques (lactobacilleset bifidobactéries) sont utilisées depuis des temps immémoriaux pour la conservation des aliments, et cela reste la meilleure preuve de leur parfaite innocuité (Naidu

et *al.*, 1999; Saxelin et *al.*, 1995). Ils peuvent donc être utilisés en industrie alimentaire, ce qui n'en est pas de même pour les germes du genre *Enterococcus* qui peuvent posséder des caractéristiques de virulence (Moreno et *al.*, 2006 ; Ruiz-Moyano et *al.*, 2008).

**Tableau 1** : Micro-organismes considérés comme probiotiques  
(Hozalpfel et *al.*, 1998).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Autres bactéries lactiques</i>	<i>Autres micro-organismes</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus spp.</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli strain Nissle</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. cellobius</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. farciminis</i>		<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. fermentum</i>			
<i>L. gallinarum</i>			
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

### I.5.1.2. Survie au cours du transit digestif

La capacité de survie au cours du transit intestinal est très variable entre genres et entre souches. Certaines bactéries sont détruites dès leur passage dans l'estomac. Cependant, pour exercer une influence positive sur l'organisme, les bactéries lactiques probiotiques doivent survivre en quantité suffisante au passage à travers le tractus digestif supérieur pour pouvoir coloniser l'intestin. (Tamime et *al.*, 1995).

### I.5.1.3. Adhésion à la muqueuse intestinale

Une propriété importante des bactéries probiotiques réside dans leur capacité à adhérer aux parois intestinales même de façon transitoire. En effet, ceci leur confère une compétitivité avantageuse, d'une part, pour faciliter la colonisation du tube digestif, d'autre part, pour obtenir un effet barrière optimal contre l'invasion de la muqueuse intestinale par des bactéries

pathogènes (Elo et *al.*, 1991). *Lactobacillus casei* GG a ainsi exprimé *in vitro* des facteurs d'adhérence qui permettent à cette souche de multiples interactions avec les cellules épithéliales humaines (Elo et *al.*, 1991 ; Gill,2003).

#### **I.5.1.4. Viabilité et stabilité des micro-organismes**

Les probiotiques doivent, survivre en grand nombre au procédé de fabrication, à la lyophilisation éventuelle et à l'entreposage qui s'en suit. Il est, en effet, généralement admis qu'un nombre minimal de  $10^7$  cellules viables par gramme de produit est nécessaire pour exercer un effet probiotique (Ishibashi et Shimamura, 1993). Cependant, la stabilité physique et génétique des cellules, ainsi que toutes les propriétés nécessaires pour exercer leurs bienfaits sur la santé doivent également être assurées.

Les souches devraient être viables sans se multiplier pour ne pas provoquer d'effets indésirables sur le goût ou l'arôme du produit ni augmenter l'acidité (Mattila- Sandholm et *al.*, 2002). Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que des cellules en phase stationnaire de croissance, plus tolérantes aux stress environnementaux que des cellules en phase exponentielle, devraient être privilégiées pour la confection de produits contenant des probiotiques en grand nombre (Kolter, 1993; Hartke et *al.*, 1994; Rallu et *al.*, 1996; Heller, 2001).

#### **I.5.1.5. Pas de résistances aux antibiotiques**

les bactéries, qui contiennent des gènes transmissibles résistants aux médicaments, ne devraient pas être utilisées comme probiotiques (Mattila-Sandholm et *al.*, 1999 ; Saarela et *al.*, 2000). Comme avec toutes les bactéries, on a noté une résistance aux antibiotiques parmi certaines bactéries lactiques, y compris des microorganismes probiotiques (Salminen et *al.*, 1998). Cette résistance peut être liée aux gènes locaux chromosomiques, aux transposons ou aux gènes codés par des plasmides.

#### **I.5.1.6. Activité anti-microbienne**

pour jouer son rôle d'amélioration de l'écosystème intestinal, un bon probiotique doit être capable d'inhiber localement le développement des germes indésirables (Hudault et *al.*, 1997).

### **I.5.2. Mécanismes d'action des probiotiques**

Depuis longtemps, les consommateurs attribuent au yaourt des bénéfices sur la santé, mais il a fallu attendre les années 1970 pour découvrir progressivement le rôle joué par les bactéries lactiques vivantes du yaourt dans le tube digestif. L'introduction récente sur le marché de

grande consommation de laits fermentés à base de bactéries lactiques d'origine entérique (*Bifidobacterium* et *Lactobacillus*) a encore accru l'intérêt d'une catégorie de consommateurs, plus que jamais conscients de l'influence d'une alimentation saine sur la santé (Vermeiren, 2004).

**Tableau 2:** Proposition de critères de sélection des probiotiques à application intestinal (Mattila-Sandholm *et al.*, 1999 ; Saarela *et al.*, 2000).

<b>CRITERES DE SECURITE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ souche pour l'usage humain d'origine humaine (isolée du tractus intestinal d'un homme sain) ou alimentaire (utilisée dans les produits fermentés)</li> <li>▪ souche déposée dans une collection de cultures reconnue internationalement</li> <li>▪ souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques</li> <li>▪ historique de non pathogénicité</li> <li>▪ pas de déconjugaison excessive des sels biliaires au risque d'induire des lyses cellulaires</li> <li>▪ pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques</li> <li>▪ pas de dégradation excessive du mucus</li> </ul>
<b>CRITERES FONCTIONNELS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ tolérance à l'acidité et aux enzymes gastriques</li> <li>▪ tolérance à la bile et aux enzymes digestives</li> <li>▪ adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus gastrointestinal</li> <li>▪ immunostimulation</li> <li>▪ production de substances antimicrobiennes et antagonisme vis-à-vis des pathogènes</li> <li>▪ effets sur la santé documentés</li> </ul>
<b>CRITERES TECHNOLOGIQUES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini</li> <li>▪ conservation des propriétés probiotiques après production</li> </ul>

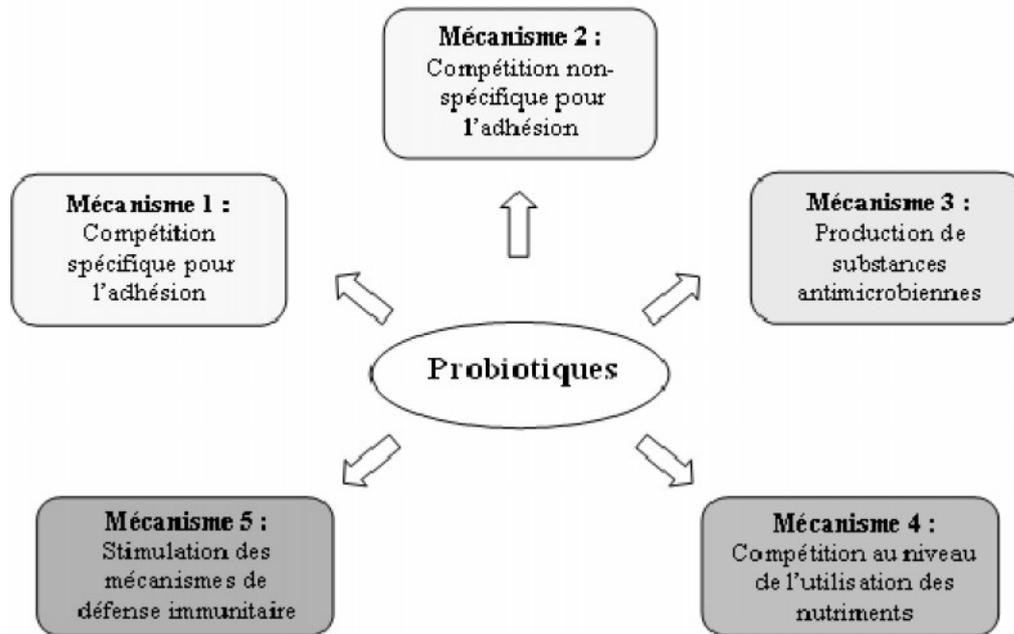
De façon générale, l'efficacité des probiotiques est liée à leur durée de présence dans le tube digestif ce qui n'implique pas forcément qu'ils puissent le coloniser ou s'y développer. Les mécanismes d'actions, bien qu'imparfaitement quantifiés sont qualitativement de plus en plus connus. Chez l'animal monogastrique, ils agissent comme des régulateurs de la flore intestinale en exerçant soit (adapté de Calder et Kew, 2002; Kaur *et al.*, 2002):

a) un effet prophylactique (antagonisme contre certains pathogènes par production de substances antimicrobiennes ; compétition avec les pathogènes pour certains nutriments ou

pour les récepteurs de la muqueuse intestinale),

b) Et/ou un effet nutritionnel (augmentation de la digestibilité, production de nutriments favorables),

c) et/ou un effet de détoxification (moindre production d'ammoniac, d'amines, ou de cytotoxines).

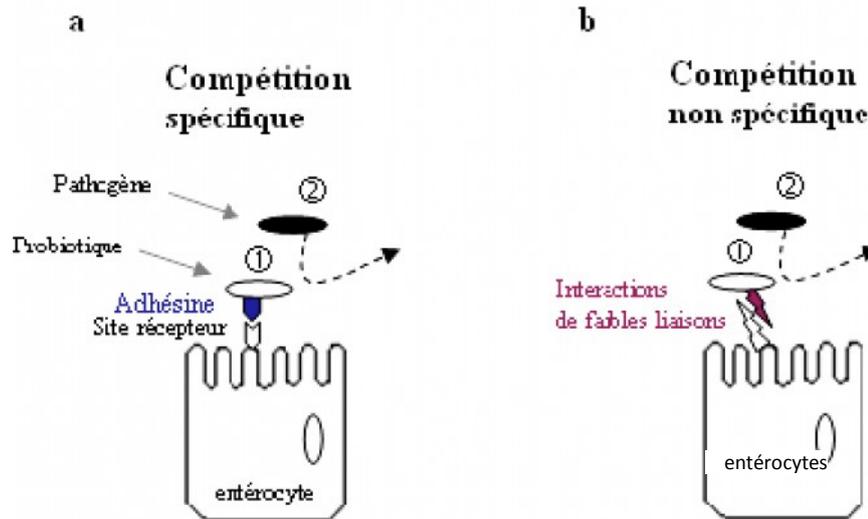


**Figure 2 :** Mécanismes d'action proposés des micro-organismes probiotiques dans le traitement des infections entériques (adapté de Calder et Kew, 2002; Kaur et *al.*, 2002).

### **I.5.2.1. Compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhésion**

Étant donné que la majorité des infections intestinales sont initiées par l'adhésion des pathogènes aux cellules entérocytaires de l'hôte, certains lactobacilles probiotiques auraient la capacité de bloquer physiquement l'accès aux entérocytes (Gill, 2003; Servin et Coconnier, 2003; Servin, 2004; Picard et *al.*, 2005). Ce mécanisme d'action serait similaire à celui exercé par le microbiote intestinal résident face aux infections microbiennes (Liévin- Le Moal et Servin, 2006).

Les mécanismes de compétition de l'adhésion se font généralement de deux façons. Ils peuvent survenir de façon spécifique par l'intermédiaire des adhésines ou de façon non spécifique en impliquant des interactions électrostatiques ou hydrophobes, des forces passives et stériques (Servin et Coconnier, 2003). Deux exemples de ces modes de compétition sont présentés dans la (Fig. 3).



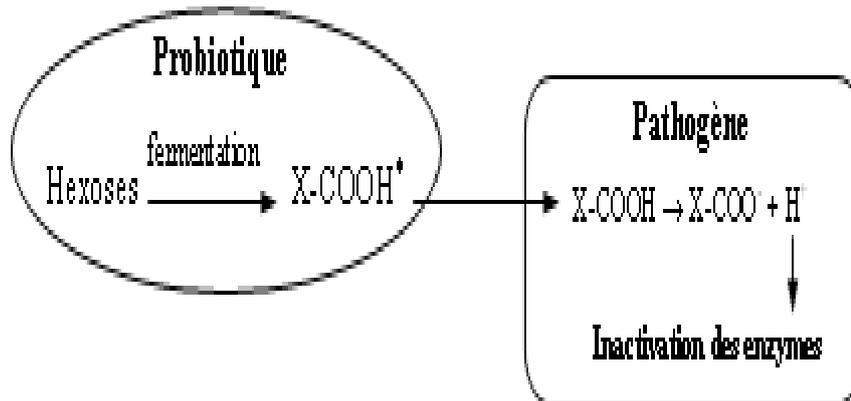
**Figure 3 :** Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière dû à l'adhésion spécifique (a) et non spécifique (b) des probiotiques. (Servin et Coconnier, 2003)

Des études pionnières effectuées par Bernet et *al.* (1993) ont démontré que des souches de bifidobactéries humaines adhérant fortement aux cellules intestinales Caco-2 inhibent l'adhésion de micro-organismes pathogènes comme *E. coli* entéropathogénique (EPEC) et *Salmonella typhimurium* à ces mêmes cellules lorsqu'elles sont placées en compétition. Mack et *al.* (1999) ont rapporté une inhibition complète de l'adhésion d'*E. coli* O157:H7 par l'ajout préalable de la souche *Lb. plantarum* 299v sur des cellules HT-29. Ces auteurs ont proposé, entre autres, que l'adhésion préalable des probiotiques aux cellules intestinales contribuerait à limiter l'accès des pathogènes aux entérocytes en plus d'augmenter la sécrétion du mucus qui pourrait lui aussi empêcher l'adhésion des pathogènes aux cellules intestinales.

### **I.5.2.2 .Production de substances antimicrobiennes**

Le troisième mécanisme d'action des probiotiques concerne l'inhibition de la croissance des pathogènes grâce à des composés antimicrobiens. Les bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* d'origine humaine peuvent produire des substances anti-microbiennes, telles que les acides organiques, qui sont actives *in vitro* et *in vivo* contre les micro-organismes entérovirulents impliqués dans les cas de diarrhées

(Servin, 2004). Les acides lactique et acétique sont produits *via* la fermentation des hexoses par les lactobacilles. Ces acides organiques peuvent diffuser passivement à travers la membrane bactérienne sous leur forme non dissociée (Fig. 4). Ils acidifient le cytoplasme après dissociation et inhibent l'activité enzymatique cellulaire des pathogènes acido-sensibles (Deng *et al.*, 1999). Cette diminution du pH peut donc affecter la viabilité des pathogènes bactériens (Bruno et Shah, 2002; Servin,2004).



**Figure 4 :** Mode d'action des acides organiques produits par les probiotiques contre les pathogènes bactériens (Servin et Coconnier, 2003)\*X-COOH = CH<sub>3</sub>-CHOH-COOH dans le cas de l'acide lactique ou CH<sub>3</sub>COOH dans le cas de l'acide acétique.

### I.5.2.3. Compétition au niveau de l'utilisation des nutriments

L'inhibition de la croissance des pathogènes peut également s'effectuer par un processus de restriction des nutriments. Il est évident que la capacité des micro-organismes à entrer en compétition pour limiter les nutriments disponibles est un facteur non négligeable qui détermine la composition du microbiote. Ainsi, une augmentation du nombre de lactobacilles obtenue lors d'un traitement probiotique permettrait de diminuer les substrats disponibles pour l'implantation de micro-organismes pathogènes (Fooks et Gibson, 2002).

### I.5.3. Les probiotiques en aquaculture

Suite aux limitations d'utilisation des antibiotiques, de nombreuses études font état d'essais d'utilisation des probiotiques en aquaculture (Irianto et Austin, 2002a). De nombreux genres bactériens sont testés, par rapport à leur présence naturelle dans l'environnement des animaux (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*) ou par rapport à leurs propriétés antibactériennes décrites chez d'autres animaux (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*).

Plusieurs études ont démontré certains modes de l'action des probiotiques en vigueur dans le milieu aquatique. Dans un article de Bairagi et *al.* (2004), l'ajout de *B. subtilis* et *B. circulans* à l'alimentation de rohu, *Labeo rohita*, a montré un effet positif. En effet, ils ont constaté que l'ajout des deux *Bacillus spp* intestinaux accrues les performances des poissons à en juger par un certain nombre de facteurs, notamment la croissance, le taux de conversion alimentaire, et le coefficient d'efficacité protéique. Ils attribuent cela à la production extracellulaire d'enzymes cellulolytiques et amylolytiques des bactéries. D'autres essais ont été réalisés sur plusieurs espèces dont l'anguille japonaise (*Anguilla japonica*), le tilapia rouge et la crevette (*Litopenaeus stylirostris* (Castex et *al.*, 2006). Les résultats ont montré qu'une alimentation supplémentée avec la bactérie lactique *Pediococcus acidilactici* MA18/5M permettait, sur ces espèces, d'améliorer des paramètres comme la mortalité, le taux de croissance et l'indices de conversion alimentaire. Gatesoupe (2002) avait également montré une amélioration de la croissance de *Pollachius pollachius* à l'état larvaire lorsque les artémies destinées à leur alimentation recevaient cette bactérie. Maurilio et *al.* (2002) ont démontré que l'utilisation des bactéries *Streptococcus faecium* et *Lactobacillus acidophilus* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme probiotiques dans les régimes des alevins de tilapia améliore la croissance des animaux, et atténue les effets de facteurs de stress.

Un premier brevet appliqué à la salmoniculture a été déposé en copropriété par l'Ifremer et l'INRA en 2003. Les recherches se poursuivent pour développer de nouveaux traitements probiotiques pour les poissons, les mollusques et les crustacés (F.A.O, 2002).

Basé sur la relation complexe d'un organisme aquatique avec l'environnement extérieur par rapport à celle des animaux terrestres, des effets additionnels d'action des probiotiques doivent également être considérés y compris, le changement de la qualité de l'eau et l'interaction avec le phytoplancton (Verschuere et *al.*, 2000a). Le phytoplancton est capable de produire des substances toxiques pour d'autres bactéries qui pourraient agir de manière bénéfique.

Par exemple, *Skeletonema costatum*, une microalgue couramment utilisés dans la larviculture des mollusques et crustacés, a la capacité de produire un extrait organique capable d'inhiber la croissance des *Listonella anguillarum* et trois autres vibrions (Naviner et *al.*, 1999). Une autre étude a montré que la microalgue *Caulobacter sp.* produit l'antibiotique thiotropocine (Kawano et *al.*, 1997). Ce composé a la possibilité non seulement d'être inhibiteur envers *Lactococcus garvieae* une bactérie pathogène des poissons, mais a également une activité

antimicroalgal contre *Skeletonema costatum* et *Heterosigma akashiwo*. C'est pourquoi il est important de faire une étude sur l'effet qu'aura l'ajout d'une bactérie probiotique sur le phytoplancton (Kawano et *al.*, 1997).

**CHAPITRE II**  
**FLORE LACTIQUE D'*Engraulis***  
***encrasicolus***

## CHAPITRE II : FLORE LACTIQUE

### *D'Engraulis encrasicolus*

#### **II.1. Les interactions entre les bactéries et les poissons.**

Les interactions entre les microorganismes et l'hôte peuvent être de trois types: symbiose, commensalisme et pathogénicité (Hooper et Gordon, 2001). L'hôte est protégé contre la microflore intestinale pathogène par les barrières chimiques et physiques formées par l'épithélium gastro- intestinal (Kagnoff et Echmann, 1997). Il est difficile de généraliser les relations entre les poissons et les bactéries en tant que groupe en raison de la diversité des espèces de poissons, l'environnement des poissons et la variété des besoins métaboliques des bactéries. Les bactéries peuvent coloniser les surfaces de poissons, y compris les œufs, la peau, les branchies et le tractus gastro- intestinal, tandis que les organes internes comme les muscles, les reins, le foie et la rate des poissons en bonne santé sont normalement exempts de bactéries (Austin 2006; Cahill, 1990). La couche de mucus, qui sert de couche protectrice pour le poisson, peut fournir des sites d'adhérence aux bactéries. Ces dernières peuvent être classées en deux grandes catégories en fonction de leur capacité à croître et à se multiplier sur la surface. Les bactéries indigènes ou autochtones se réfèrent à des bactéries qui peuvent se développer et se multiplier sur la surface du poisson hôte, tandis que les bactéries transitoires ou allochtones ne le peuvent pas (Brock et *al.*, 1994). La fixation des bactéries pathogènes dans le tractus intestinal est souvent la première étape de la pathogénèse. La translocation de bactéries par endocytose à partir du tractus gastro-intestinal a été observée dans le tractus gastro-intestinal des poissons (Ringo et *al.*, 2003 ; Ringo et *al.*, 2007).

#### **II.2. Développement du tractus gastro-intestinal des larves de poisson**

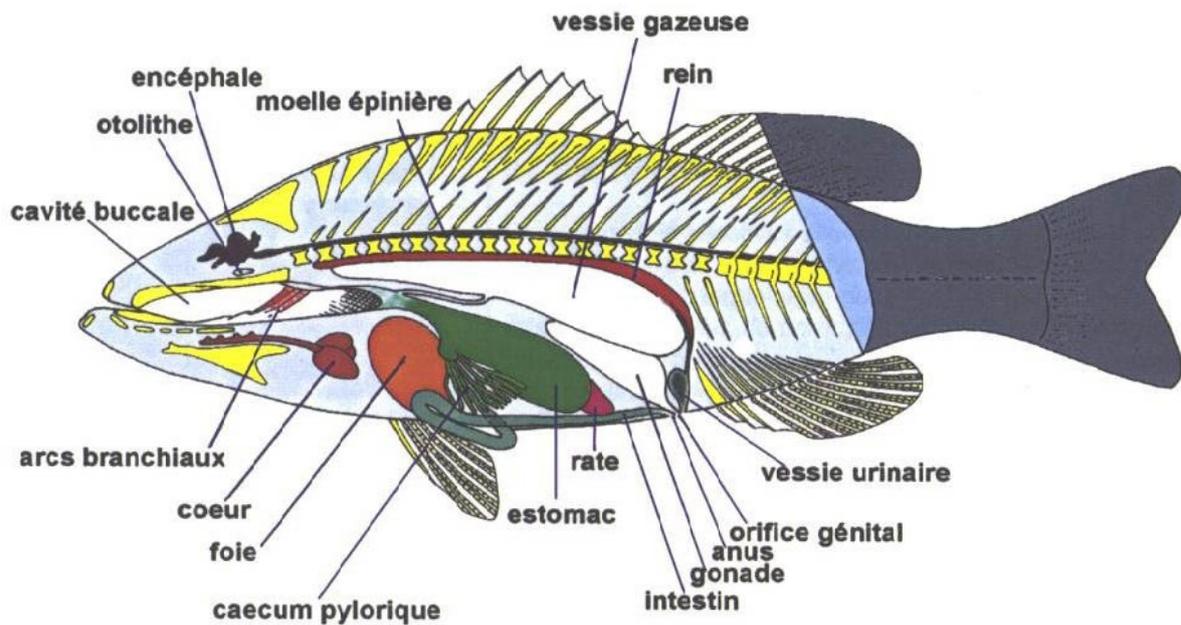
L'anatomie et le développement du tractus gastro-intestinal des larves de poisson pourraient influencer sur les communautés bactériennes qui habitent le tractus gastro- intestinal. Le développement des organes digestifs et les enzymes sécrétées pourrait intervenir dans la sélection de telles ou telles communautés bactériennes gastro- intestinales (Fuiman, 2002).

Les larves de poissons subissent de nombreuses modifications physiologiques de l'éclosion jusqu'à ce qu'ils deviennent des juvéniles. La plupart des changements physiologiques au

cours de la période larvaire sont équilibrées entre l'ontogenèse, la différenciation et la réorganisation des tissus, et l'augmentation de la masse (Fuiman, 2002). Comme pour le reste du corps, le tube digestif des larves de poissons passe aussi par des changements majeurs. Après l'éclosion, l'intestin des larves est un simple tube indifférencié. Comme les larves se développent, le tube digestif se différencie en différents segments (intestin antérieur, l'intestin moyen, gros intestin) et les tissus digestifs et les organes tels que le pylore caecum, le pancréas, la vésicule biliaire, le foie vont mûrir (Govoni et *al.*, 1986; Infante et Cahu, 2001; Kolkovski, 2001; Rust, 2002; Yufera et Darias, 2007). En plus des évaluations histologiques et morphologiques, d'autres signes de développement du tractus gastro-intestinal comprennent la production d'exo-enzymes, d'acides et le degré d'homogénéisation des excréments, ce qui signifie généralement une digestion plus complète, et l'assimilation accrue des nutriments complexes (Baglolle et *al.*, 1998; Infante et Cahu, 2001; Ronnestad et *al.*, 2000; Rust, 2002).

### **II.3. La mise en place de la flore intestinale des larves de poisson**

Les animaux naissent axéniques (dépourvus de germes), mais après un ou deux jours s'installe une population microbienne spécifique pour chaque espèce animale. Les microorganismes colonisent le tractus digestif des animaux nouveau-nés selon des modèles distincts d'une espèce animale à l'autre appelé séquences d'établissement (Hansen et Olafsen 1999). Pendant la colonisation, les microorganismes s'organisent sous forme de populations en état d'équilibre, créant ainsi des habitats ou niches le long du tractus digestif. Les bactéries présentes dans l'eau s'infiltrent dans le tractus gastro-intestinal des larves de poissons marins avant même la première prise alimentaire (Hansen et Olafsen 1999). Puisque les larves ont besoin de consommer l'eau de mer pour leur osmorégulation, les bactéries entrent dans le tractus gastro-intestinal avec l'eau et créent une flore dans le poisson (Hansen et Olafsen 1999). Une fois l'alimentation débutée, la composition des microorganismes dans le tractus gastro-intestinal peut être affectée par la charge bactérienne et la composition du régime alimentaire, ainsi que l'eau ambiante (Nicolas et *al.*, 1989 ; Tanasomwang et Muroga, 1989; Bergh et *al.*, 1994; Grisez et *al.*, 1997; Hansen et Olafsen 1999; Birkbeck et Verner-Jeffreys, 2002). Les populations bactériennes dans l'eau peuvent avoir un effet bénéfique sur la croissance larvaire et la survie. L'application de probiotique dans l'eau, a montré son efficacité pour améliorer la survie et la croissance du turbot (Skjermo et *al.*, 1997; Salvesen et *al.*, 1999) (fig.5).



**Figure 5 :** Organisation interne d'un poisson omnivore (Beaumont et cassier, 1997)

#### II.4. Composition de la microflore intestinale

Il existe de grandes différences entre les espèces terrestres et aquatiques dans le niveau d'interaction entre le microbiote intestinal et le milieu environnant. Aussi, de nombreuses variations dans la morphologie du tractus gastro-intestinal existent entre les différentes espèces de poissons (Ringo et *al.*, 2003). Selon les habitudes alimentaires et l'alimentation, il est généralement admis de diviser les poissons en carnivores, herbivores, omnivores et détritivores. Selon Tanaka et *al.* (2004), Ringo et *al.* (2006a) et Yang et *al.* (2007) le type de nourriture est important pour la composition et l'activité du microbiote gastro-intestinal des poissons.

La flore intestinale se compose de bactéries aérobies, anaérobies facultatives et anaérobies strictes. De nombreuses enquêtes sur la flore bactérienne du tractus gastro-intestinal des poissons ont été réalisées au cours des vingt dernières années et de nombreux rapports ont montré que les bactéries Gram-négatives et anaérobies facultatives telles que : *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Aeromonas*, *Bacteroides*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Protéobactérie* et *Vibrio* spp. constituent la flore dominante endogène de beaucoup de poissons marins (Cahill, 1990; Onarheim et *al.*, 1994; Blanch et *al.*, 1997; Ringo et *al.*, 2006; Brunvold et *al.*, 2007; Zhou et *al.*, 2009). Contrairement aux poissons de mer, la flore endogène des espèces de poissons d'eau douce tend à être dominée par *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* représentant de la famille des entérobactéries. Les bactéries anaérobies obligatoires sont *Bacteroides*, *Clostridium* et

*Fusobacterium* (Sakata, 1990; Huber et al., 2004; Kapetanovic et al., 2005; Hovda et al., 2007; Kim et al., 2007).

Diverses espèces de bactéries lactiques (LAB) (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, et *Carnobacterium* spp) font également partie de ce microbiote. Ils ne sont pas dominants, mais certaines souches peuvent coloniser l'intestin (Ringo et Gatesoupe, 1998; Balcázar et al., 2007b). Les bactéries lactiques sont devenues une importante source de préoccupation pour l'aquaculture. En effet, en plus des espèces véritablement pathogènes comme *Streptococcus*, *Lactococcus iniae* et *Lc. garvieae*, plusieurs espèces ont été signalées comme occasionnellement nocives dans des zones géographiques limitées, et de nombreux isolats non identifiés ou mal définis sont régulièrement isolés de poissons (Michel et al., 2007).

Les levures ont été fréquemment isolées dans le microenvironnement intestinal. Elles constituent une partie importante de la flore intestinale et peuvent stimuler la réponse immunitaire, le métabolisme et la croissance (Andlid et al., 1998; Gatesoupe, 2007).

## **II.5. Rôle de la micro flore intestinale**

Le microbiote intestinal exerce de nombreuses fonctions physiologiques, dont la plupart d'entre elles, sont nécessaires et bénéfiques pour le maintien de la santé de l'hôte. Parmi ces fonctions elle joue un rôle essentiel dans la physiologie nutritionnelle ;en ;facilitant ;la ; digestion et l'absorption des différents nutriments. La flore intestinale peut métaboliser de nombreuses substances d'origine exogène (les résidus alimentaires non digérés dans la partie supérieure du tractus digestif) et endogène (mucopolysaccharides, cellules desquamées et enzymes synthétisés par l'hôte). La dégradation et la fermentation de ces substrats conduisent ensuite à la production de divers métabolites comme des acides gras à chaîne courte (AGCC), des vitamines B (B1, B2, B6 et B12) et de vitamine K. L'ensemble de ces productions fournit aux bactéries l'énergie nécessaire à leur croissance et au maintien de leurs fonctions cellulaires. Ces activités sont également importantes pour l'hôte puisque les métabolites formés sont, pour la plupart, absorbés et utilisés par l'organisme. Il a été clairement montré que le microbiote intestinal contribue à l'absorption par l'hôte de glucides et de lipides (Backhed, Ley et al., 2005; Sonnenburg, Xu et al., 2005) et régule le stockage des graisses.

Bairagi et al. (2002) ont évalué les bactéries aérobies associées au tube digestif de neuf poissons d'eau douce. Ils ont déterminé que les souches sélectionnées produisent des enzymes digestives, facilitant ainsi l'utilisation des aliments et la digestion.

Elles consomment les nutriments disponibles limitant la source de nutriments pour les pathogènes et entrent en compétition avec les pathogènes pour l'accès aux récepteurs de l'hôte. De plus, elles sécrètent des molécules antimicrobiennes telles les bactériocines au niveau de la surface épithéliale et agissent aussi sur le milieu (p. ex. acidification) (Bairagi et al., 2002, Azizpour et al., 2009).

## **II.6. Présentation de l'anchois *Engraulis encrasicolus***

### **II.6.1. Introduction**

Parmi les espèces pélagiques existantes et les plus répandues dans nos régions, on trouve l'Anchois européen : *Engraulis encrasicolus* (Linné, 1758) qui est un poisson gras, appartenant à la classe des poissons osseux à nageoires ventrales et abdominales, il représente le genre des *Engraulis* dans la famille des *Engraulidae*. Ce poisson, mesurant généralement une vingtaine de centimètre (Draganikof et Wyszynski, 2004), est caractérisé par un allongement du museau en rostre au-dessus de la bouche infère largement fendue jusqu'en arrière des yeux, un dos bleu à bleu vert, flancs et ventre argentés avec des reflets dorés sur les opercules. Chaque opercule porte une petite tache noire, suivie d'un alignement de plusieurs autres taches sur les flancs (Basilone et al., 2004).

Cette espèce est distribuée généralement dans l'atlantique nord-est, l'Afrique de sud du Maroc à la mer du nord et en méditerranée. Certaines années de fortes chaleurs, elle peut être observée plus au nord jusqu'à la Scandinavie (Turan et al., 2006).

La nourriture de l'anchois européen se base sur les zooplanctons, plus précisément sur les copépodes et les larves des crustacés. Sa croissance, comme celle de tous les poissons, se poursuit pendant toute la durée de sa vie, elle est très rapide la première année pour ralentir ensuite. Sa longévité atteint 5 ans mais la grosse majorité des individus ne dépasse pas trois ans. Il vit et se déplace en bancs, sensible à la qualité des masses d'eaux et a une affinité particulière pour les eaux légèrement dessalées (Bemiasa, 2009).

La ponte de l'anchois est suivie d'une période (août à novembre) de forte croissance qui peut aller jusqu'à 75 % de sa croissance annuelle. A partir des zones de pontes, les œufs et larves dérivent au gré des courants. Les larves qui restent sur le plateau continental bénéficient d'une meilleure croissance et d'un taux de survie plus important. Par contre, En méditerranée, la période de ponte est assez longue, elle s'étendrait d'avril à septembre, avec un maximum très marqué en juin-juillet (Fage, 1920).

### II.6.2. Description de l'anchois

- L'anchois se trouve dans l'Atlantique nord-est, la mer du Nord et en Méditerranée. Il vit dans les eaux côtières jusqu'à 150 m de profondeur, évoluant entre la surface et le fond. Il apprécie les eaux dessalées : on peut donc le trouver dans les estuaires et les étangs aux eaux saumâtres.
- Il existe deux types d'anchois : les “anchois littoraux” d'eaux saumâtres et les “anchois du large”.
- La bouche de l'anchois est largement fendue, jusqu'en arrière des yeux.
- Le corps de l'anchois est bleuté allongé et cylindrique,
- La mâchoire inférieure est plus courte que la supérieure.
- Grandes écailles caduques.
- Dos bleu à bleu vert, flancs et ventre argentés. Reflets dorés sur les opercules.
- Chaque opercule porte une petite tache noire, suivie d'un alignement de plusieurs autres taches sur les flancs.



**Figure 6** : Photographie illustrant *d'E. encrasicolus*.

### II.6.3. Classification

Règne	Animalia
Embranchement	Chordata
Classe	Actinopterygii
Ordre	Clupeiformes
Famille	Engraulidae

### II.6.4. Mode de vie et la biologie de l'anchois

L'Anchois atteint sa maturité sexuelle dès 1 an. Les adultes frayent deux à trois fois au cours de leur vie. Les oeufs et les larves sont pélagiques. Leur nourriture est composée de zooplancton ainsi que de phytoplancton. L'anchois se reproduit dans des eaux entre 14° et 19°. C'est un petit poisson qui croît très rapidement, se nourrissant de petits crustacés planctoniques, d'oeufs et d'alevins de poissons pélagiques. Il mesure 20 cm maximum, et se pêche au chalut pélagique ou à la senne tournante. (Fritsch, 2005).

L'Anchois d'Atlantique NE/Méditerranée (Anchovies en anglais). L'anchois est pêché au chalut pélagique ou à la senne. L'anchois est un petit poisson bleu surtout commercialisé transformé.

Seule une petite partie des captures d'anchois dans le monde finit dans nos assiettes car la grande partie des anchois finit transformée en farine et huile de poisson et sert à fabriquer des engrais, des compléments alimentaires ou à l'alimentation animale. L'anchois ne vit pas longtemps et se reproduit vite. (Pannella, 1971).

L'anchois résiste plutôt bien à la pression de la pêche et restait encore assez abondant il y a peu . Mais aujourd'hui, les quotas sont en forte baisse faisant de ce poisson un produit rare...

Les premiers sont localisés sur nos côtes, entre les embouchures de la Vilaine et de la Loire jusqu'à la baie de Bourgneuf et dans l'embouchure de la Gironde, en Méditerranée et dans l'étang de Thau. Les anchois du large se trouvent dans le Golfe de Gascogne jusqu'en octobre. Ils ne reviennent sur le littoral qu'avec le retour du printemps.

**Partie II**  
**Etude expérimentale**

# **CHAPITRE III**

## **Matériels et méthodes**

## CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

### III.1. l'objectif du travail

L'objectif de cette étude consiste à isoler de nouvelles souches lactiques à partir de l'anchois *Engraulis encrasicolus* et vérifier leur caractère probiotique.

### III.2. Matériels biologiques

500grammes d'anchois *Engraulis encrasicolus* fraîchement pêchés ont été échantillonnés du port de Salamandre de la wilaya de Mostaganem.

### III.3. Milieux de culture

Les milieux utilisés au cours de ce travail sont :

- l'eau peptonée pour l'enrichissement.
  - Le milieu MRS (de Man et *al.*, 1960) à pH 6,2 pour la croissance de la microflore lactique totale,
  - Les milieux MRS/M17 inclinées, pour les cultures et la conservation des souches à court terme;
  - Le lait écrémé reconstitué à 10%, utilisé pour l'étude du pouvoir acidifiant des bactéries et l'étude de l'activité protéolytique ;
  - Bouillons hypersalés pour le test de croissance en présence de NaCl ;
  - Bouillons ajusté à pH=9,6 pour le test de croissance sur milieu hyperalcalin ;
  - Lait écrémé additionné de 0.5 mL d'une solution de citrate de Na pour le test de production du CO<sub>2</sub> ;
  - Gélose nutritive pour le test de production de CO<sub>2</sub> ;
  - Bouillon Clark et Lubs pour test de production d'acétoine ;
  - Milieu Muller Hinton pour l'activité antimicrobienne ;
  - Bouillon nutritif pour la réactivation des souches pathogènes.
- La composition et les modes de préparation de ces milieux sont indiqués en Annexe.

### III.4. Isolement des bactéries lactiques

Dès l'arrivée au laboratoire, les poissons sont disséqués dans des conditions d'asepsie. 25 grammes de l'intestin et 25 grammes de la chair sont prélevés séparément dans des

conditions stériles, ensuite broyés et homogénéisés par vortex avec 225mL d'eau péptonnée saline (NaCl 8,5 g.l<sup>-1</sup>; bactopectone 1 g.l<sup>-1</sup>) (Fig .7) et l'incubation est faite pendant 24h à température ambiante.



**Figure 7** : Photo illustrant le matériel utilisé pour la dissection des poissons.

### **III.5.Purification des isolats bactériens**

Les dilutions adéquates ont été ensemencées sur milieux MRS et M17 suivis d'une incubation à 30°C pendant 24h-72h.

On prend de chaque boîte 10 colonies isolées qui présentent les caractéristiques typiques des bactéries lactiques, à savoir la couleur blanchâtre, le diamètre entre 2 et 3mm, avec un contour régulier sur lesquelles sera effectuée une coloration de Gram et une recherche de la catalase. Les bactéries à Gram<sup>+</sup> et catalase<sup>-</sup> sont retenues et repiquées sur bouillon MRS/M17. L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une culture pure dont la pureté est estimée par observation microscopique après coloration de Gram (Balaws et *al*, .1991, Curk et *al*,.1996, Helenisoldatou et *al*, 2006).

### **III.6. Pré-identification des isolats**

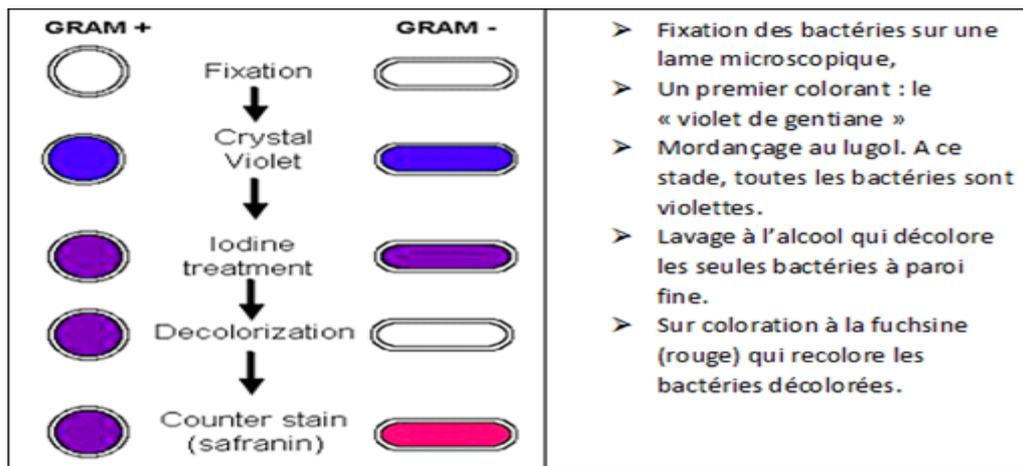
#### **III.6.1. Caractérisation macroscopique**

Une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies, obtenues sur milieu solide (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité, couleur).

#### **III.6.2. Caractérisation microscopique**

L'observation microscopique avec l'objectif à immersion (G x 100) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association (Joffin et

Leyral, 1996) après la coloration de Gram illustrée sur la figure numero 8.



**Figure 8:** Représentation schématique des étapes de coloration de Gram.

### III.6.3. Test de catalase

- Déposer une goutte d'eau d'oxygénée sur une lame.
  - Y déposer, à l'aide de l'anse de platine ou d'une pipette Pasteur bouillée, une colonie isolée de la souche à tester
  - Observer l'apparition de bulles
    - ✓ dégagement gazeux : production d'O<sub>2</sub> provenant de la dégradation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : souche catalase +
    - ✓ Absence de dégagement gazeux : absence de production d'O<sub>2</sub> provenant de la dégradation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : souche catalase -
- > les bactéries aux formes bacillaires Gram (+) et catalase (-) sont repiquées sur le bouillon MRS/M17

### III.7. Conservation des isolats

Diverses techniques peuvent être utilisées pour la conservation des souches pures.

#### III.7.1. Conservation de courte durée (quelques semaines)

Chaque souche est ensemencée sur gélose inclinée en tube. Après incubation à 30°C, et dès l'apparition d'une bonne croissance bactérienne, les tubes sont placés à 4°C. Un repiquage périodique est nécessaire (Saidi *et al.*, 2002).

#### III.7.2. Conservation de longue durée (quelques mois à plusieurs années)

La conservation se fait à -20 °C sur milieu MRS additionné de glycérol 40% (V/V) pour une

durée prolongée (Samelis et *al.*, 1994 ; Herrero et *al.*, 1996).

### **III.8. Identification des bactéries lactiques**

#### **III.8.1. Tests physiologiques**

##### **A. Test de croissance à différentes températures (15 et 37°C)**

Ce test est réalisé pour les cocci et les bacilles, il permet de différencier les souches thermophiles des mésophiles, ce test est réalisé en bouillon MRS. La croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24 heures à 72 heures (jusqu'à une semaine) à 15 et 37 °C en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (**Hassaine, 2013**).

##### **B. Test de croissance en présence de 2,5 ; 4 et 6,5 % de NaCl**

Ce test permet de savoir si les bactéries ont la capacité de croître dans un milieu hypersalé, ce qui permet classiquement de distinguer les entérocoques et les cocci. La méthode consiste à ensemencer ces bactéries dans des tubes de milieu MRS à 2,5 ; 4 et 6,5% de NaCl et les incuber à 30°C pendant 24 à 72 heures. Après incubation, la croissance de ces bactéries se manifeste par un trouble du milieu en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (**Hassaine, 2013**).

##### **C. Test de croissance à un milieu hyperalcalin**

Ce test est réalisé uniquement pour les cocci en milieux MRS dont le pH est ajusté à 9,6. La croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24 heures à 72 heures en comparaison avec un tube témoin non ensemencé (**Hassaine, 2013**).

#### **III.8.2. Tests biochimiques**

##### **A. Test de production de CO<sub>2</sub> à partir du glucose**

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires (**Guiraud, 2003**).

Il consiste à mettre en évidence la production du gaz (CO<sub>2</sub>). De jeunes souches préalablement préparées sont ensemencées dans des tubes contenant du bouillon MRS, avec une cloche de Durham. Après incubation à 37°C pendant 24–48 heures, la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (**Hariri et al, 2009**)

Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO<sub>2</sub>, par contre les souches hétérofermentaires vont produire l'acide lactique et le CO<sub>2</sub> a proportions égales (**Carr et al, 2002**)

### **B. Test de production de CO<sub>2</sub> à partir du citrate**

Une série de tubes de lait écrémé stérile (10%) est préparée. On ajoute 0,5ml d'une solution de citrate de sodium (10%) dans chaque tube. Après agitation, on laisse reposer 30 minutes. Chaque tube est inoculé par 0.1 ml d'une culture jeune et additionné de 4ml d'une gélose blanche fondue et refroidie. Après mélange et solidification, on incube à 37°C pendant au moins 3 jours. La production de gaz se traduit par la fragmentation de la gélose dans le tube (Sahnouni, 2013).

### **III.8. 3. Tests technologiques**

#### **A. Production d'Acétoïne**

La recherche de l'acétoïne est testée par la réaction de Voges-Proskauer (VP) après une culture de 24h à 37°C sur milieu Clark et Lubs(annexe).

Ajouter 5 gouttes du réactif VP1 (solution de soude NaOH à 16% dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VP2 (alpha-naphtol à 6% dans l'alcool à 95°). Agiter soigneusement les tubes et attendre un temps maximum de 10 min.

La présence d'acétoïne se traduit par une coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu (Belarbi, 2011).

#### **B. Hydrolyse de l'arginine (ADH)**

Elle est mise en évidence sur un milieu de Moëller, pour chaque souche isolée ensemencé ; un tube de bouillon Moëller arginine et un tube témoin (Moëller sans arginine) recouvrir le milieu avec 4 à 5 mm d'huile de paraffine (V/V) stérilisé. Après 2 à 6 jours d'incubation à 37°C la culture dans le tube témoin se manifeste par un virage au jaune dû à l'acidification du milieu (métabolisme du glucose). La dégradation de l'arginine aboutissant à la formation d'ammoniaque est révélée par alcalinisation du milieu qui devient violet (Belarbi, 2011).

#### **C. Production des exopolysaccharides**

La production de dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu hypersaccharosé gélosé. Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes. Ce test est aussi considéré comme clé d'indentification permettant aussi de différencier entre les *Leuconostocs* productrices et non productrices de dextrane (Mami, 2012).

#### **D. Test de la thermorésistance**

Des tubes contenant 10 ml de MRS liquide sont inoculés par les souches isolées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à 63,5°C pendant 30 minutes, après refroidissement brusque, elles sont incubées à 37°C pendant 48 à 72h. Un résultat positif se traduit par un trouble (Mahi, 2010).

#### **E. Test de croissance en présence de bleu de méthylène**

Ce test indique l'aptitude des bactéries à pousser en présence de bleu de méthylène qui est bleu en milieu très oxydant, incolore en milieu réduit. Chaque culture à tester a été ensemencée dans le lait écrémé au bleu de méthylène à 0.1% et à 0.3%. Après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h, on note les observations relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait. Les *lactocoques* réduisent le bleu de méthylène avec coagulation, en revanche *les streptocoques* thermophiles sont sensibles à ce colorant (Menad, 2017).

#### **F. test de fermentation des sucres**

Ce test est réalisé en établissant leurs profils fermentaires à l'aide de galeries biochimique API20 A (Larpen, 1996).

#### **G. Test d'oxydase**

Une colonie bactérienne est mise sur un disque pré-imprégné par le réactif N-diméthylparaphénylène diamine avec une pipette Pasteur. Les bactéries produisant l'oxydase donnent une couleur violette après une minute (Guiraud, 1998; Delarras, 2007)

### **III.9. Sélection des souches probiotiques**

#### **A. Test de résistance aux sels biliaires**

Le but de cette étude est de sélectionner des souches lactiques extrêmophiles qui peuvent résister aux barrières physiologiques du tube digestif (pH stomacal bas, péristaltisme intestinale et concurrence bactérienne au niveau du gros intestin la méthode utilisée est celle de Ziar et al.(2012).

La résistance des isolats bactériens aux sels biliaires a été déterminée dans des tubes à essai contenant le bouillon MRS/M17 et 0.3% de sels biliaires à pH= 6.4, les tubes sont inoculés avec une culture jeune puis incubés à 37°C pendant 24 à 48h. Le test est considéré positif s'il y'a une croissance bactérienne.

### B. Test de Résistance aux pH acides

Bien que dans l'estomac, le pH peut être aussi bas que 1, la plupart des essais *in vitro* utilise un pH 3,0. En raison du fait qu'une diminution significative de la viabilité de souches est souvent observée à pH 2 et en dessous et parce que les aliments restent pendant 3h ce qui est pris en compte (Prasad *et al.*, 1998). Après 18h d'incubation dans un bouillon MRS/M17, et après centrifugation pendant 10min à 5000 tour/min, le culot est lavé une fois avec une solution stérile de tampon phosphate salin (PBS) à pH 7,2 puis remis en suspension dans du PBS pH 1, 2 et 3 et incubés à 30°C (El Naggar 2004, Yavuzdurmaz, 2007). Au cours de l'incubation de 3h, La croissance a été vérifiée par la mesure de la densité optique (D.O.<sub>600</sub>) et par un dénombrement sur MRS solide toutes les heures.

### C. la recherche d'une activité antimicrobienne

- **Réactivation de souches pathogènes**

Les souches pathogènes ont été réactivées en transférant 10uL de la culture conservée à 10mL de bouillon nutritif. L'incubation a été faite à 37°C pendant 24h. Après incubation, la densité optique a été ajustée à 10<sup>8</sup> UFC/ML. Les souches pathogènes testées sont représentées dans le tableau 3.

**Tableau 3** : liste des souches bactériennes et fongiques étudiées

Souches	Code	Famille
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862	<i>Staphylococcaceae</i>
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	Bacillaceae
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	<i>Saccharomycetaceae</i>

ATCC: American Type Culture Collection.

- **Méthode de diffusion en puits AWDT (method de Barefoot et Kaenhammer, 1983)**

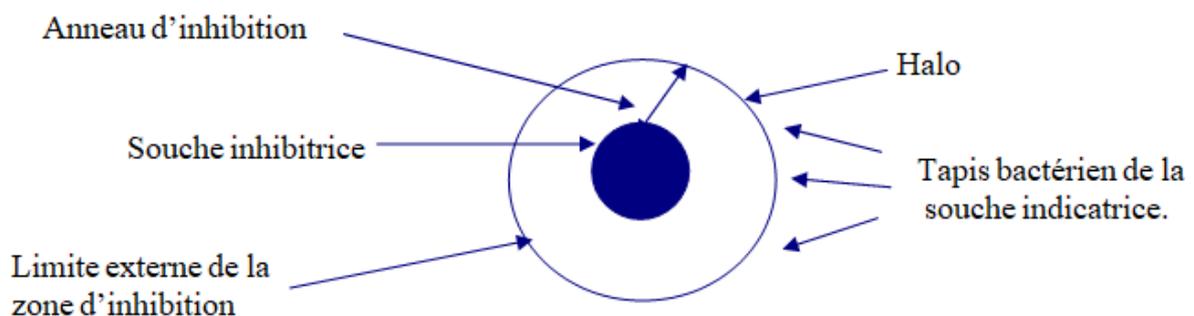
La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie, repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu semi solide (gélose molle), l'effet du produit antimicrobien sur la

cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. dans la technique de diffusion il y'a une compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit testé (Broadasky et *al.*, 1976).

Cette méthode consiste à couler 21mL de milieu Muller Hinton avec 100ul d'une culture jeune de 18h d'incubation et dont la charge cellulaire est de l'ordre de  $10^7$  UFC/mL sur une boîte de pétri.

Après solidification, des puits sont creusés. Généralement on réalise 1 puit de 6mm de diamètre par boîte. Un volume de 80ul de souche pathogène est mis dans les puits. Les boîtes de pétri sont incubées à 37°C/24h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (pré-diffusion)

La lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition qui apparaissent ; le test est considéré comme positif si le diamètre est supérieur à 2mm (fig.9).



**Figure 9:** Représentation schématique des halos d'inhibitions.

- **Activité anti bactérienne des surnageants bactériens (effet bactériocine)**

Les bactéries lactiques qui ont produit des zones d'inhibition claires ont été cultivées dans un bouillon MRS/M17 pendant une nuit sous condition microaérophile à 37°C pendant 24h pour déterminer leur capacité à produire des inhibiteurs de type bactériocine.

Les cultures LAB ont été centrifugées à 12 000 xg pendant 10 minutes et le surnageant a été décanté dans des éprouvettes stériles. L'activité antimicrobienne du surnageant sans cellules a été déterminée deux fois (c'est-à-dire avant et après neutralisation à pH 6,5 avec NaOH 1 M) en utilisant l'essai de diffusion sur puits d'agar. 50ul du surnageant a été placé dans des puits de 6 mm coupés avec un perce-bouchon sur gélose Mueller Hinton refroidies inoculées avec  $0,2 \text{ ml} \times 10^7 \text{ UFC / ml}$  de souches pathogènes testées, après 1h de diffusion à température ambiante, les boîtes pétri ont été incubées à 37°C pendant 24h.

# **CHAPITRE IV**

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

### IV.1.Caractérisation phénotypique des isolats

La classification phénotypique utilise un certain nombre de caractères comme étant importants entre autre la morphologie et la mise en évidence d'un caractère biochimique. Elle ne reflète qu'un nombre restreint d'informations.

Dans le but de sélectionner uniquement les bactéries lactiques, nous avons procédé à la vérification des différents aspects :

**a)-Aspect macroscopique** : permet de décrire les colonies obtenues sur milieu solide après incubation, les comparant ainsi aux critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (contour, taille, pigmentation, aspect...) (Ana Belen Florez *et al.*, 2006). Concernant nos isolats testés, nous avons constaté sur milieu solide des colonies de petite taille d'environ 1 à 2 mm de diamètre, de forme circulaire, et de couleur blanchâtre (fig.10).

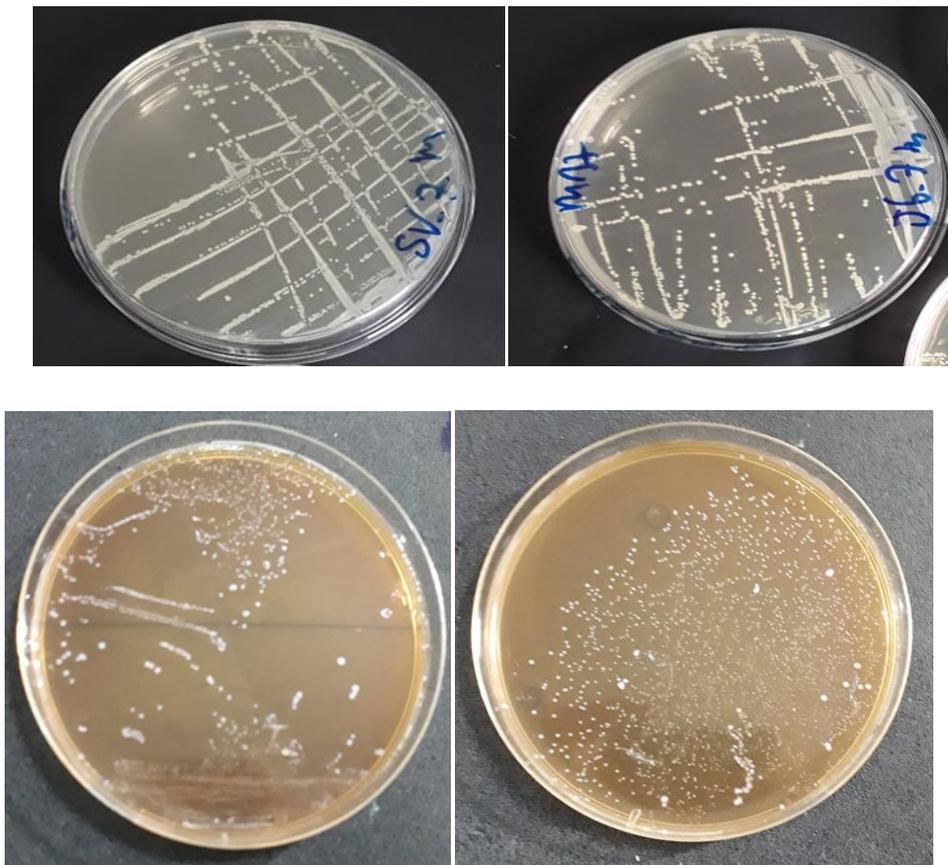


Figure 10: Aspect macroscopique des isolats sur milieu MRS et M17.

- Le test de production de la catalase est effectué par addition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aux colonies bactériennes. Tous les isolats ayant montré une réaction négative ont été retenus comme étant **catalase négative (-)**(fig. 11).



**Figure11:** test de catalase

#### **a) Observation microscopique**

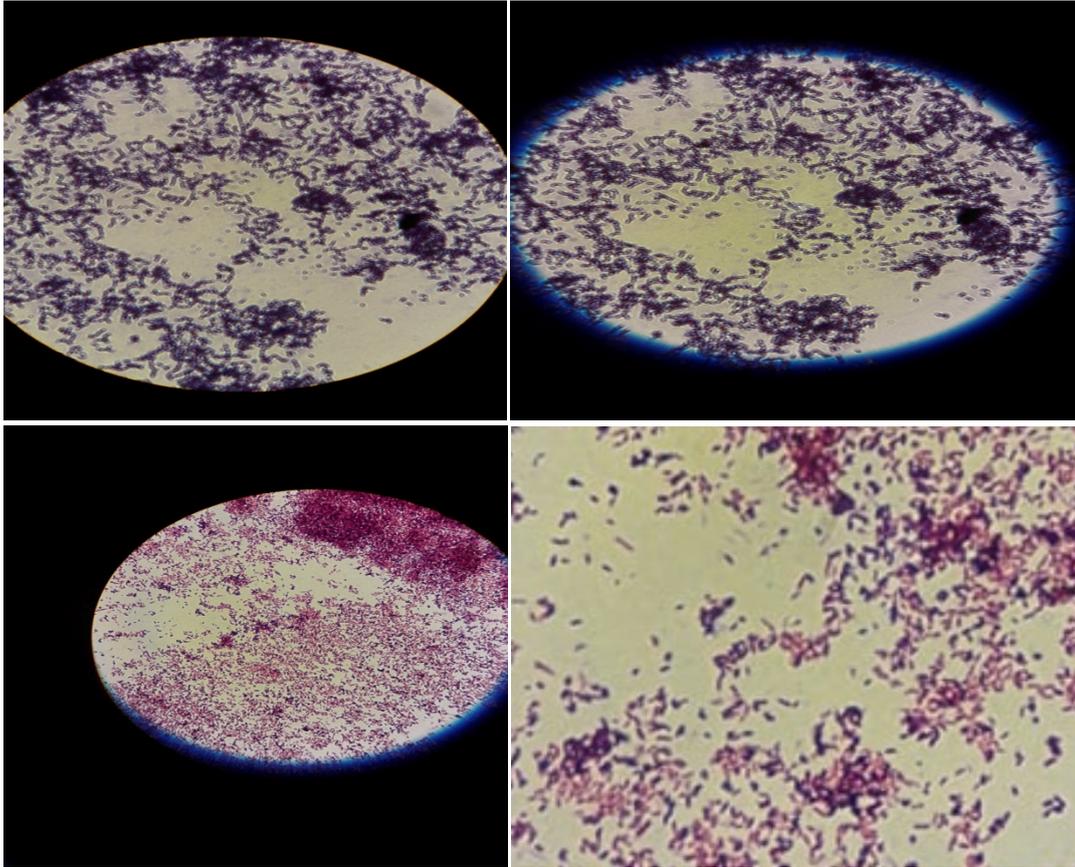
La technique de coloration de Gram a été appliquée, uniquement pour déterminer le Gram et la forme des isolats coques et bâtonnets. Seulement les isolats à Gram positif ont été retenus.

Il a été constaté la présence de différentes formes de cellules coques et bâtonnets (fig. 11 ). Le mode d'association varie d'un isolat à l'autre. Ces observations permettent de les classer initialement selon le Gram, leur morphologie et leur mode d'association (Joffin et Leyral, 1996).

#### **IV.2. Caractérisation biochimique des isolats**

Les résultats des tests effectués pour l'identification biochimique des isolats lactiques pré-identifiés sont rassemblés dans le **tableau 4**.

Quant à l'identification des isolats, elle a été faite à partir du schéma représentant les clés de différenciations rapportées par Carr et *al.*(2002), utilisés pour l'identification des bactéries lactiques.



**Figure 12** : Observation microscopiques (Objectif X100) des isolats lactiques après coloration de Gram.

Les critères de sélections pour une taxonomie peuvent être résumés comme suit :

- La croissance à différentes températures (15°C, 37°C et 4°C);
- L'aptitude à croître en présence de 2,5% ; 4% et 6,5% de NaCl;
- L'aptitude à croître à pH 9.6;
- La production de gaz;
- La fermentation des carbohydrates.
- la production d'acétoïne ;
- fermentation des sucres.

Tous les isolats étudiés se développent sur milieu MRS, M17 et MRSc additionné de 2,5%, 4% et 6.5 % de NaCl, le même résultat a été constaté pour le pH 9.6 (Tableau 4).

De même, les résultats étaient positifs pour la croissance à différentes températures (15°C, 37°C et 4°C), même pour la température 63.5°C (tous les souches sont thermorésistantes).

**Tableau 4:** Caractéristiques physiologiques et biochimiques des BL isolées.

Souche/ Test	(M17) Intestin 1	(M17) Intestin 2	(M17) Chaire 1	(M17) Chaire 2	(MRS) Intestin 1	(MRS) Intestin 2	(MRS) Chaire 1	(MRS) Chaire 2
catalase	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+
oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+
pH=9,6	+	+	+	+	+	+	+	+
pH=3	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 2,5 %	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 4 %	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 6.5 %	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
15°C	+	+	+	+	+	+	+	+
63.5°C	+	+	+	+	+	+	+	+

• **Tests de production du CO<sub>2</sub> et types fermentaires**

**a- A partir du glucose**

L'utilisation de cloches de Durham dans un milieu liquide contenant du glucose est une méthode pour la détection de la formation de gaz, et déduire ainsi le type fermentaire.

Ce test nous a permis de différencier les isolats homofermentaires des isolats hétérofermentaires. La présence de gaz dans la cloche de Durham indique un métabolisme hétérofermentaire (Kihal et *al.*, 1996).

Toutes les souches ont formé des bulles d'air dans la cloche cela se traduit par la formation du gaz sauf la souche (M17 chaire 1) donc les 7 souches sont hétérofermentaires alors que la souche (M17 chaire 1) est homofermentaire (Fig. 12).

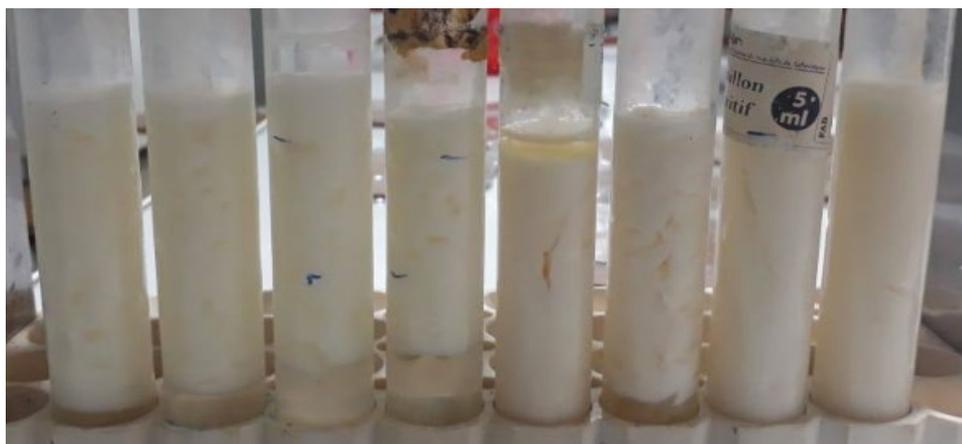


**Figure 13** : Résultat du type fermentaire pour les isolats (test production du CO<sub>2</sub>).

**b- à partir du citrate**

L'utilisation du lait écrémé additionné d'une solution de citrate de Na et gélose blanche fondue. La production du gaz se traduit par la fragmentation de la gélose dans le tube.

Tous les isolats étudiés induisent une fragmentation de la gélose sauf la souche (M17 chaire 1) et cela se traduit par une production du gaz (Fig. 13).



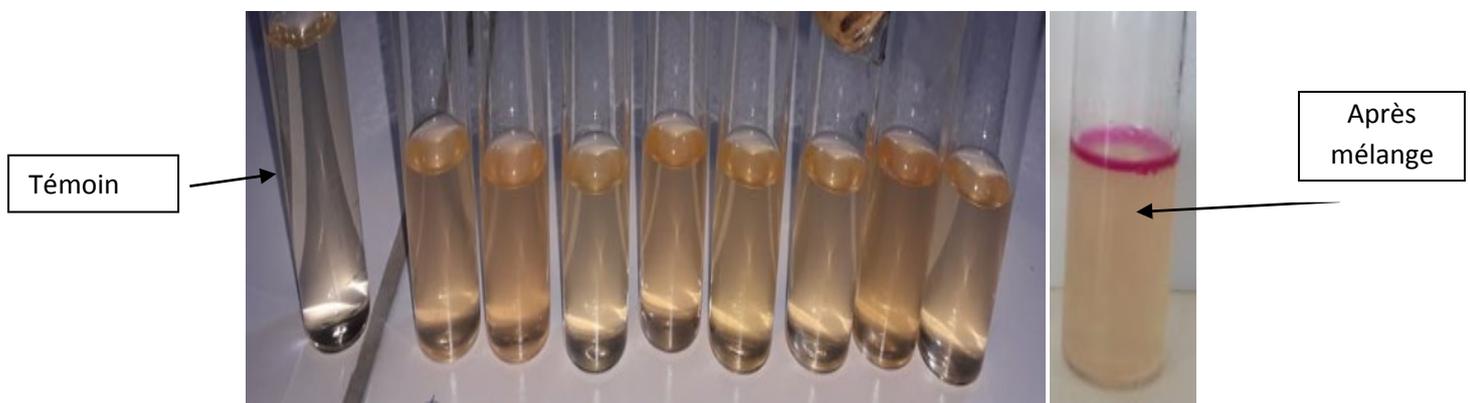
**Figure 14** : Résultat de la production du CO<sub>2</sub>.

• La production d'acétoïne

Chez les bactéries lactiques, la fermentation du glucose conduit à la production :

- soit de nombreux acides par la voie des fermentations acides
- soit d'acétoïne produit par fermentation butanediolique qui est mise en évidence par le test VP (Voges-Proskauer) : La fermentation butanediolique conduit à des quantités moins importantes d'acides organiques, une proportion non négligeable du pyruvate étant transformée en un produit neutre: l'acétoïne, en général réduite en butanediol. La réaction de Voges Proskauer (VP) consiste à mettre en évidence, par une réaction colorée, le butanediol et l'acétoïne.

Elle acidifie moins le milieu que la précédente. Elle produit aussi des gaz ( $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2$ ).

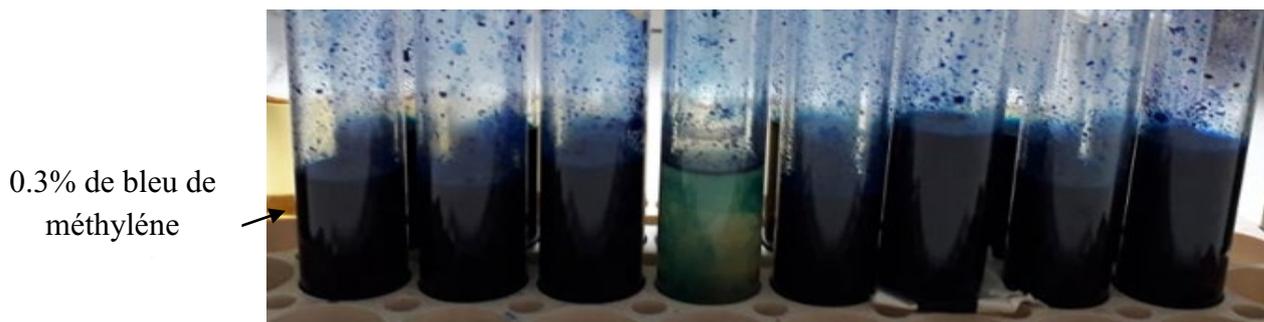


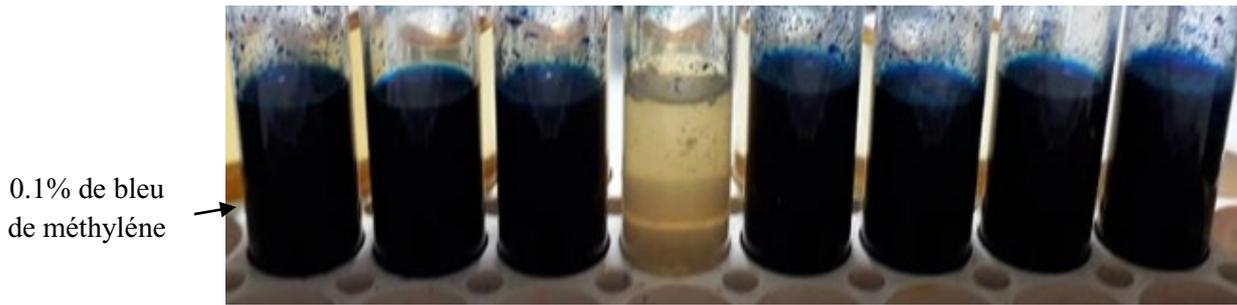
**Figure 14** : Résultat de la production d'acétoïne.

Toutes les souches ont répondu positivement par formé des anneaux rouge sauf la souche (M17 chaire 1) cela se traduit par la fermentation du glucose pour produire de l'acétoïne (figure 14).

- **Test de croissance en présence du bleu de méthylène**

Le bleu de méthylène est un colorant utilisé pour différencier entre les *lactocoques* qui poussent en présence de 0.3% de bleu de méthylène sont des *entérocoques* alors que ceux qui poussent à 0.1% sont des streptocoques sensibles au colorant.





**Figure 16 :** Résultat de la croissance en présence de bleu de méthylène

- La souche (M17 ch2) est streptocoque, elle est sensible au colorant aux différentes concentrations (figure 15).

La mise en évidence de l'arginine décarboxylase par le changement de la couleur jaune vers le violet est due à la formation d'ammoniaque.



**Figure 17:** Résultat de la mise en évidence d'arginine décarboxylase.

Nous avons remarqué que les isolats (M17 chaire 1 et MRS intestin 2) la couleur de ces derniers ne varie pas donc ne possède pas cette enzyme pour les autres souches ont répondu positivement.

• Fermentation des sucres

L'identification des espèces ci-dessus a été effectuée et confirmée par le système du kit API 20A, cette galerie permet de rechercher rapidement et facilement 21 caractères pour l'identification biochimique des bactéries anaérobies.

(a)



(b)



**Figure 18:** Résultats API 20A (a) Galerie témoin (b) Résultats des isolats.

- La Pré- identification des Bac lactiques après les Tests physiologiques et biochimiques montrent qu'elles sont des *Enterococcus* sp sauf la souche (M17 ch2) est *streptocoque* sp.

#### IV.3. la sélection des souches probiotiques

##### a)- la résistance aux conditions de tractus intestinal :

###### ➤ Résistance au pH=3

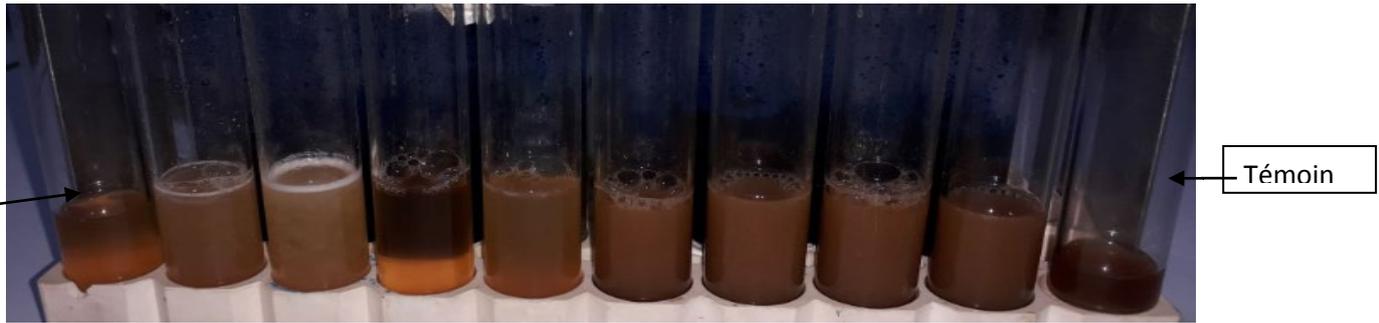
L'étude de la survie des bactéries lactiques dans le tractus gastro-intestinal est importante pour une meilleure connaissance du devenir des bactéries lactiques ingérées avec l'aliment et une meilleure compréhension de l'action des probiotiques chez l'homme et l'animal.

La résistance aux faibles valeurs du pH est l'un des critères de sélection des souches probiotiques (Quwehand et *al.*, 1999 ; Çakir, 2003), car avant d'atteindre le tractus intestinal, les bactéries probiotiques doivent d'abord survivre au transit dans l'estomac où le pH peut être aussi bas que 1,5 à 2 (Dunne et *al.*, 2001). La résistance à pH 3 est souvent utilisée dans des essais *in vitro* pour déterminer la résistance au pH de l'estomac. **Dans notre expérience**, la totalité des souches ont résisté à un pH 3.

###### ➤ Résistance aux sels biliaires

Le taux de sécrétion et la concentration de la bile dans les différentes régions de l'intestin varie principalement en fonction du type d'aliment consommé et il ne sera pas possible de prédire la concentration de bile dans l'intestin à un moment donné. Davenport (1968) rapporte que les concentrations biliaires dans l'intestin, sont entre 0,5 à 2,0% pendant la première heure de la digestion. Les niveaux peuvent diminuer pendant la deuxième heure. Les concentrations biliaires allant de 0% à 1,5% ont été utilisées dans plusieurs milieux microbiologiques pour l'isolement sélectif des bactéries résistantes aux sels biliaires à partir de cultures mixtes.

**Dans notre expérience**, la totalité des souches ont résisté aux sels biliaires à 0.3% et à pH6.7sauf la souche (M17CH1) comme illustré sur la figure18.

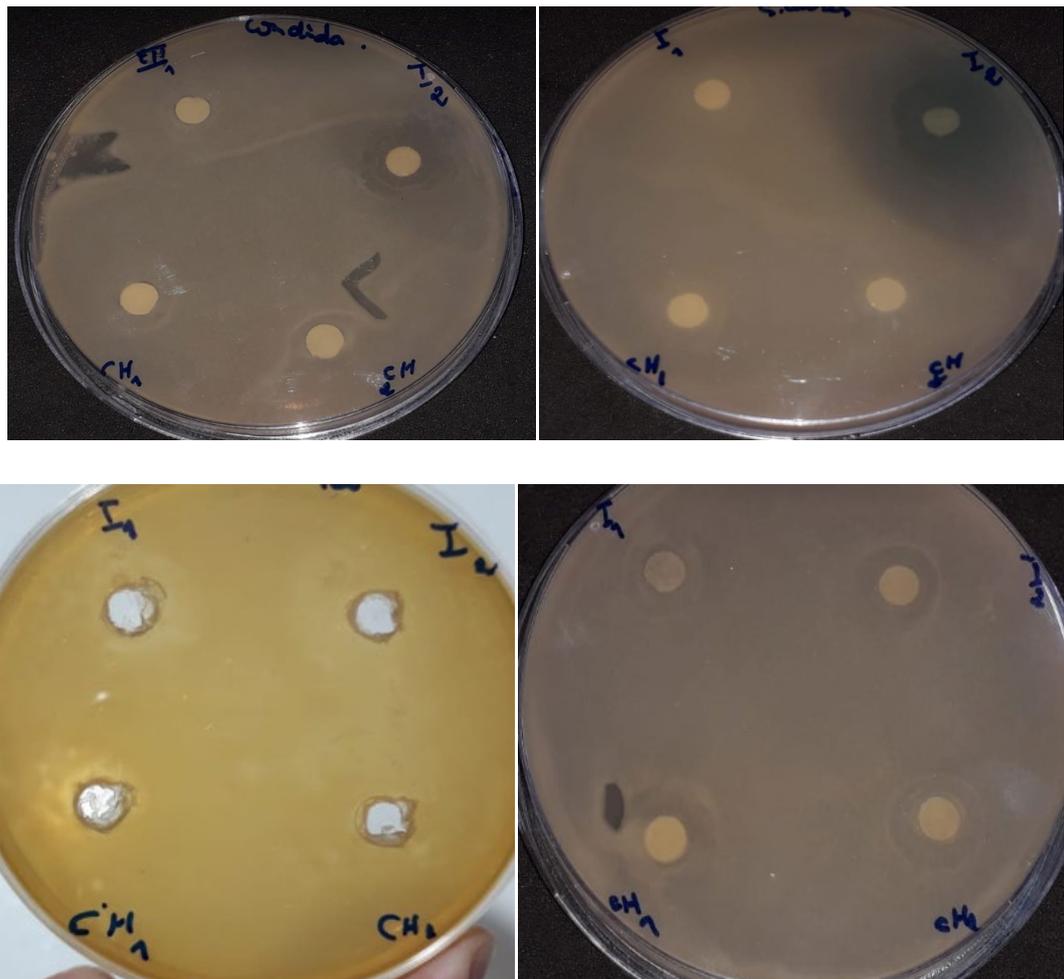


**Figure 19** : Résultat de la résistance aux sels biliaires.

➤ **L'activité antibactérienne**

Dans cette partie, nous nous sommes focalisés sur la mise en évidence de l'activité antagoniste afin de sélectionner les isolats potentiels pour la suite des travaux.

Tous les isolats lactiques ont été testés contre les 05 souches pathogènes *Candida albicans*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.



**Figure 20** : Résultat des zones d'inhibition.

Pour ce qui est des souches (M17 I1 et MRS I1), nous avons remarqué des zones d'inhibitions assez réduites de 10 mm voir même aucune inhibition, ce qui est en accord avec les travaux de Georgieva et al. 2015 dont les diamètres d'inhibitions des Souches vis-à-vis de *S. aureus*, les résultats sont présentés sur le tableau 5.

**Tableau 05 :** Diamètres des zones d'inhibition (mm).

Souches	(M17) Intestin 1	(M17) Intestin 2	(M17) Chaire 1	(M17) Chaire 2	(MRS) Intestin 1	(MRS) Intestin 2	(MRS) Chaire 1	(MRS) Chaire 2
<i>Candida</i>	11	10	12	10	/	2	14	11
<i>S.aureus</i>	10	/	/	/	7	5	/	/
<i>B.cereus</i>	13	2	15	14	15	12	20	16
<i>P. aeruginosa</i>	14	15	17	15	12	2	13	10
<i>E .coli</i>	14	13	15	17	12	12	13	10

➤ **résultats Activité anti bactérienne des surageants bactériens (effet bactériocine)**

Vu que nos souches ont une activité antimicrobienne, on a vérifié le maintien de cette activité par les surnageants bactériens avant et après neutralisation avec le NaOH

**Tableau 06 :** Diamètres des zones d'inhibition (mm) des surnageants avant et après neutralisation.

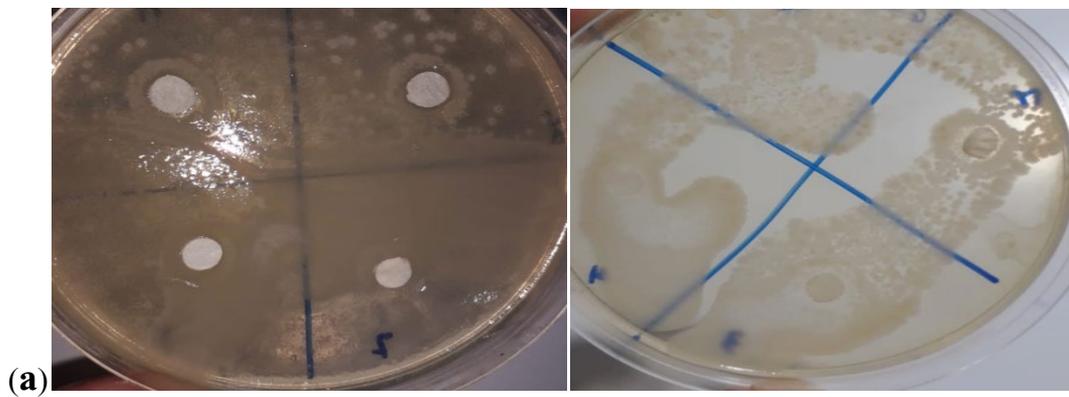
Souche	(M17) Intestin 1	(M17) Intestin 2	(M17) Chaire 1	(M17) Chaire 2	(MRS) Intestin 1	(MRS) Intestin 2	(MRS) Chaire 1	(MRS) Chaire 2
<i>Candida</i>	10	07	10	10	12	2	1	12
<i>S.aureus</i>	10	08	10	19	17	2	15	15
<i>B.cereus</i>	06	12	02	/	12	/	07	/
<i>p.</i>	10	/	/	02	14	15	12	11

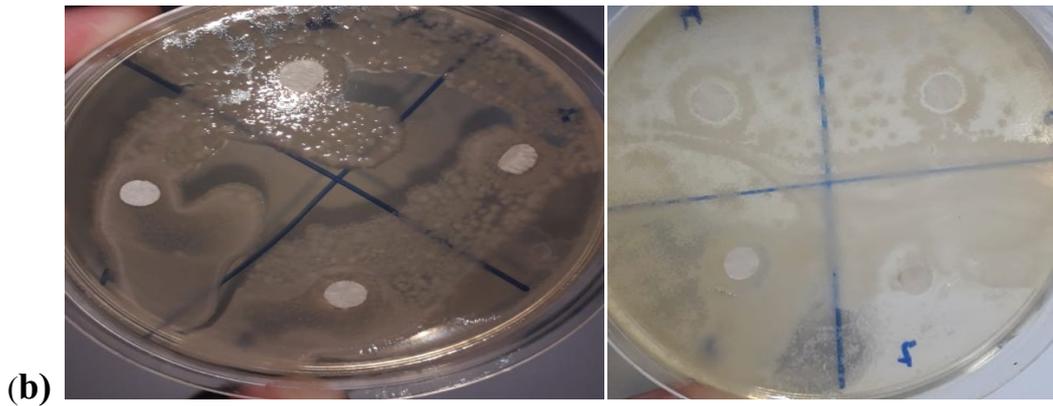
*aerogenosa*

*E. coli* 13 09 / 15 13 10 11 15

**Après neutralisation :**

Souche	(M17) Intestin 1	(M17) Intestin 2	(M17) Chaire 1	(M17) Chaire 2	(MRS) Intestin 1	(MRS) Intestin 2	(MRS) Chaire 1	(MRS) Chaire 2
<i>Candida</i>	12	13	12	10	12	18	18	17
<i>S.aureus</i>	12	/	03	/	11	1	12	11
<i>B.cereus</i>	10	1	12	14	13	/	1	16
<i>P. aerognosa</i>	/	/	/	/	03	/	1	07
<i>E. coli</i>	09	05	/	/	04	06	1	16





**Figure 20** : Résultat des zones d'inhibition des surnageants avant (a) et après(b).

- On a obtenu des résultats importants dont les zones d'inhibitions dépassent les 10 mm (Fig. 20).
- les souches (M17 intestin) et (MRS chaire 1) sont les deux souches avec les taux d'inhibition les plus élevés contrairement aux souches (M17 Chaire 2) et (M17 chaire1).
- toutes les souches ont donnés une très bonne activité antibactérienne contre *B. cereus* et *Candida albicans*. Pour *E. coli*, l'activité antibactérienne était appréciable pour plus la majorité des souches, pour *Pseudomonas* malgré qu'il y avait un effet inhibiteur, mais les zones étaient très réduites et ne dépassaient pas 11mm et pas pour tous les souches (tableau6).

# CONCLUSION

## CONCLUSION

Les bactéries lactiques sont depuis des millénaires un moyen de bio conservation efficace de nombreux produits alimentaires et ce grâce à leur métabolisme. Cependant leur rôles s'est étendu dans d'autres secteurs, tel que le milieu clinique.

Dans le cadre de la préparation de projet de fin d'étude, nous avons travaillé sur une large gamme d'isolats lactiques, obtenus à partir de la chaire et l'intestin du poisson *Engraulis encrasicolus* de la région de Mostaganem.

Dans un premier temps, nous avons commencé par isoler les bactéries lactiques et déterminer les différents aspects des colonies sur les milieux appropriés. Après isolement, les isolats retenus ont été identifiés par des tests phénotypiques et biochimiques.

Dans un deuxième temps, nous avons testé nos isolats lactiques pour leur survie dans les conditions digestives, afin de sélectionner les bactéries lactiques probiotiques.

Au terme de ce travail de recherche, nous pouvons dire que nous possédons une collection d'isolats à large spectre, ayant un effet probiotique. Ceci qui nous donne l'opportunité d'élargir encore plus ce sujet, et noter en tant que perspectives d'étudier d'une manière plus approfondie la confirmation de ces isolats capables d'exercer un effet fonctionnel, combiner deux isolats lactiques performant en culture mixte, optimiser les différents milieux de culture.

## Références Bibliographiques

### (A)

- Abee, T, L Krockel, et C Hill. «Bacteriocins: modes of action and potentials in food.» *Int J Food Microbiol* 28 (1995): 169- 185
- Abriouel H, Franz CM, Ben Omar N, Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35:201–232.
- Anderson R.A., Bryden N.A., Polansky M.M. and Deuster P.A. (1988): Exercise effects on chromium excretion of trained and untrained men consuming a constant diet. *J. Appl. Physiol.* 64:249.
- Andlid T., Vazquez R., Gustafsoon L. (1998): Yeast isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus. *Mol. Mar. Bio. Biotech.* 7: 115-126.
- Austin, B. (2006): The bacterial microflora of fish, revised. *The Scientific World Journal* 6:931-945.
- Axelsson, L. Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects . 3e. Édité par S Salsinen, A.V Wright, & A. Ouwehand. Vol. 633. New York, USA: Marcel Dekker, 2004.

### (B)

- Backhed F., R. Ley E., et al. (2005): "Host-bacterial mutualism in the human intestine." *Science* 307(5717): 1915-20.
- Bairagi A., Sarkar Ghosh K., Sen S.K., Ray A.K., (2004): Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Aquaculture Research* 35, 436–446.
- BASILONE G, GUISANDE C, PATTI B, BONANNO A, CUTTITTA A, VERGARA AR, GARCIA A, MAZZOLA S et BUSCAINO G. (2004). Reproductive aspects of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*): six years of observations in the strait of sicily. *MedSudMed Technical Documents* No.512: 67- 78.

- BEMIASA J. (2009). Dynamique des pêcheries traditionnelles d'anchois, de calmars et de poulpes du Sud-Ouest de Madagascar : utilisation d'outils océanographiques pour la gestion des ressources. Thèse de doctorat. 217p.
- Bhugaloo-Vial, P, et al. «Purification and Amino Acid Sequences of Piscicocins V1a and V1b, Two Class IIa Bacteriocins Secreted by Carnobacterium piscicola V1 That Display Significantly Different Levels of Specific Inhibitory Activity.» *Appl Environ Microbiol* 62 (1996): 4410–4416
- Brock, T.D, et J.M Davie. «Probable identity of a group D hemolysin with a bacteriocine.» *J Bacteriol* 86 (1963): 708-712
- Bruno F.A, Lankaputhra W.E.V and Shah N.P. (2002): Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing prebiotics, *Journal of Food Science*, 67; 2740– 2744

(C)

- Cahill M.M. (1990): Bacterial flora of fishes: A review. *Microbial Ecology* 10:21-41.
- Cai Y., Okada H., Mori H., Benno Y., Nakase T. (1999): *Lactobacillus paralimentarius* sp. nov., isolated from sourdough. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 1451- 1455
- Caplice Elizabeth, Gerald F. Fitzgerald, (1999): Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50 131–149
- Cerning, J. Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques. Édité par H De Roissart, & F.M Luquet. Vol. 1. Lorica-Uriage, 1994.
- Chou L.S., Weimer B., (1999): Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*, *J. Dairy Sci.* 82 23-31.

(D)

- Deegan, L.H, P.D Cotter, et C Hill. «Bacteriocins: biological tolls for biopreservation and shelf-life extension.» *Int Dairy J* 16 (2006): 1058-1071.
- Dellaglio, F, H de Roissart, S Torriani, M.K Curk, et D Janssens. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In Bactéries Lactiques. Édité par H Roissart, & F.M Luquet. Paris: Lavoisier, 1994

- Desmazeaud, M. "Rôles des cultures de microorganismes dans la flaveur et la texture des produits laitiers fermentés." Fédération internationale de Laiterie ; Bruxelles (BEL), and Proceeding of the International Dairy Congress Biotechnology-Milk Products, 1990.
- Dortu, C, and P Thonart. "Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et." *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 13 (2009): 143-154.
- DRAGANIK B et WYSZYNSKI MA. (2004). European anchovy (*Engraulis encrasicolus* [L.]) in the Baltic Sea Bulletin of the sea Fisheries Institute 2 (162) 2004, pp.53-58
- Drider, D and S Rebuffat. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Science+Business Media, 2011.
- Drider, J, et H PREVOST. *Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*. Paris: Economica, 2009.

(E)

- Elo S., Saxelin M., and Salminen S. (1991): Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell: comparison with other dairy strains. *In applied microbiology*, 32.154-156.

(F)

- F., T. Bannerman, and K.-H. Schleider. 2006. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In *Prokaryotes 3rd edition* (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E., Eds): 4 pp 4-75. Springer, New York, NY, USA.
- FAGE L. (1920). *Engraulidae, Clupeidae*. rep. Danish Oceanogr. Exped. 1908-1910 to the Mediterranean and adjacent Seas. 2 (A9): 140 p.
- Fooks L.J and Gibson G.R. (2002): Probiotics as Modulators of the Gut Flora. *British Journal of Nutrition* 88, 1; S39-S49.
- FRITSCH M. (2005). *Traits Biologiques et Exploitation du Bar commun Dicentrarchus labrax (L.) dans les Pêcheries Françaises de la Manche et du Golfe de Gascogne*. Thèse Doctorat. Université de Bretagne Occidentale. P: 7-
- Fuiman L. A., Poling K. R., and Higgs D.M. (1998): Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes. *Copeia* 1998:602-611.

(G)

- Gilarová, R, M Voldrich, K Demnerová, M Cerovský, et J Dobiás. «Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria.»

- Gill, 2003; Servin et Coconnier, 2003; Servin, 2004; Picard et *al.*, 2005). Gill , O, A Etzion, et M.A Riley. «The dual role of bacteriocins as anti and probiotics.» *Appl Microbiol Biotechnol* 81 (2008): 591-606.
- Gratia, A. «Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille.» *C. R. Soc Biol* 93 (1925): 1040– 1041.

**(H)**

- Hansen G. H., and Olafsen J. A. (1999): Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology* 38:1-26.
- Hirsch, A, E Grinsted, H.R Chapman, et A.T.R Mattick. «A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*.» *J Dairy Sci* 18 (1951): 205–206.
- Holzapfel W,H,Haberer P, Geisen R,Bjorkroth J,and schillinger U,2001,Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition.*Am J clin Nutr*, 73:3655- 735
- Hopp U., Baltensweiler J. (2009).*Mycoses-Mycoses cutanées-Candidoses-Moniliases ou Monilioses,causes et facteurs de risque.France*
- Hudault S., Liévin V., Bernet-Camard M.F., Servin A.L. (1997): Antagonistic activity in vitro and in vivo exerted by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* infection. *Appl Environ Microbiol*, 63: 513-518.

**(I)**

- Ishibashi N., Shimamura S. (1993): Bifidobacteria: Research and development in Japan. *Food Technol* . 47 :126-135.
- Jozala AF, de lencastre Novaes LC,c holewo O, Moras D,et penna TCV.2005,Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media.*Afr J Biotechnol*,4:3:262-265.

**(K)**

- Kandler O., Weiss N. (1986b): Genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, 212A1. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, 1209-1234, Williams, Wilkins, Baltimore
- Kawano Y., Nagawa Y., Nakanishi H., Nakajima H., Matsuo M., Higashihara T. (1997): Production of thiotropocin by a marine bacterium, *Caulobacter sp.* and its antimicrobial activities. *Journal of Marine Biotechnology* 5, 225–229.

- Klaenhammer, T.R, and M.J Kullen. "Selection and design of probiotics." *Int J Food Microbiol* 50 (1999): 45-57.
- Klaenhammer, T.R, R Barrangou, B Logan Buck, and M.A Azcarate-Peril. "Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health." *FEMS Microbiol. Rev* 29 (2005): 393-409.
- Klaenhammer, T.R. "Bacteriocins of lactic acid bacteria." *Biochimie* 70 (1988): 337-349.
- Klaenhammer, T.R. "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." *FEMS Microbiol Rev* 2 (1993): 39-85.
- Klaenhammer, T.R. «Bacteriocins of lactic acid bacteria.» *Biochimie* 70 (1988): 337-349. Klaenhammer, T.R. «Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.» *FEMS Microbiol Rev* 2 (1993): 39-85.
- Klein G. Pack A., Bonaparte C., and Reuter G. (1998): Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Intl. J. Food. Microbiol.* 41: 103-125.
- Kotelnikava EA, et Gelfand MS. 2002, Bacteriocin production by Gram positif bacteria and the Mechanisms of Transcriptional Regulation, *Russian J, Genetics*, 38(6):628-641, translated from *genetika*, 38(6):758-772.

#### (L)

- Lechardeur, D, et al. «Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria.» *Curr Opin Biotechnol* 22 (2011): 143-9
- Leveau J-Y., Brielle, De Roissart H., 1991. la flore lactique IN *Technique d'analyse et de control dans les industries agroalimentaire*. Bourgeois C.M., leveau J-Y .Tec et DOC ,lavoisier, pp :152-186.
- Liu, S. «practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations.» *Int J Food Microbiol* 83 (2003): 115-131

#### (M)

- M. (2002): Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.* 12 :173-182.
- MacFaddin JF (2000) *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

- Madec F. Epidémiologie des problèmes urinaires chez la truie en élevage intensif. *Bulletin des GTV*, 1990, 2 : 39-45
- Mattila-Sandholm T., Matto J., and Saarela M. (1999): Lactic acid bacteria with health claims– interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal* 9:25-35.
- Mattila-Sandholm T., Myllarinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fonden R., Saarela
- Microbiologie alimentaire De Christiane Joffin, Jean-Noël Joffin

(N)

- Naderi A, Kasra-Kermanshahi R, Gharavi S, Imani Fooladi AA, Abdollahpour Alitappeh M, Saffarian P (2014) Study of antagonistic effects of Lactobacillus strains as probiotics on multi drug resistant (MDR) bacteria isolated from urinary tract infections (UTIs). *Iran J Basic Med Sci.* 17: 201-208.).
- Naviner M., Bergé J.P., Durand P. and Le Bris H. (1999): Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture* 174, 15- 24.
- Nicholls, D.J, and S.J Ferguson. Bioenergetics: Chemiostatic energy transduction. 2. Edited by D.G Nicholls, & S.J Ferguson. London: Académie Press, 1992.

(O)

- Ouwehand A.C., Kirjavainen P.V., Shortt C., Salminen S. (1999): Probiotics: Mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 9:43-52.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. (2002): Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*; 82: 279-289.

(P)

- PANNELLA G. (1971). Fish otoliths, growth layers and periodical patterns. *Science.* 173: 1124-1127.

(R)

- Ringø E, Gatesoupe FJ. (1998): Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160: 177- 203.
- Ringø E, Sperstad S, Myklebust R, Mayhew TM, Olsen RE. (2006a): The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquacul Res* 37: 891-897.

(S)

- Salminen et al., 1998). Salminen, S, A.V WRIGHT, and A OUWEHAND. Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects. Edited by Marcel Dekker. 2004.

#### SCÉRÉN-CRDP Aquitaine

- Servin A. (2004): Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 405–440
- Skjermo J., Salvesen I., Oie G., Olsen Y., and Vadstein O. (1997): Microbially matured water: A technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae. *Aquaculture International* 5:13-28.
- Stiles & Holzapfel, 1997) Stiles, M.E, and W.H Holzapfel. "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." *Int J Food Microbiol* 36 (1997): 1–29.
- Stiles, M.E. "Biopreservation by lactic acid bacteria." *Antonie van Leeuw* 70 (1996): 331-340.

#### (T)

- Tamime A. Y., Marshall, V. M. E., Robinson A. R. K. (1995): Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Research*, 62, 151–187.
- Tanous, C, A Gori, L Rijnen, E Chambellon, and M Yvon. "Pathways for  $\pm$ -ketoglutarate formation in *Lactococcus lactis* and their role in amino acid catabolism." *Int. Dairy J* 15 (2005): 759-770.
- Tanous, C, E Chambellon, D Le Bars, G Delespaul, and M Yvon. "Glutamate dehydrogenase activity can be transmitted naturally to *Lactococcus lactis* strains to stimulate amino acid conversion to aroma compounds." *Appl Environ Microbiol* 72 (2006): 1402–1409.
- Thompson , J, and C.R Gentry-Weeks. *Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques*. Dans : *Bactéries lactiques*. Edited by H De Roissart , & F.M Luquet. Vol. I. Loriga, 1994.
- TURAN M, ATAUGLU N et SAHIN F. (2006). Evaluation of the capacity of phosphate solubilizing bacteria and fungi on different forms of phosphorus in liquid culture. *J. Sust. Agric.* 28, 99–108.

#### (V)

- Vandamme, P, B Pot, M Gillis, P de Vos, K Kersters, and J Swings. "Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics." *Microbiol Rev* 60 (1996): 407-438.
- Vescovo et al., 1996). Vescovo, M, S Torriani, C Orsi, F Macchiarolo, and G Scolari. "Application of antimicrobialproducing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables." *Journal of Applied Bacteriology* 81 ( 1996): 113–119
- Vijaya Swetha V, Sreenivasa Rao U, Hema Prakash P and Subbarayudu S (2014) Aerobic bacteriological profile of urinary tract infections in a tertiary care hospital. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 3(3): 120-125
- Vos et al., 2009 Vos, P, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2e. Vol. 3. New York, NY: Springer-Verlag, 2009.

# Annexe

## ANNEXES

### Milieu d'isolement :

☞ **Milieu MRS** (De Man Rogosa et Sharp, 1960)

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone .....10,00 g
- Extrait de viande..... 10,00 g
- Extrait de levure .....5,00 g
- Glucose ..... 20,00 g
- Phosphat dipotassique .....2,00 g
- Acétate de sodium .....5,00 g
- Citrate d'ammonium .....2,00 g
- Sulfate de magnésium .....0,20 g
- Sulfate de manganèse .....0,05 g
- Agar bacteriologique .....15,00g
- Eau distillée .....1000 ml

pH = 6,8 ± 0,1    Autoclave 120° pendant 20 min

☞ **MRS liquide** tout les ingrédients du **MRS solide** mais sans Agar

☞ **Milieu M17** (Terzaghi et Sandine, 1975) Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone .....2,50 g
- Peptone pepsique de viande .....2,50 g
- Peptone papainique de soja .....5,00 g
- Extrait de levure..... 2,50 g
- Extrait de viande .....5,00 g
- Lactose .....5,00 g
- Glycérophosphate de sodium .....19,00 g
- Sulfate de magnésium .....0,25 g
- Acide ascorbique .....0,50 g
- Agar bacteriologique .....15,00g
- Eau distillée .....1000 ml

pH = 7,1 ± 0,2      Autoclave 120° pendant 20 min

☞ **M17 liquide** tout les ingrédients du **M17 solide** mais sans Agar

**Milieus d'identification :**

☞ **Milieus Moller :**

- Peptone pepsique .....5g
- BCP(pourpredeBromocrésol).....0,01g
- Extrait de viande .....5g
- Rouge de crésol .....0,005g
- Glucose.....0,5g
- Pyridoxal.....0,005g
- Arginine.....10g
- Eau distillée.....1l

PH= 6.4

☞ **Clark et Lubs :**

- Peptone.....5g
- Phosphate dipotassique.....5g
- Glucose.....5g
- Eau distillée.....950ml

Ph=7,4. Autoclavage 120°C pendant 20min

☞ **lait écrémé :**

- lait écrémé en poudre .....10g
- Extrait de levure ..... 0,5g
- Eau distillée .....1l

Autoclavage 110°C pendant 10min

☞ **Bouillon hypersalé :**

- Extrait de viande ..... 5g
- Glucose ..... 5g
- Peptone ..... 15g

- NaCl .....2,5/4,0/6,5g
- Eau distillée .....1l

Ph=7,2. Autoclavage 120°C pendant 20 min

☞ **Milieu Muller –Hinton (Muller et Hinton, 1941):**

- Infusion de viande de boeuf.....3000ml
- Peptone de caséine.....17,5g
- Amidon de maïs.....1,5g
- Agar-agar.....17g
- Eau distillée .....1l

pH=7,4. Autoclavage: 120°C pendant 20minutes.

☞ **Eau physiologique peptonée :**

- Chlorure de sodium .....8,5g
- Peptone.....0,5g
- Eau distillée .....950ml

pH=7. Autoclavage 120°C pendant 20min

☞ **Gélose blanche:**

- Agar\_agar..... 16g
- Eau\_distillée.....1l

Autoclavage 120°C pendant 20min

☞ **bouillon nutritive:**

- Extrait de viande.....1g
- Extrait de levure.....2g
- Peptone.....5g
- Chlorure de soduim.....5g
- Eau distillée .....1000ml

pH=7,4. Autoclavage 120°C pendant 20min

☞ **Le lait de SHERMAN (Bourgeois et Leveau, 1991):**

- lait écrémé en poudre .....10g
- Extrait de levure.....0,5 g
- Eau distillée ..... 1000 ml

pH=6,8

Pour obtenir un lait à 0,1% de bleu de méthylène, on ajoute au moment de l'emploi 1ml de bleu de méthylène à 1% déjà stérilisé à 120°C pendant 20min. Et pour avoir un lait à 0,3% de bleu de méthylène, on ajoute au moment de l'emploi 1ml de bleu de méthylène à 3%.

☞ **Milieu hypersaccharosé :**

- Extrait de viande.....10g
- Extrait de levure..... 3g
- Peptone.....2.5g
- Saccharose .....150g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 2g
- Nacl..... 1g
- MgSo<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O .....0.2g
- Agar.....15g
- Eau distillée..... 1000 ml
- PH= 6.6

Autoclavage 120°C/ 20 minutes