

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 DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

N°...../SNV/2021

Présenté par

Belabdoune lachen

Rouabhi abdelouahab

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité: NUTRITION ET PATHOLOGIE

THÈME

Exploration de l'effet antimicrobien des souches lactiques

Déposé le 04 / 07./2021

DEVANT LE JURY

Présidente: Mme. *BOUKAZZOULA NAWEL*

MCB U. Mostaganem

Directrice : Mme. *KOUADRI BOUDJELTHIA NACIMA*

MAA U. Mostaganem

Examinatrice: Mme. *YAHLA IMEN*

MCB U. Mostaganem

*Thème réalisé à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem au laboratoire LMBAFS
Année universitaire:2020/2021*

Remerciements

*Nous remercions Dieu, le tous puissant de nous avoir accordé
santé et courage pour accomplir ce modeste travail*

*

*Nous tenons à présenter nos sincères
remerciements à notre encadreur*

M^{me} KOUADRI BOUDJELTHIA NACIMA

***Merci pour votre disponibilité, et vos
conseils***

*

Nos remerciements s'adressent aussi aux membres du jury:

Mme. YAHLA IMEN et Mme. BOUKAZZOULA NAWEL.

Merci d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail de fin d'étude

Dédicace

Je tiens à dédier ce travail à:

*Mes très chères parents qui m'ont soutenue toute au long de
mon cursus*

Que dieu prolonge leurs vies

Abdelouahab

Je dédie ce mémoire:

Ames chers parents;

A toute ma famille;

A mes amis(es);

Lahcen

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Patrie I: Rappels bibliographiques

I. Les bactéries lactiques 3

1. Généralités..... 3

2. Fermentation des bactéries lactiques.....3

2.1. Fermentation homolactique.....3

2.2. Fermentation hétéro-lactique.4

3. Habitat des bactéries lactiques4

4. Classification.....4

5. Les principaux genres des bactéries lactiques.....5

6. Activités antimicrobiennes des bactéries lactiques8

6.1. Acides organiques 8

6.2. Peroxyde d'hydrogène(H₂O₂) 8

6.3.Le dioxyde de carbone (CO₂)..... 9

6.4.Bactériocines 9

II. Les bactéries pathogènes 9

1. Escherichia coli.....9

1.1.Caractéristiques générales 9

1.2 Taxonomie..... 10

2. <i>Staphylococcus</i>	10
2.1.Caractéristiques générales.....	10
2.2.Taxonomie.....	11
3. <i>klebsiella</i>	11
3.1. Caractéristique générales.....	11
3.2. Taxonomie.....	11
4. <i>Salmonelle</i>	12
4.1. Caractéristiques générales.....	12
4.2. classification.....	12
5. <i>pseudomonas</i>	13
5.1. Caractéristiques générales.....	13
5.2. Taxonomie.....	13
6. <i>Candida</i>	14
6.1. Caractéristiques générales.....	14
6.2. Taxonomie.....	15

Partie II

Matériel et méthodes

1. Origine des souches.....	17
1.1. Les bactéries lactiques.....	17
2. Les bactéries pathogènes.....	17
3. Revivification et vérification de la pureté des souches bactériennes.....	18
2.2. Revivification des bactéries lactiques.....	18
2.3. Revivification de la pureté de souche utilisée.....	18

2.3.1. Observation microscopique.....	18
2.3.2. La coloration de Gram.....	18
2.3.3. Test de catalase.....	19
4. Étude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques.....	19
4.1. Méthodes directe (Test des spots).....	19
4.2. Méthode indirecte (Test des puits)	21
3.2.1. Cas du surnageant natif	22
3.2.2. Cas du surnageant neutralisé	22
3.2.3. Cas du surnageant+ enzyme.....	22

Partie III: Résultats et discussion

1. Les souches lactiques.	24
1.1 Aspect macroscopique	24
1.2 Aspect microscopique	24
2.1. Méthode directe (Test des spots).....	25
2.2.Méthode indirecte (Test des puits).....	28
2.2.1. Cas du surnageant natif	28
2.2.2. Cas du surnageant neutralisé	29
2.2.3. Cas du surnageant+ enzyme.....	30
Conclusion.....	32

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

E .coli: *Escherichia coli*

G⁺: GRAM positif

h, min, s: heure, minute, seconde

Lb: *Lactobacilles*

µl: microlitre

ml : millilitre

mm: millimètre

MRS: Man, Rogosa et Sharpe

Ppm : partie pour million

pH: Potentiel d'hydrogène

rpm: rotation par minute

ATTC : American type culture collection

t : tours

T:temps

UFC: unité formant colonie

Liste des figures

N°	Titre	page
01	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr16S	05
02	Schéma illustrant les étapes du test d'antagonisme bactérien par la méthode des spots	20
03	Schéma illustrant les étapes du test d'antagonisme bactérien par la méthode des puits	21
04	Aspect des bactéries lactiques sur milieu MRS (;a: Sur bouillon MRS Ꞥ:Sur gélose MRS)	24
05	Observation de la souche LB5 sous microscope optique (Gx100)	25
06	Diagramme d'antagonisme Bactérien des souches lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes par la méthode des spots	26
07	Antagonisme bactérien vis à vis de <i>klebsiella</i>	27
08	Diagramme des zones d'inhibitions obtenues par les surnageant natifs des souches lactiques	28
09	Diagramme d'antagonisme bactérien des surnageant neutralisés vis-à-vis des bactéries pathogènes.	30
10	Diagramme d'antagonisme bactérien des surnageant+pepsine vis-à-vis des bactéries pathogènes	31

Liste des tableaux

N°	Titre	page
Tableau 01	Les différentes souches des bactéries utilisées (lactiques, pathogènes).	17
Tableau 02	Résultats de l'observation microscopique des souches lactiques utilisées.	24

المخلص

تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا لست سلالات من بكتيريا حمض اللاكتيك (LB1 ، LB2 ، LB3 ، LB4 ، LB5 و BB12) ضد السلالات المسببة للأمراض ، *staphylococcus* ، *E.coli* ، *pseudomonas* ، *klebsiella* ، *salmonelle et candida* لتحديد التأثير المثبط لسلالات حمض اللاكتيك ، التأثير المضاد للميكروبات يتم تمييزه باستخدام الطريقة المباشرة على وسط بكتيريا اللاكتيك يتم من خلال اتصال على جزء الخلية مع السلالات الممرضة بتقنية البقعة من أجل تحديد طبيعة المواد المثبطة ، والطريقة غير المباشرة باختبار انتشار خارج الخلية (طاف أصلي ، معادل ومعالج مع البييسين) ، على التوالي ، على سلالات حمض اللاكتيك بتقنية الانتشار من أجل تحديد طبيعة المادة المثبطة. أظهرت النتائج أن معظم السلالات لها تأثير مثبط ضد جميع مسببات الأمراض وتم الحصول على أفضل المناطق المثبطة بواسطة السلالات (LB2 ، LB4 ، BB12) بقطر (12 مم). يرجع هذا التأثير إلى المستقلبات المختلفة مثل حمض اللاكتيك أو H₂O₂ أو Di acétyl أو المواد البروتينية التي قد تكون مسؤولة عن هذا التأثير المثبط.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك ، البكتيريا المسببة للأمراض ، العداء البكتيري ، مادة مضادة للبكتيريا

Résumé

Dans cette étude six souches lactiques (LB1; LB2; LB3; LB4; LB5 et BB12) ont été testées pour leurs antagonismes bactériens vis -à-vis de six différentes bactéries pathogènes à savoir: (*staphylococcus*, *E.coli* , *pseudomonas* , *klebsiella* , *salmonelle et candida*) L'effet antimicrobien est mis en évidence par la méthode directe dont chaque culture lactique est mise en contacte directe (fraction cellulaire) avec le pathogène par la technique des spots. Afin de déterminer la nature des substances inhibitrices, la méthode indirecte permet de tester seulement la fraction extracellulaire (surnageant natif ; surnageant neutralisé et surnageant traité par la pepsine) des différentes souches lactiques par la technique de diffusion en puits. Toutes les souches lactiques ont exprimé un effet inhibiteur plus ou moins important à l'égard de ces pathogènes avec des zones d'inhibition variables selon la souche considéré. Les meilleures zones d'inhibition sont obtenues par les souches (LB2, LB4 et BB12) avec un diamètre de (12mm). Les résultats révèlent la présence de différents métabolites comme l'acide lactique, H₂O₂, Diacétyl ou des substances protéiques qui seraient responsables de cet effet inhibiteur.

Mots clés : Bactéries lactiques, Bactéries pathogènes, Antagonisme bactérien, substance antibactérienne.

Abstract

The antibacterial activity of six strains of lactic acid bacteria (LB1; LB2; LB3; LB4; LB5 and BB12) is tested against pathogenic strains. To determine the inhibitory effect of lactic acid strains, direct methods such as the agar spot test, and the indirect method by the agar well diffusion test were used for the cell fraction (bacterial culture) and the extracellular fraction (native supernatant, neutralized and treated with pepsin), respectively, in order to determine the nature of the inhibitory substance. The results showed that most strains have an inhibitory effect against all pathogens and the best inhibitory zones were obtained by the strains (LB2, Lb4 et BB12) with a diameter of (12mm) . This effect is due to different metabolites such as lactic acid, H₂O₂, Diacétyl or proteins substances which would be responsible for this inhibitory effect.

Key words: Lactic acid bacteria, pathogenic bacteria, Bacterial antagonism, antibacterial substance

Introduction

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles sont présentes naturellement dans de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (**Stiles et al., 1997**).

Elles interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires, en contribuant à la texture, à la saveur des aliments, à la production de composés aromatiques (**Tabak et Bensoltan, 2011**) et en assurant une bonne sécurité alimentaire. Elles inhibent le développement de certains micro-organismes pathogènes grâce à la synthèse de molécules antibactériennes telles que des acides organiques, notamment l'acide lactique, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines (**Jasniwski, 2008**) ou par la compétition nutritionnelle (**Leonard, 2013**).

L'objectif de ce travail consiste à mettre en évidence l'antagonisme bactérien des bactéries lactiques envers une panoplie de microorganismes pathogènes à savoir (*Staphylococcus ATCC25923*, *Escherichiacoli ATCC25922*, *salmonelle ATCC700623*, *pseudomonas ATCC27858*, *klebsiella ATCC700603* et *candida ATCC10231*). Le manuscrit est conçu de trois parties dont la première est consacrée à des rappels bibliographiques sur les bactéries lactiques et leurs propriétés antimicrobiennes, plus un aperçu sur les pathogènes utilisés. La Deuxième partie concerne la partie expérimentale où sont détaillés les différents tests réalisés. Enfin, dans la troisième partie, les résultats obtenus sont illustrés et discutés.

PARTIE I:
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Les bactéries lactiques

1. Généralités

Les bactéries lactiques sont des cocci ou des bâtonnets qui sont, en générale, aérotoléra-nets (**Larpent, 1989**). Cependant certaines espèces habitant, par exemple le tube digestif des animaux, sont anaérobies strictes, même en présence d'O₂. Elles sont incapables de réaliser la phosphorylation oxydative. Elles sont Gram positif, généralement, immobile set sporulées. Ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni Cytochrome oxydase, ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole et d'hydrogène sulfureux (**Delaglio et al., 1994**).

Ces bactéries sont des micro-organismes bénéfiques à l'Homme. Elles lui permettent de fabriquer et de conserver un nombre important d'aliment. Elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés et elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons (**Eufic, 1999**).

2. Fermentation des bactéries lactiques :

2.1. Fermentation homolactique:

Toutes les bactéries lactiques appartenant à ce type de fermentation entravent la voie de la glycolyse pour dégrader les hexoses (ex : glucose). La fructose-1,6-bis phosphate aldol ase, est une enzyme clé présente chez toutes les espèces homo-fermentaires et indispensable au fonctionnement de la voie homo-fermentaire. Après son transfert vers la cellule, le glucose subit une phosphorylation pour se transformer en fructose qui est à son tour phosphorylé en fructose 1-6 bi phosphate puis clivé en dihydroxy-acétone phosphate et glycéraldéhyde phosphate. Ces deux derniers sont convertis en pyruvate. Le pyruvate est dans une dernière étape réduit en acide lactique qui est le produit unique: c'est la fermentation homolactique (**Mozzi et al., 2010**). Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (**Thompson et Gentry-Weeks, 1994**). Dans les conditions défavorables telles la limitation du glucose, ces bactéries produisent également l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol et/ou le CO₂ par la voie de fermentation des acides mixtes (**Mozzi et al., 2010**).

2.2. Fermentation hétéro-lactique:

Les principaux genres de bactéries lactiques présentant ce type de métabolisme sont les leuco nostocs et certains lactobacilles. Dans ces conditions, le glucose est accumulé par l'intermédiaire d'un transport actif puis subit une phosphorylation intracellulaire par le biais d'une glucokinase ATP-dépendante. Le glucose-6-phosphate emprunte ensuite la partie oxydative de la voie des pentoses-phosphate qui conduit à la formation de xylulose-5-phosphate. Le xylulose -5-phosphate est scindé en acétyl-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate par la D-xylulose-5-phosphate phosphocétolase, enzyme spécifique à la voie hétéro-fermentaire. Enfin, l'acétyl-phosphate est converti en éthanol ou en acétate, et le GAP qui rejoint la glycolyse est métabolisé en acide lactique. Le métabolisme hétéro-fermentaire est deux fois moins énergétique que le métabolisme homo-fermentaire puisqu'une mole de glucose conduit à la production d'une mole de lactate, d'éthanol, de CO₂ et d'un seul ATP (**Raynaud, 2006**).

3. Habitat des bactéries lactiques

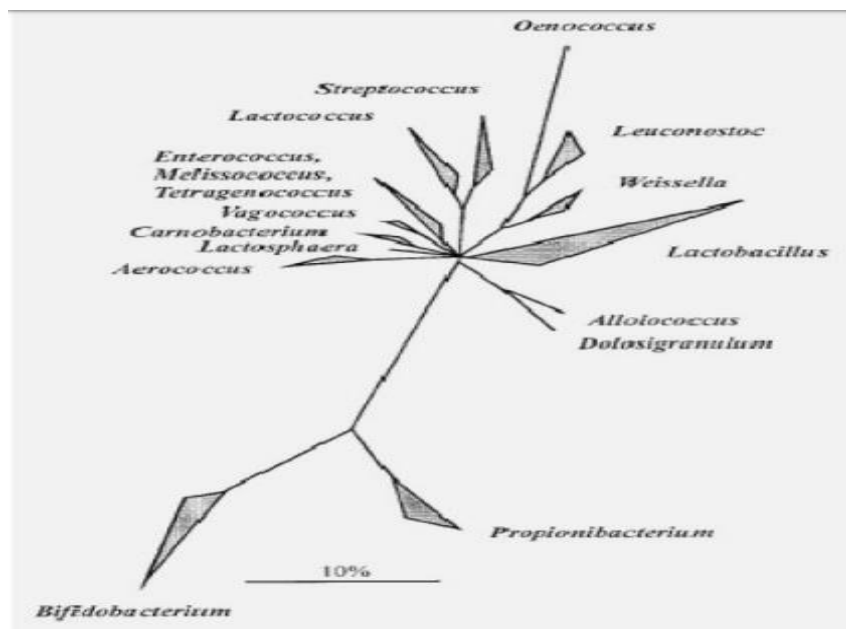
Les bactéries lactiques sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'Homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (**Klein et al., 1998**). Elles sont ubiquistes et se trouvent dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses Humaines et animales et dans le tractus digestif (**Douault et Corthier, 2000**). Elles ont été, également, retrouvées dans le sol, les engrais, et les eaux d'égouts (**Holzappel et al., 1996. Cité par Givry, 2006**).

4. Classification des bactéries lactiques:

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique et biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à fermenter les sucres (**Mofredj et al., 2007**).

Partie I: Rappels bibliographiques

La composition en GC de l'ADN et la composition en acides gras, sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho et al., 2007). La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classer les genres des bactéries lactiques. De ce fait, elles peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques. Le genre *Weissella*, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins et al., 1993 ; Ho et al., 2007). Selon la dernière édition du «Bergey's manual of systematic bacteriology» (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 sur six familles (Bergey's, 2009) ; (figure1).



, **Figure1:**Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr16S (Stiles et Holzopfel, 1997)

5. les principaux genres des bactéries lactiques

La classification actuelle des bactéries lactiques fait apparaître douze genres qui incluent *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Stiles et Holzopfel, 1997).

5.1. Le Genre *Lactobacillus sp*:

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal de la famille des Lactobacillaceae. Les *lactobacilles* représentent un genre important des bactéries lactiques tant au niveau industriel qu'au niveau de la flore commensale infantile. L'hétérogénéité des espèces est illustrée par le contenu en G + C qui peut varier de 32 à 53 % (**Schleifer et Stackebrandt, 1983 ; Pilet et al., 2005**).

5.2. Le genre *Lactococcus sp* :

Le genre *Lactococcus* est formé de bactéries à Gram positif dont les cellules, en forme de coques, sont associées par paires ou en chaînettes de longueur variable. Elles sont dépourvues de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence (anaérobies aérotolérantes). Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6.5% de NaCl ou à pH 9.6. Leur température optimale de croissance s'étend de 25 à 35°C, respectivement pour les souches de *Lc. crémoirs* et *Lc. lactés*. Les *Lactococcus* sont capables de croître à 10°C mais pas à une température supérieure à 40°C (**Dellaglio et al., 1994**).

5.3. Le genre *Pediococcus sp*:

Rassemble des coques homo fermentaires dont la particularité qui les différencie des autres genres est le regroupement en paires ou en tétrades. Le genre *Pediococcus* est mésophile. Leur exigence nutritionnelle, leur faible activité protéolytique et le plus souvent leur incapacité à utiliser le lactose, ne leur permettent pas d'acidifier et de coaguler le lait. Leur fermentation homolactique donne parfois de l'acide lactique racémique (acide D. L.-lactique) mais, fréquemment la forme lévogyre L prédomine: les espèces osmophiles non acidophiles ne donnent que cette forme. Ce genre est parfois utilisé comme levain lactique pour les charcuteries (**Guiraud, 1998**).

5.4. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et *Fructobacillus*:

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînettes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétéro fermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol ou d'acétate. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrine, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et températures, l'assimilation de citrate et/ou malte permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al., 1998 ; Ho et al., 2007).

5.5. Les *bifidobactérium*:

Les bifidobactéries forment le plus important groupe de bactéries intestinales pour la santé de l'homme. Leur découverte remonte au début du siècle lorsqu'Henri Tissier les a isolées de selles d'enfant nourris au lait maternel (Tissier, 1900).

Elles s'installent dans un court temps après la naissance et devient le groupe dominant des bactéries (92%) de la microflore de nouveau-né allaité au sein. Les bifido-bactéries sont des bâtonnets à aspect variable, cellules courtes, coccoidales, ramifiées, bifurquées, spatulées, isolés ou en chaîne, disposé en palissades. Leur nom provient de leur forme en Y ou V que les cellules présentent dans certaines conditions de culture. Ces bactéries sont anaérobies, Gram positives, a sporulées immobiles. Les bifidobactéries métabolisent les carbohydrates en utilisant une enzyme appelée fructose 6 phosphate phosphokétolase retrouvée uniquement chez ce genre bactérien (Hero et al., 2004).

6. Antagonisme bactérien des bactéries lactiques

L'antagonisme bactérien chez les bactéries lactiques est attribué à la production d'un ensemble de métabolites possédant des propriétés antimicrobiennes. Ces métabolites sont des acides organiques (principalement l'acide lactique), le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle (2,3-butanedione) et les bactériocines (**Ammor et al., 2006 ; Dalié et al., 2010**).

6.1. Les Acides organiques

Parmi les acides organiques produits par les bactéries lactiques l'acide lactique est le métabolite principal. Il cause la réduction du pH, ce qui inhibe la croissance de certaines bactéries entre autres les bactéries indésirables (**Eklund, 1989 ; Schnurer et Magnusson, 2001**). Les bactéries lactiques hétéro-fermentaires produisent en plus, de l'acide acétique qui possède un plus haut PKa que l'acide lactique, et ont donc une proportion plus élevée d'acide non dissocié au même pH par rapport à l'acide lactique (**Eklund, 1989**).

En général, c'est la forme moléculaire non dissociée des acides qui a un effet toxique sur les bactéries, d'où l'acide acétique est plus toxique que l'acide lactique. La forme associée de ces acides traversent passivement la membrane cytoplasmique et, pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel, que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire est annulé (**Ammor et al., 2007**). L'acidification interne peut aussi réduire l'activité des enzymes sensibles au pH acide, endommager les protéines et l'ADN. Enfin, l'accumulation dans le cytoplasme des dérivés anioniques des acides organiques dissociés, peut avoir un effet néfaste sur la physiologie cellulaire (**Van de Guchte et al., 2002; Dalié et al., 2010 ; Reis et al., 2012**).

6.2. Peroxyde d'hydrogène(H₂O₂)

Le H₂O₂ présente un effet antimicrobien qui peut être expliqué par la production de radicaux libres tels que le groupement su peroxyde (O₂⁻) et le groupement hydroxyle (OH⁻) capables d'endommager l'ADN bactérien. En outre, le pouvoir inhibiteur du H₂O₂ pourrait être dû à des réactions d'oxydation des groupes sulfhydriles provoquant une modification de la conformation des protéines et donc la perte de fonction des enzymes. De plus, il peut engendrer la peroxydation des lipides membranaires, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane du microorganisme cible (**Ammor et al., 2006 ; Dalié et al., 2010**).

6.3. Le dioxyde de carbone (CO₂)

Le CO₂ est principalement formé pendant la fermentation des hexoses suivant la voie hétéro-fermentaire. Le pouvoir antimicrobien du CO₂, produit par les bactéries lactiques, s'explique par la création d'une atmosphère anaérobie qui inhibe la croissance de certains microorganismes aérobies telle que la flore d'altération psychrophile à Gram négatif. De plus, l'accumulation du CO₂ dans la membrane lipidique de la cellule cible pourrait modifier sa perméabilité (Ammor *et al.* 2006; Salminen et Von Wright, 2009).

6.4. Les Bactériocines:

Les bactériocines sont des molécules de nature protéique synthétisées par voie ribosomique, et sécrétées dans le milieu extracellulaire. Elles sont douées d'une activité antimicrobienne envers des espèces microbiennes phyllo-génétiquement proches de l'espèce productrice (Ammor *et al.* 2005; Castellano *et al.*, 2008; Dalié *et al.*, 2010).

Leur spectre d'activité varie d'une bactériocine à une autre mais avec une activité dirigée principalement contre les bactéries à Gram positif. Les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes aux bactériocines car elles sont protégées par leur membrane externe qui empêche les bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Dortu et Thonart, 2009). D'une manière générale, les bactériocines sont thermostables, solubles et actives à pH acide (Labioui *et al.*, 2005), non toxiques pour les cellules eucaryotes et sensibles aux enzymes protéolytiques du tractus gastro-intestinal (Wijaya *et al.*, 2006), ce qui permet d'éviter les interférences avec la microflore intestinale (Castellano *et al.*, 2008).

II. Les bactéries pathogènes

II.1. *Escherichia coli*.

II.1.1 Caractéristiques générale:

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des Enterobacteriaceae, qui doit son nom à leur isolement fréquent du tube digestif et/ou des fèces des mammifères (Greatorex et Thorne, 1994). Les entérobactéries sont une vaste famille de bactéries qui sont rencontrées tous les jours en bactériologie médicale. Le terme Entérobactériaceae vient de deux mots grecs : Enterons « intestin » et baktéron « petit bâton », il signifie bacille intestinaux. (Fauchère *et al.*, 2002). La famille des Entérobactéries se définit par les caractères suivants (Le Minor *et al.*, 1990). Bacille à gram négatif (2 à 4 µ de long sur 0.4 à 0.6µ de large) ; immobiles ou mobiles grâce à

des flagelles disposés de manière péri triche ; poussent sur milieu ordinaire ; aérobies-anaérobies facultatifs ; réduisent le nitrate en nitrite ; ont une réaction d'oxydase négative ; utilise le glucose.(**Greatotex, 1994**)

II.1.2 Taxonomie:

Les souches d'*E.coli* sont différenciées à l'aide de la classification fondée en grande partie sur les travaux de Kauffman en 1944, qui se base sur la détermination des antigènes de surface (**Nataro et Kaper, 1998**). Principalement, deux antigènes sont pris en compte : les antigènes O somatiques et les antigènes H flagellaires. Il existe 174 antigènes (**Stenutz et al., 2006**) et 56 antigènes H différents chez *E. coli*. Une combinaison spécifique d'un antigène O et d'un antigène H définit le sérovar. Des souches d'*E.coli* appartenant à des stéréotypes spécifiques sont régulièrement associées à des pathologies, mais en général, ce ne sont pas les antigènes eux-mêmes qui confèrent la virulence aux bactéries (**Gyles, 2007**).

Par ailleurs, bien que la majorité des souches d'*Ecoli* soient commensales, certaines d'entre elles sont associées à des pathologies intestinales ou extra-intestinales très diverses chez l'Homme (**Levine, 1987**). Les pathovars à l'origine d'infections extra-intestinales, comme les UPEC (pour Uropathogenic *E.coli*»), responsables d'infections du tractus urinaire, et les souches d'*E.coli* associées à des méningites (MNEC pour « Méningites-associâtes d'*E.coli*») ou à des septicémies, ont été regroupées sous le terme de Ex PEC (pour «Extra-intestinal pathogenic *E.coli*») (**Russoet, 2000**).

II.2. *Staphylococcus aureus*

II.2.1.Caractéristiques générales

Les staphylocoques sont des bactéries aéro-anaérobies facultatifs, cocci Gram positif, catalase positive, de forme sphérique, de 0,5 à 1,0 µm de diamètre, a sporulée, immobile, coagulase positive et ils se regroupent en amas ou en paires. C'est un chimio-organotrophe qui a un métabolisme respiratoire et fermentatif et qui peut se développer entre 7 et 47°C, mais sa croissance optimale est à 30°C (**Bremer et al., 2004**). Pour inhiber sa croissance, il faut un pH maximal de 4,0 en aérobiose et de 4,6 en anaérobiose. Les souches peuvent croître entre pH 4,0 et pH 9,8. Les souches de *S. aureus* tolèrent une concentration de NaCl comprise entre

2,5 et 15% NaCl, mais leur croissance est beaucoup plus faible à 15%. Ces souches présentent des exigences nutritionnelles particulières. Elles ont besoin d'une source d'azote (5 à 12 acides aminés) et de vitamines (**Lamprell, 2003**).

II.2.2. Taxonomie

Le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des firmicutes, à la classe des bacilli, ordre des Bacillales, famille des *staphylococcaceae* (**Bergey, 2007**). Les espèces du Genre *Staphylococcus* peuvent être divisées en deux groupes : les staphylocoques à coagulase positive et les *Staphylocoques* à coagulase négative. Les *staphylocoques* à coagulase positive sont caractérisés par leur capacité de produire une coagulase libre, une protéine extracellulaire produite par certaines espèces de *staphylocoques*. Il existe sept espèces et sous-espèces du genre sont des staphylocoques à coagulase positive : *S.aureus*; *S.intermedius*; *S.lutrae*; *S.delphini*; *S.schleiferi* sp; *S. aureus* ssp. *anaerobius* et *S. hyicus*. Néanmoins, toutes les souches de *S. hyicus* ne sont pas coagulase positive (**Lamprell, 2003**). *S.epidermidis* est la plus fréquente des *staphylocoques* à coagulase négative (**Schaerchter et al., 1993**).

II.3 *klebsiella* sp

II.3.1. Caractéristiques générales:

Klebsiella est une entérobactérie appartenant au genre *klebsiella*, il s'agit d'un bacille à Gram positive toujours immobile et très souvent capsulé ; poussant sur milieu ordinaire en atmosphère aéro-anaérobie, oxydase négative, fermentant le glucose et la lactose en produisant du gaz, produisant l'indole et une uréase et fermentent l'acétoïne, réduisant la nitrate en nitrites (**Chikhani, 2012**).

II.3.2. Taxonomie :

Le genre *Klebsiella* (*Klebsielles*) comporte cinq espèces dont l'espèce type est *K.p* (9). L'espèce *K.p* est subdivisée en 3 sous-espèces : *K. pneumoniae subsp pneumoniae*, *K. pneumoniae subsp ozaenae* et *K. pneumoniae subsp Rhinoscleromatis* (**Le Minor et Veron, 1989**). Le genre *Klebsiella* appartient à la famille des Enterobacteriaceae, l'ordre Enterobacteriales, le phylum proteobacteria, et le domaine des Bactérie (**Yang et al., 2011**). Le genre *Klebsiella* appelée également bactérie de Friedland. Sa nomenclature est aujourd'hui

encore provisoire, car de nouvelles espèces ont été incluses dans ce genre, sur des arguments phénotypiques, mais sans réévaluation globale de sa position taxonomique au sein des entérobactéries, ni entre les différentes espèces. A l'origine, l'importance médicale du genre *Klebsiella* le conduisit à être subdivisé en quatre espèces correspondantes aux maladies engendrées : *K. pneumoniae*, *K. Ozaenae*, *K. rhinos-clermontois*, *K. oxytoca* (**Jean et al., 2000**),

II.4. Les Salmonelles:

II.4.1. Caractéristiques générales :

Les salmonelles sont des entérobactéries du genre *Salmonella*, nommées ainsi en l'honneur du médecin vétérinaire américain Daniel Elmer Salmon même si l'homme qui a découvert le genre était Théobald Smith, qui travailla sous la direction de Salmon au Bureau of Animal Industry (BAI) dès 1884. (**Eberth et al., 1880**) découvre l'agent responsable de la fièvre typhoïde dont la culture de la bactérie a été possible en 1884 par Gaffky, le bactériologiste Daniel eut isolé une bactérie provenant du porc (maintenant connu comme *Salmonella Choleraesuis*) qui était considérée comme étant la cause de la fièvre porcine (choléra du porc). En 1896 Widal a mis en évidence la diversité antigénique des souches de salmonelles (**Grimont et al., 2000**). Depuis les premières observations rapportées par Eberth jusqu'à nos jours, le genre *Salmonella* n'a pas cessé de présenter une importance considérable dans les domaines vétérinaires et sur le plan médical, tant par les pertes économiques dues à la maladie animale, que par la forte incidence chez l'homme des fièvres typhoïdes et des toxi-infections alimentaires collectives à salmonelles (**Bornert, 2000**).

II.4.2. Classification :

Selon le **Bergey's Manuel. (2001)** le Genre *salmonella* fait partie de la Famille des *Enterobacteriaceae*, de l'ordre des *Enterobacteria* les Classe des *Gamma proteobacteria* et du Phylum des *Proteobacteria* (**Scaria et al., 2008**). Comme indique la dernière nomenclature, qui reflète les avancées récentes en taxonomie (**Popoff et al., 2001**). Le genre *Salmonella* comprend seulement 2 espèces : *S. enterica* et *S. bongori*, et 2500 sérovars (**Le minor et Popoff, 1987; Popoff et al., 1994**). *Salmonella enterica* est divisée en 6 sous-espèces, qui se distinguent par certains caractères biochimiques et certaines d'entre eux correspondent aux anciens sous-genres.

Ces sous-espèces sont:

Nomenclature ancienne =	Nomenclature actuelle
Sous-espèces I =	Sous-espèces enterica
Sous-espèces II =	Sous-espèces salamae
Sous-espèces III =	Sous-espèces arizonae
Sous-espèces III =	Sous-espèces diarizonae
Sous-espèces IV =	Sous-espèces houtenae
Sous-espèces VI =	Sous-espèces indica

II.5. *Pseudomonas* sp:

II.5.1. Caractéristiques générales :

Les *pseudomonas* font partie des protéobactéries à Gram négatif, comprennent de multiples espèces et font partie des espèces douées d'un pouvoir pathogène et, parmi elles, des *pseudomonas* à pigment fluorescent, les *Pseudomonas fluorescens*, qui sont très nombreux et très répandus dans l'environnement et, notamment, les milieux aquatiques à l'exception des eaux souterraines bien protégées. Pour bien différencier le pyocyanique des autres *pseudomonas* à pigment fluorescent, l'identification se fait en recherchant le pigment pyocyanine soluble dans le chloroforme et la capacité du germe à se développer à 41°, ces deux tests suffisant à faire le diagnostic de PA. Quant aux autres très nombreuses espèces de P fluorescents il est impossible d'en faire l'identification autrement qu'en recourant aux techniques d'hybridation des ADN pour voir si les séquences d'ADN d'une souche sont faciles à hybrider avec des espèces connues (Migula, 1894 ; Palleroni, 1978).

II.5.2. TAXONOMIE :

Le genre *Pseudomonas* représente un large groupe de microorganismes ubiquitaires et hétérogènes désignés par les *Pseudomonas (pseudomonads)*. Depuis sa première description par Migula en 1894, de nombreuses espèces de ce genre bactérien ont été retrouvées en populations adaptées aux principaux écosystèmes naturels terrestres et aquatiques (Spires et al., 2000). Les études réalisées depuis plus d'un siècle sur ce genre bactérien ont mis en évidence une complexité dans ses caractéristiques taxonomiques. Dès les premiers travaux, réalisés en 1926

par Deudooren et par Jensen, des variations taxonomiques ont été rapportées (**Holloway, 1992**). ont initié l'ébauche d'une étude taxonomique mettant en évidence la diversité des *Pseudomonas*. (**Stanier et al., 1966**).

II.6. Les Levures: "Candida"

II.6.1. Caractéristiques générales :

Le genre *Candida* fait partie du phylum des Ascomycètes de la classe des Saccharomycètes (forme télomorphe ou sexuée). En mycologie humaine, la forme sexuée étant rarement rencontrée, le nom de la forme asexuée (an amorphe) est alors utilisé. Ce genre comprend environ 200 espèces, mais moins d'une vingtaine d'entre elles sont fréquemment impliquées dans un processus pathologique (**Ripert, 2013**).

Les *Candida* sont des levures ubiquitaires retrouvées dans l'environnement (sol, air), mais aussi dans certains produits alimentaires (fruits, céréales, légumes, produits laitiers...). Introduits dans l'organisme par l'alimentation, ces levures sont présentes naturellement dans la flore intestinale de l'Homme et de nombreux mammifères ou oiseaux (**Chabasse et Bouchara, 2008**). Chez l'homme, *Candida* colonise de nombreux sites anatomiques. L'habitat naturel et le spectre clinique des principales espèces sont présentés dans le tableau 1. Durant leur adaptation au commensalisme, certaines espèces se sont spécialisées pour certaines localisations. Ainsi, *C. albicans* et *C. glabrata* vivent en commensaux en équilibre avec la flore bactérienne sur les muqueuses digestives et génito-urinaires de l'homme et de la femme, alors que *C. parapsilosis* et *C. fa mata* sont des levures commensales de la peau. Ce sont des levures opportunistes, elles profitent d'un dysfonctionnement du système immunitaire ou d'autres facteurs favorisant pour se comporter comme pathogène et provoquer des candidoses (**Chabasse et Guiguen, 1999; Bouchara et Pihet, 2010**).

II.6.2. TAXONOMIE :

Les *Candida* appartiennent au Phylum Ascomycète, au sous-Phylum Saccharomycotina, à la Classe des Saccharomycètes (Hem ascomycètes), à l'Ordre Saccharomyces et à la Famille Saccharomycetaceae, expliquant la proximité avec le genre Saccharomyces (**Hibbett et al., 2007**). Certaines levures du genre *Candida* sont capables de reproduction sexuée. Ces formes

sexuées (formes parfaites ou télé morphes) portent un nom différent de celui de la forme asexuée (forme imparfaite ou an amorphe) (**Tableau 1**). Toutefois cette classification reposant uniquement sur l'existence d'une forme sexuée est complexe et source de confusion. En mycologie médicale, pour les levures d'intérêt médical, étant donné que la forme sexuée est très rarement observée lorsqu'elle existe, il est usuel de nommer celles-ci par leur stade asexué (**Bouchara, 2010**)

PARTIE II:
MATERIEL ET METHODES

1. Origine des souches :

Dans ce travail, Six souches tests de *Lactobacillus sp* conservées à -20°C ; et Six souches de bactéries pathogènes (à savoir: *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC25922, *salmonelle typhimurium* ATCC700623, *pseudomonas aéroginosa* ATCC27858, *klebsiella sp* ATCC700603 et *Candida albicans* ATCC 10231), conservées à 4°C dans 9ml du bouillon MH ; ont été utilisées comme souches indicatrices pour les tests d'antagonisme bactérien. Les différentes souches utilisées sont représentées dans le tableau suivant (**Tableau n01**):

Tableau. 01: les différentes souches des bactéries utilisées (lactiques, pathogènes).

Souches	Milieu de culture	Température de croissance	Nom de la souche	Origine / Source
Les Bactéries lactiques	MRS	37°C	LB1	Lait de vache LMBAFS
			LB2	
			LB3	
			LB4	
			LB5	
	MRS-çays	BB12	LMBAFS	
Les Bactéries pathogènes	MULLER H	37°C	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC(25923)	LMBAFS
			<i>E.Coli</i> ATCC(25922)	
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	
			<i>Candida albicans</i> ATCC(10231)	
			<i>Klebsiella sp</i> ATCC(700603)	
			<i>Selmonelle sp</i> ATCC(700623)	

2. Revivification et vérification de la pureté des souches bactériennes :

2.1. Revivification des bactéries :

Les souches lactiques conservées dans des géloses inclinées (MRS) 4°C, puis sont repiquée sen trois fois répétitives dans 9ml de bouillon MRS et incubées a 37°C/24h avant de servir à l'ensemencement des cultures jeunes pour la réalisation des différents tests de l'étude. Les souches pathogènes sont repris à partir de culture de 24h dans un bouillon MH à 4°C et repiquée dans des nouveaux tubes de bouillon MH incubées à 37°C / 18h avant chaque test.

2.2. Vérification de la pureté des souches utilisées:

Il est obligatoire de vérifier la pureté des souches avant toute utilisation. Après des repiquages successifs, un ensemencement sur gélose MRS, MH est réalisé .Ainsi des tests simples et rapides sont réalisés basés sur l'observation macroscopique de l'aspect des colonies; l'aspect microscopique (forme et coloration de Gram); le Test de catalase.

a. Observation macroscopique:

Cette observation a été réalisée pour décrire l'aspect des colonies obtenues sur la gélose MRS. Les caractères pris en compte sont : la taille, la couleur, l'aspect (collant, muqueux), l'odeur, la transparence et l'allure des contours. L'examen microscopique est effectué par le microscope optique au grossissement(X100). Il permet d'observer la forme des cellules : leur mode de regroupement. La coloration de Gram est effectué a partir d'une culture fraîche de 24h L'étude morphologique des bactéries nécessite la préparation d'un frottis coloré. Ce dernier consiste en un étalement de la colonie à étudier sur une lame propre, suivi d'un séchage, d'une fixation et d'une coloration.

b. La coloration de Gram

La coloration de Gram a pour but de classer les bactéries selon leur Gram (G-, G+), leur forme (cocci, bacille), et leur mode d'association (en chaînette, libre, en amas)

Elle s'effectue à l'aide de colorants en commençant par l'application du violet de gentiane pendant 30s à 1min. Après recouvrement direct avec Lugol de ce frotti, on procède à une décoloration en versant l'alcool éthylique à 96% goutte à goutte sur la lame inclinée obliquement, puis au rinçage avec l'eau distillée. Enfin, la recoloration par la fuschine (30s à 1min). Après cette coloration, un rinçage et un séchage sont effectués en utilisant l'eau distillée et le papier absorbant. Pour l'observation microscopique au grossissement (X100), une goutte d'huile à immersion est ajoutée.

C. Test de catalase :

Une goutte d'eau oxygénée H_2O_2 à 10V est déposée sur une colonie développée pendant 24h à 48h sur gélose MRS. Le résultat est immédiat et se caractérise par un dégagement gazeux ou effervescence. (Marchal et al., 1991). La catalase accélère la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et oxygène Cette réaction est évidente par la formation rapide de bulles



3. Etude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques :

3.1. Méthodes directe (Test des spots) :

L'activité antimicrobienne des souches lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes, est mise en évidence par le test des spots. Le test consiste à déposer un volume de $05\mu L$ de la culture fraîche de 18h de chaque souche lactique d'une concentration de 10^9 UFC/ml sur une gélose MRS (solidifiée et séchée), les spots sont séchés près du bec bunsen pendant quelques minutes puis incubés à $37^\circ C$ pendant 24h. En parallèle, une culture fraîche de bactéries pathogènes à tester est préparée en la cultivant dans 9ml de bouillon MH et incubée à $37^\circ C$ /24h (Figure02). Après incubation, 9mL de gélose Mueller Hinton en surfusion sont inoculés par 1mL (10^8 UFC/ml) de la souche cible. Ensuite, le mélange est coulé sur la gélose MRS, en contact avec les spots. Les boîtes sont incubées à $37^\circ C$ /24h (Fleming et al., 1975). Au terme de l'incubation, les diamètres des zones d'inhibitions qui apparaissent autour de chaque spot sont mesurés.

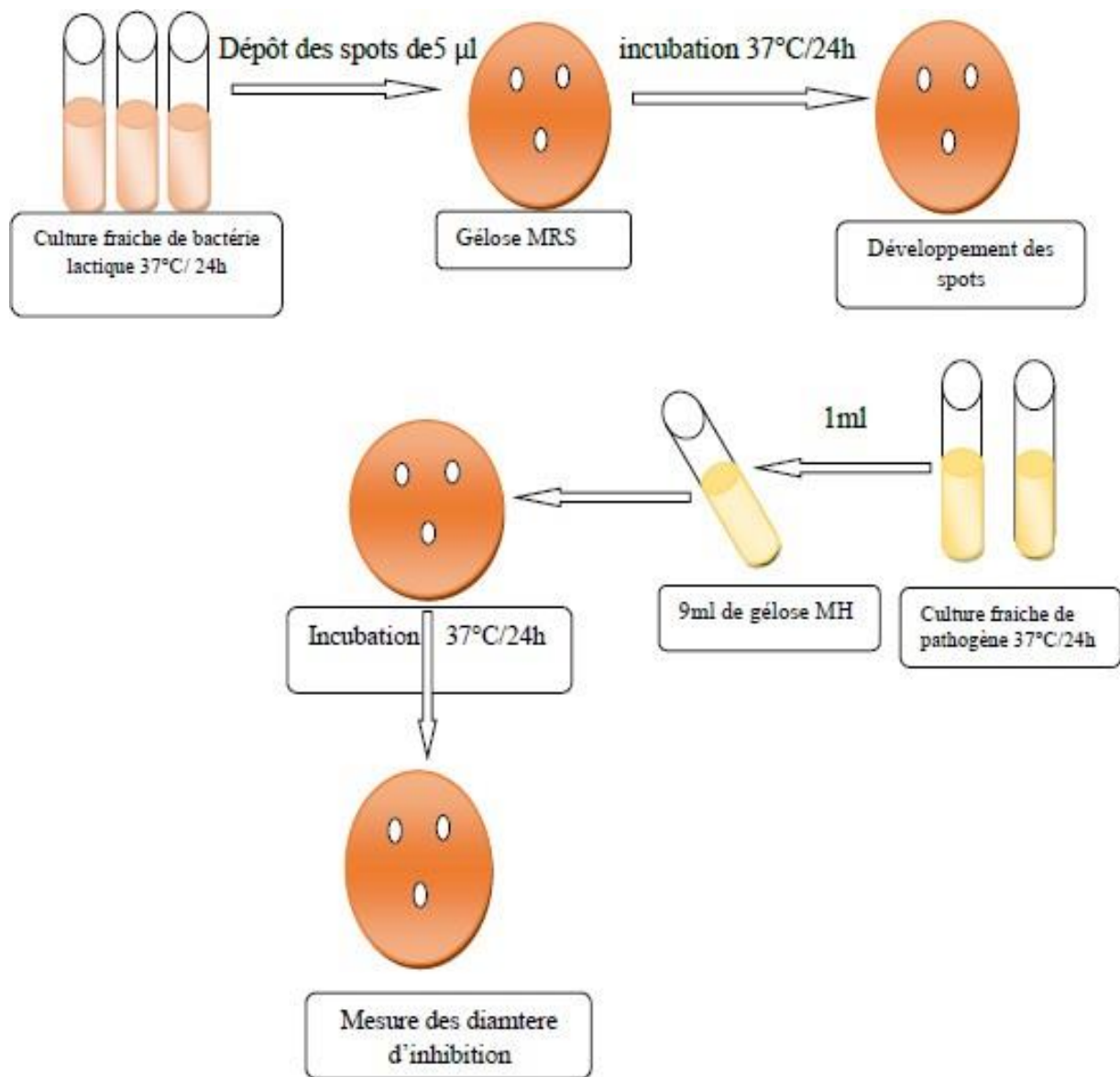


Figure02: Schéma illustrant les étapes du test d'antagonisme bactérien par la méthode des spots

3.2. Méthode indirecte (Test des puits):

Cette technique est utilisée pour déterminer la production probable de métabolites dans les fractions du surnageant responsables de l'effet inhibiteur ou non obtenu lors de la méthode direct avec les fractions cellulaires et en même temps elle a servie aussi pour les autres tests d'antagonisme permettant l'identification de la nature de la substance inhibitrice (**figure 03**).

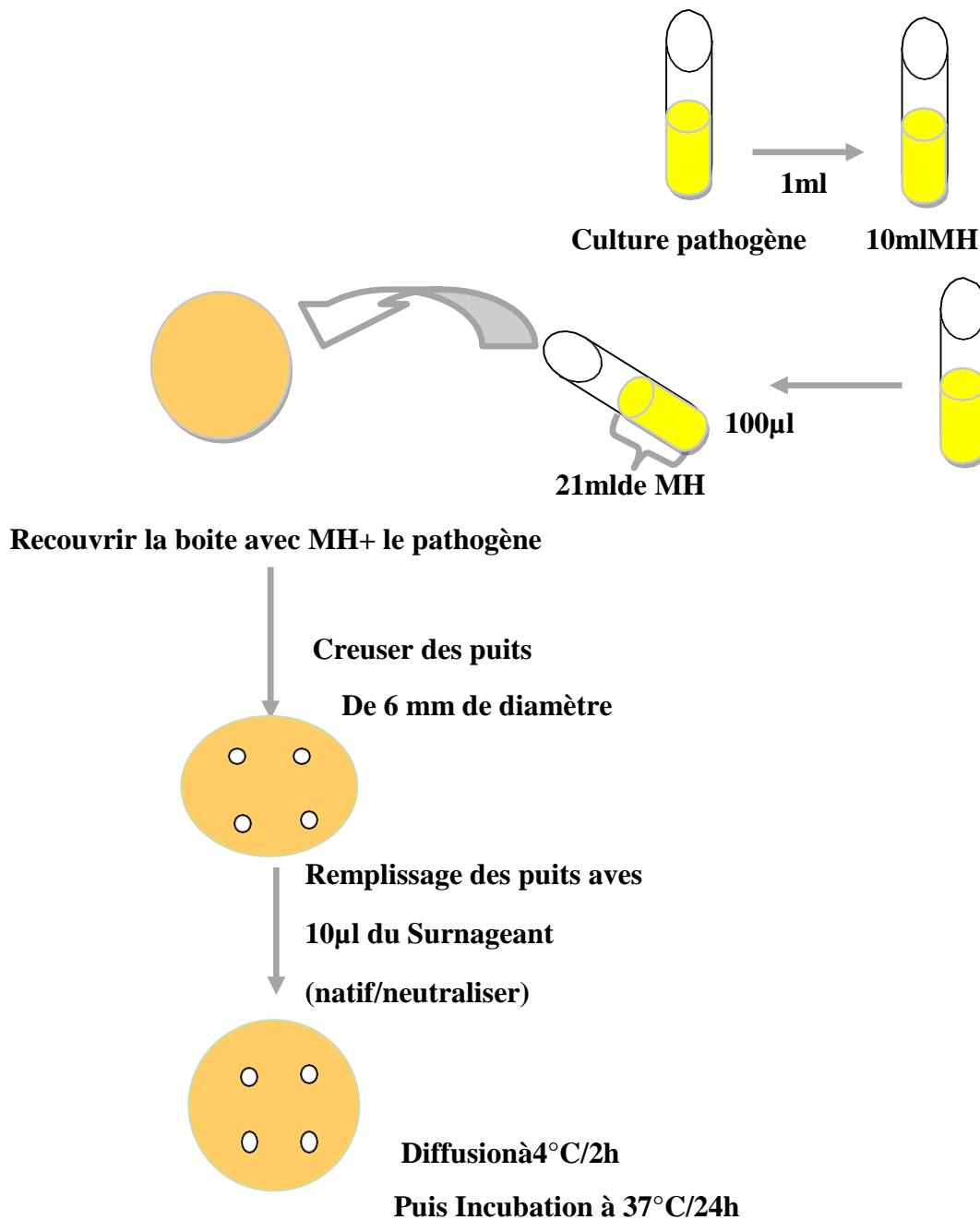


Figure03:Schéma illustrant les étapes du test d'antagonisme bactérien par la méthode des puits

3.2.1. Cas du surnageant natif:

Une fine couche de gélose nutritif est coulée en premier, dans des boîtes de Pétri pour le maintien de la gélose à utiliser (MH). Après solidification, une couche de 18ml de gélose MH en surfusion est inoculée avec 2 ml de la souche cible 10^8 UFC/ml, et est coulée sur la surface. Les surnageants des souches lactiques sont obtenus par centrifugation des cultures fraîches de bactéries lactiques à 3000rpm pendant 15 min. Des puits de 6 mm sont confectionnés dans la gélose à l'aide d'un embout d'une micropipette, chaque puits est rempli de 10 μ l de surnageant natif d'une souche lactique. Avant l'incubation à 37°C pendant 24h; les boîtes sont mises au réfrigérateur à une température de 4°C pendant deux heures pour assurer la bonne diffusion du surnageant dans le milieu (Tagg et MacGiven, 1971 ; Barfoot et Klaenhammer, 1989 ; Kim *et al.*, 2001). L'activité antimicrobienne se révèle par l'apparition de zones claires autour des puits dont les diamètres d'inhibition sont ensuite mesurés en millimètres.

3.2.2. Cas du surnageant neutralisé :

Afin de déterminer la nature de la substance responsable de l'apparition des zones d'inhibition; l'effet des acides organiques est éliminé, notamment des acides lactique et acétique. Le surnageant récupéré après centrifugation est neutralisé par la soude (NaOH) 1N de façon à obtenir un pH de 7 (Kim *et al.*, 2001; Labioui *et al.*, 2005). Puis l'activité est testée par la méthode des puits détaillée précédemment.

3.2.3. Cas du surnageant + enzyme :

Les surnageants ont été traités avec la pepsine, cette enzyme est utilisée à une concentration finale de 1mg/1ml de surnageant, la solution est stérilisée par des filtres millipore 0,45 μ m et 50 μ L du mélange surnageant+enzyme à une concentration finale de 1% ont été déposés dans chaque puits. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h (Vinod Kumar *et al.*, 2006).

PARTIE III
RESULTATS ET DISCUSSION

1. Les souches lactiques :

Les résultats de vérification de la pureté des souches réalisés par la coloration de Gram et le test de catalase sur les colonies des bactéries lactiques obtenues sur gélose MRS montrent clairement qu'ils sont purs.

1.1. L'aspect macroscopique:

Après 24h d'incubation, le résultat sur milieu liquide bouillon MRS apparaît sous forme d'un trouble. Cependant, sur milieu solide la croissance apparaît sous forme de petites colonies blanchâtres crémeuses (**figure04**).

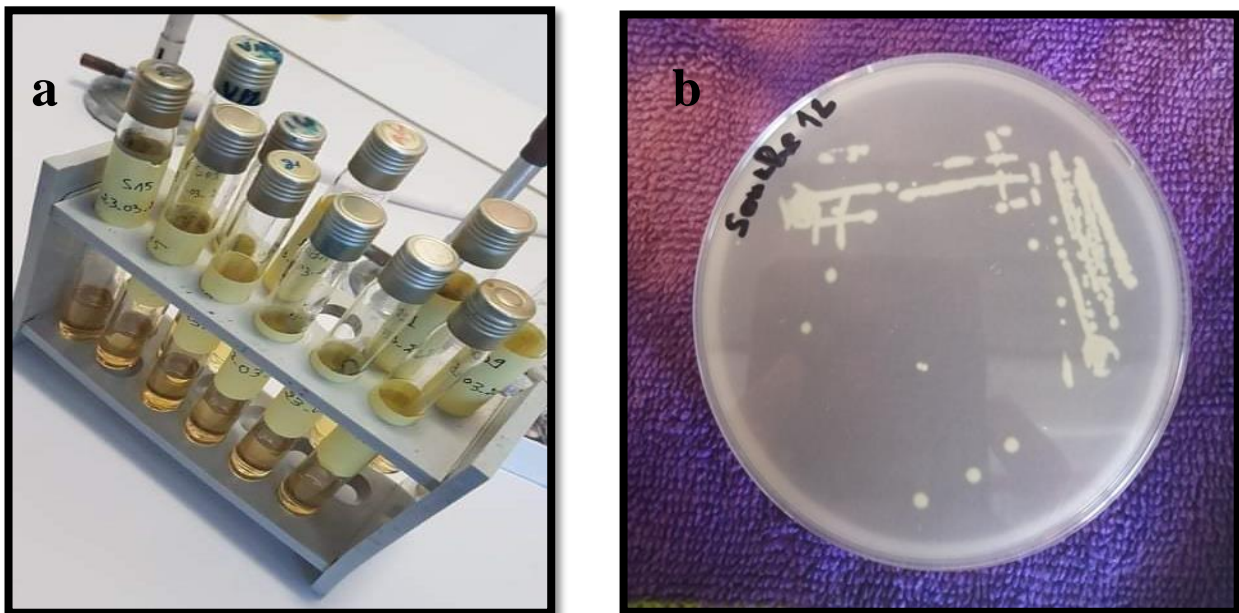


Figure 04 : Aspect des bactéries lactiques sur milieu MRS (a: Sur bouillon MRS b: Sur gélose MRS)

1.2. Aspect microscopique :

L'étude microscopique est basée sur la coloration de Gram qui nous a permis de confirmer que les bactéries étudiées sont Gram positif (figure05) et se présentent sous forme de bacilles (les Lactobacilles) avec différents modes d'associations. Les résultats sont illustrés dans le (**Tableau 03**) et la **figure05**.

Tableau02:Résultats de l'observation microscopique des souches lactiques utilisées.

Souche	Gram	Catalase	Forme	Mode de regroupement
Lb01	+	-	Bacilles, courte, allongé, bâtonnet, filamenteuses	Isolé, en paires ou en chainettes
Lb02	+	-		
Lb03	+	-		
Lb04	+	-		
Lb05	+	-		
BB12	+	-		



Figure05: Observation de la souche LB5 sous microscope optique (Gx100)

2. L'antagonisme bactérien des bactéries lactiques

2.1. Méthode directe (Test des spots):

L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques vis-à-vis des pathogènes apparait sous forme de zones claires autour de chaque souche et qui diffèrent par leurs diamètres.

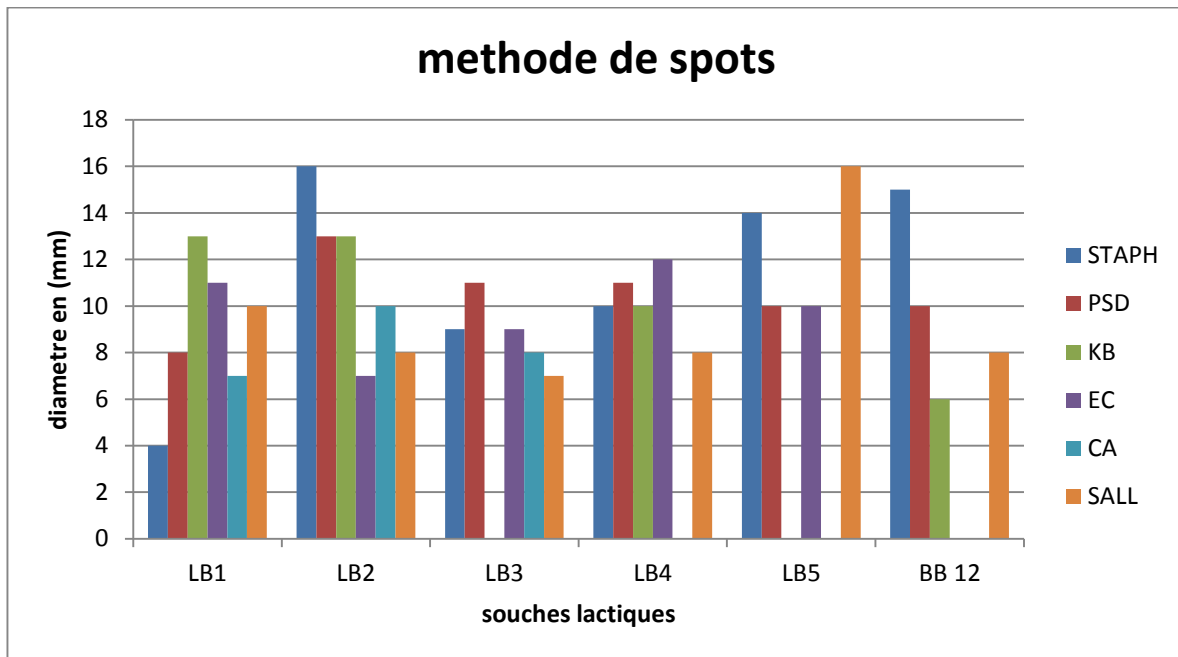


Figure06: Diagramme d'antagonisme Bactérien des souches lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes par la méthode des spots

Les résultats du test d'antagonisme bactérien par la méthode des spots ont révélé une bonne activité antimicrobienne des souches lactiques utilisées dans cette étude vis-à-vis des différentes bactéries pathogènes selon la souche considérée. L'antagonisme des souches vis-à-vis de la bactérie *Staphylococcus aureus* ATTC25923, démontre clairement une activité inhibitrice par l'apparition des zones claires autour des différentes souches lactiques et dont les meilleures zones d'inhibition obtenues par les souches LB2; LB5, et BB12 présentent un diamètre compris entre [14mm-16mm] alors que les autres souches LB1; LB3 et LB4 ont un diamètre compris entre [4mm-10mm] ce qui reste aussi considérable comme résultat. Egalement La souche BB12 présente aussi une zone d'inhibition de 15 mm, alors que sur les autres souches comme *Pseudomonas ATCC27858*; *klebsiella ATCC700603*, montre une activité inhibitrice comprise entre (8mm-14mm).

Des zones claires d'inhibition obtenues par les souches LB2; LB 1 présentent un diamètre compris entre (10mm_12mm), contre *klebsiella ATCC700603*. *Contre salmonella Tp.*

ATCC700623 la meilleure zone d'inhibition (16 mm) obtenus par la souche LB5, alors que contre *candida albicans ATCC 10231* les inhibitions sont obtenues par les souches LB1, LB2, LB3. Quant à *E.coli* ATCC 25922, on a obtenue clairement une activité inhibitrice avec les cinq premières souches dont les diamètres des zones d'inhibition sont entre (5mm_12mm).

Nos résultats se rapprochent de certains auteurs selon la littérature. En effet, Labioui et ses collaborateurs. (2005), ont rapporté que les diamètres des zones d'inhibition des bactéries

lactiques à l'égard de *Staphylococcus* sont variables et peuvent aller jusqu'à un diamètre de 23 ± 0.3 mm. Selon Dal Bello. (2009), les bactéries lactiques sont douées d'une activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus* par la production de plusieurs métabolites (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, et les bactériocines).

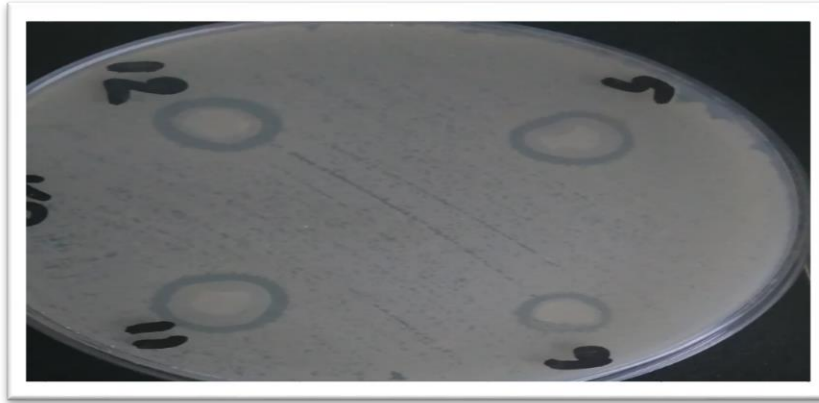


Figure07: Antagonisme bactérien vis à vis de *klebsiella*

A travers le test de spot réalisé, nous avons constaté que toutes les bactéries lactiques utilisées présentent un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries pathogènes, et qui se résume par les zones d'inhibition autour de chaque spot. On peut attribuer ce phénomène aux différents métabolites excrétés tels que : l'acide lactique, d'autres acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, les bactériocines et le dioxyde de carbone (Leveau *et al.* 1991 ; Klaenhammer *et al.*, 1994 ; DeVuyst *et Leroy*, 2007). Des résultats similaires à cette étude (où les bactéries lactiques isolées à partir de certains produits laitiers) présentent un effet antagoniste vis-à-vis des bactéries pathogènes, ont été rapportés par (Allouche *et al.*, 2010).

2.2. Méthode indirecte (Test des puits)

2.2.1. Cas du surnageant natif:

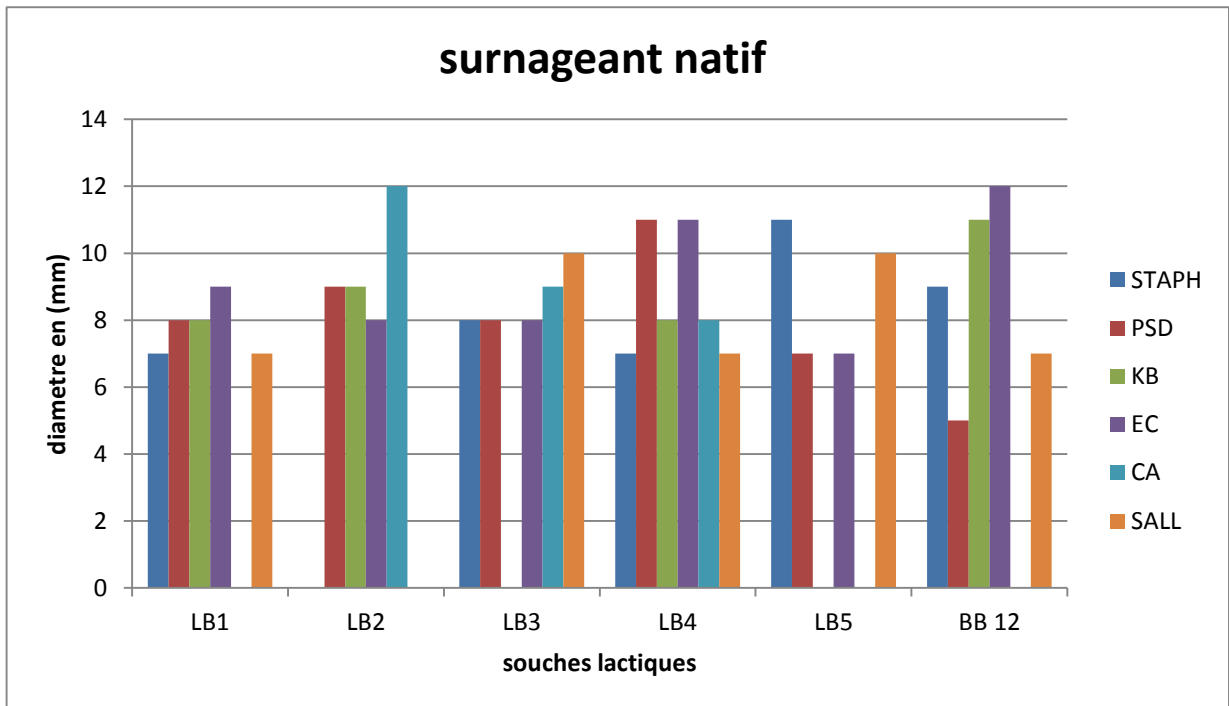


Figure 08 : Diagramme des zones d'inhibitions obtenues par les surnageant natifs des souches lactiques

Les résultats obtenues par les surnageant natif se rapprochent de ceux obtenues par contacte directe ce qui confirme la présence de métabolites responsables de cet antagonisme bactérien, tout les surnageant natif des différentes souches présentes des diamètres variable entre [5-12 mm] selon la souche considéré ; les meilleur zones d'inhibition sont obtenue par LB2; LB3; LB4; LB5 et BB12 , néanmoins contre certains pathogènes l'activité inhibitrice n'a pas été obtenue par exemple contre la souche *Candida albicans*, la Souche LB1 ne l'a pas inhiber alors qu'en méthodes directe, la zones d'inhibition était de 7mm, ce ci peut s'expliquer par la nécessité d'un contacte directe pour reconnaître la cellule. La bactérie *Staphylococcus auréus* ATCC 25923 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27858; *klebsiella* ATCC700603 et *E.coli* ATCC 25922 ont été inhibé par l'ensemble des souches lactiques utilisées. *Salmonella typhi* ATCC 700623 est inhibé par toutes les souches sauf LB2, et *candida albicans* ATCC 10231 est inhibé que par les souches LB2; LB3 et LB4.

Les six souches lactiques pures testées présentent une activité antagoniste importante vis-à-vis des espèces Gram positif et Gram négatif cela est due à la capacité de ces à produire des Substances antagonistes (**Garnaux et al., 2002**). En effet, plusieurs études actuelles assurent que les fractions bactériennes cellulaires n'ont aucun effet sur la croissance des souches cibles, par contre la fraction extracellulaire contient des substances responsables de cette interaction (**Achemchem et Abrini, 1997 ; Labioui et al., 2005**). Aussi Les bactéries lactiques sont capables de produire deux substances majeures (acide lactique et bactériocines) responsables de l'effet antagoniste vis-à-vis des espèces intestinales. (**Metlef, 2007**) et la différence dans l'activité inhibitrice entre les souches d'une même espèce est due à une faible homologie de leurs acides nucléiques responsables des caractères héréditaires (**Sutra et al., 1998**).

2.2.2. Cas du surnageant neutralisé:

LB2;LB ; LB5, et BB12 présentent les meilleur zones d'inhibition obtenues contre *E.coli* ATCC (25922) avec un diamètre compris entre (6mm-7mm). La bactérie *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) est clairement inhibé par LB3 et LB5 avec un diamètre de la zone d'inhibition égale à (8 mm); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27858), est inhibé par les souches LB2 et LB4 avec une zone d'inhibition de (7mm) , *klebsiella* ATCC 700603, est inhibé par la souche LB1 avec la meilleur zone d'inhibition à 9mm; et au finale; *candida albicans* ATCC (10231) et *salmonlla tp* ATCC (700623) , elle ne présente aucune inhibition.

Nos résultats apportent que l'effet antibactérien des lactobacilles est dû probablement aux bactériocines. En effet; **Thauhault et al. (1991) ; Jack. (1995) ; Onda et al. (2003)** confirment que les bactéries gram positif sont plus sensibles à l'effet bactéricide ou bactériostatique des bactéries lactiques où les bactériocines produites par ces dernières agissent sur les bactéries gram positif en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires. De même **Song et Richard. (1997)** ont montré chez certaines bactéries Gram positif que les cellules résistantes aux bactériocines ont une membrane de composition différente de celle des cellules sensibles.

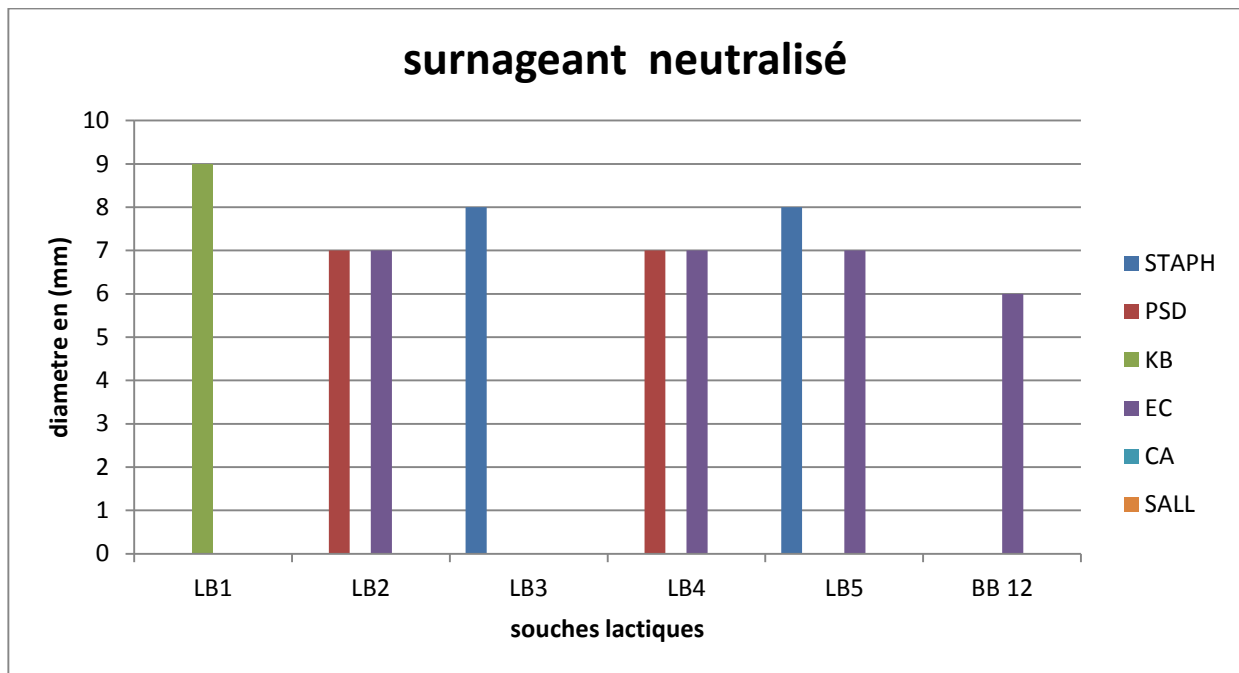


Figure 09 : Diagramme d'antagonisme bactérien des surnageant neutralisés vis-à-vis des bactéries pathogènes.

2.2.3. Cas du surnageant traité par la pepsine:

Après élimination de l'effet des substances protéiques (bactériocines et autres) ; l'activité de l'acide lactique est mise en évidence par la méthode de diffusion sur gel, et les zones d'inhibition obtenues traduisent justement le rôle de l'acide lactique vis à vis de certains pathogènes. Dans ce cas , *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) est inhibé par LB3 ; LB5 (6mm); *Pseudomonas ATCC* (27858) présente un effet inhibiteur par quatre souche LB1 ;LB2 ;LB3 et LB5 avec un diamètre de zone d'inhibition entre (7mm-11mm); *Salmonella tp* ATCC (700623) ,est inhibé par sur les souches LB2 (8 mm) ; LB3 (6mm) ; LB4 et BB12 (12mm); *E.coli* ATCC (25922) inhibé par LB2; LB 4 ;LB5 (7mm) , quant à *klebsiella*ATCC (700603) et *Candida albicans* elle ne présente aucune .inhibition . Plusieurs études rapportent que l'effet antagoniste de l'acide lactique est provoqué par l'acide L (-) ou D (+) et que la nature de l'acide lactique est la seule responsable de son activité inhibitrice mais pas de sa quantité dans le milieu. (Guitarni, 2005; Duwat et al., 2001). En effet, les travaux de Sutra et al. (1998) confirment que l'inhibition des bactéries pathogènes ne dépend pas de la quantité d'acide lactique produite par les bactéries lactiques, mais elle est liée au type (L (-), D (+) ou les deux) et à la forme dissociée ou non de l'acide lactique. L'effet du pH est renforcé par la forme sous laquelle se trouve l'acide lactique et produit lors de la fermentation. En effet, c'est la forme non dissociée de l'acide lactique qui

prédomine à pH acide, elle est généralement plus toxique pour les cellules microbiennes intestinales. (Metlef, 2007).

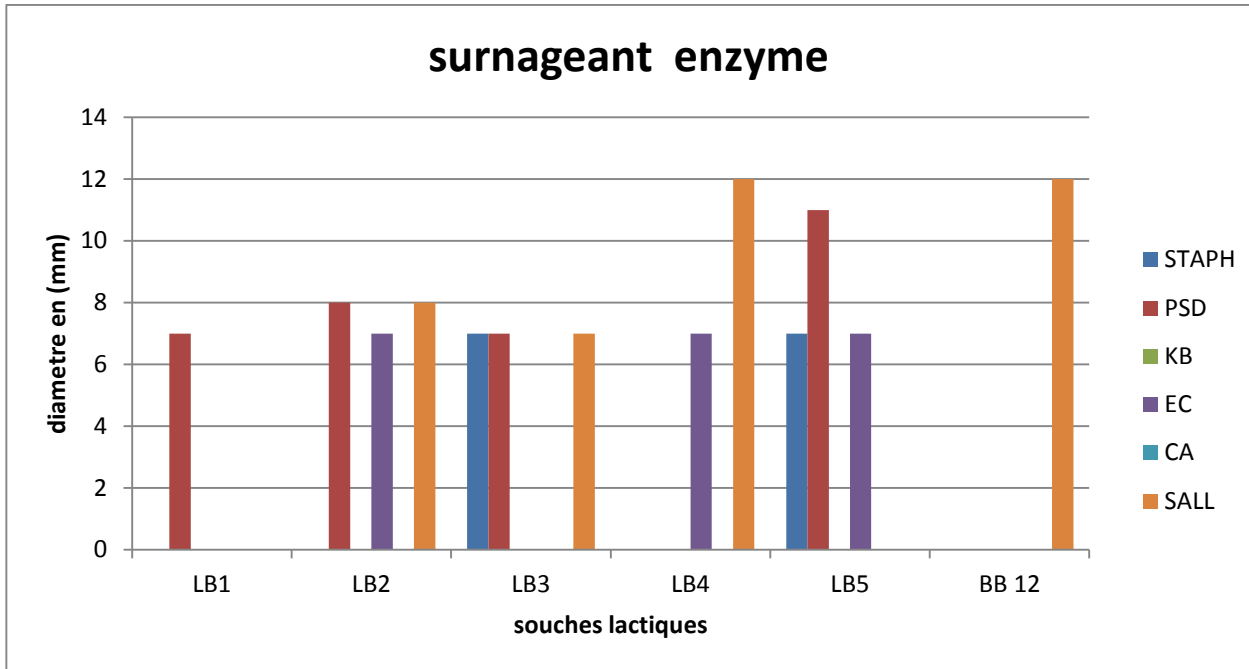


Figure 10 : Diagramme d'antagonisme bactérien des surnageant+pepsine vis-à-vis des bactéries pathogènes.

Conclusion:

Ce travail a été basé sur la recherche de l'activité antimicrobienne de Six bactéries lactiques, vis-à-vis de six types de bactéries pathogènes: à savoir: (*staphylococcus ATCC (25923)*, *E.coli ATCC(25922)*, *pseudomonas ATCC (27853)* , *klebsiella ATCC '700603)*, *salmonella tphi ATCC(700623)* et *candida ATCC(10231)* qui sont responsables de diverses pathologies ainsi que certaines toxi-infection alimentaires. L'antagonisme bactérien est évalué en utilisant la méthode directe (de spots) , ainsi que la méthode indirecte (Diffusion en puits) qui a été utilisée pour déterminer la nature de l'effet inhibiteur en testant le surnageant seul natif; le surnageant neutralisé et le surnageant natif traité par une ; la pepsine. Les tests effectués ont abouti aux résultats suivants ; la méthode directe (fraction cellulaire: test des spots), démontre que la majorité des souches lactiques utilisées ont une bonne activité antimicrobienne sur les pathogènes utilisées. Les meilleures zones d'inhibition obtenues par les souches LB2; LB5, et BB12 présentent un diamètre compris entre [14mm-16mm] alors que les autres souches LB1; LB3 et LB4 ont un diamètre compris entre [4mm-10mm]. Pour la méthode indirecte le test réalisé avec le surnageant natif a confirmé le potentiel antagoniste des souches lactiques qui s'explique par la présence de métabolites antibactériens dans la fraction extracellulaire, alors que les tests avec le surnageant neutralisé et traité avec la pepsine démontrent que pour certaines souches dont l'effet inhibiteurs vis-à-vis de certains pathogènes est perdu donc l'agent antibactérien responsable de l'inhibition est l'acide lactique alors que pour d'autres souches l'effet inhibiteur est préservé après neutralisation ce qui se traduit par la présence d'autres molécules responsables de cette inhibition à savoir le H₂O₂, Di acétyle ou bactériocine et le test avec le surnageant traité par la pepsine confirme la présence de substance de natures protéiques comme agent inhibiteur (Bactériocine-lié).

Les résultats préliminaires obtenus affirment que les souches lactiques sont dotés d'une activité antimicrobienne due à leur production de différents métabolites (acide lactique, et substance protéique dont probablement des bactériocines- lié) dont il serait intéressant en perspective de les exploiter au mieux pour cibler exactement la substance responsable et l'identifier.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- **Abedi, D., Feizizadeh, S., Akbari, V and Jafarin-Dehkordi, A., (2012).** In vitro anti bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus del Brue chi subs bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 8(4):261-268.
- **Allouche, F.N., Hellal, A., Laraba, A., (2010).** Etude de l'activité anti microbienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie*, 03 : 13 -20
- **Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M.,Chaillou, S et Chevallier, I., (2005).** Characterization and selection of *Lactobacillus sake* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food microbiology*, 22: 529–538.
- **Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., et Chevallier, I., (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1-Screening and characterization of the anti bacterial compounds. *Food Control*, 17:454–461.
- **Ammor, M.S., Mayo, B., (2007).** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production, anupdate.*MeatScience*, 76: 138-146.
- **Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., and Monteil, H., (2000).** *Bacteriologies Clinique*, Ellipses, Paris. 2^{ème} édition: 171-211.
- **Aymerich, M.T., Garriga, M., Monfort, J.M., Nes, I., Hugas, M., (2000).** Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. -*Food Microbial.*, 17(1),33-45

B

- **Bouchara J-P., Pihet M., De Gentile L et Chabasse D. (2010).** Les levures et levuroses .*Cahier de bio formation Biologie médicale*. N° 44. Pages 18-34.
- **Bekka, S et Benmaouche, C., (2017)** .Etude de l'activité anti-St philo-coccus aureus de souches de bactéries lactique isolées de quelque produit laitier fabriqué artisanalement. P26

C

- **Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., et Vignolo, G., (2008).** A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bio protective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79 :483–499.
- **Chabasse, D., Bouchara J-P, Contet-Audonneau, N., Basile, A-M. (2008).** Moisissures, dermatophytes et levures : du prélèvement au diagnostic. Édition Biomérieux SA Educations. 133 p
- **Chabasse, D., Guiguen, Cl., Contet-Audonnau, N. :** La candidose : Mycologie médicale. Les abrégés. Paris, Masson, 1999. 149-161p.
- **Collins, M., Samelis, J., Metaxopoulos, J., et Wallbanks, S., (1993).** Taxonomic studies of some *Leuconostoc* like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc* group of species. *Journal of Applied Bacteriology*. (75): 595-603.

D

- **Dellaglio, F., de Roissard, H., Torriani, S., Curk, M.C. et Janssens, D.(1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Rossard H. et Loquet F.M.). Lorica, Uriage. 1 : 25-116.
- **Dortu, C et Thonart, P., (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13 (1): 143-154.

E

- **Eklund, T., (1989).** Organic acids and esters. In: Gould, G.W. (Ed.), *Mécanisme of Action of Food Preservation Procedures*, Elsevier Applied Science, London, pp.161-200.

F

- **Federighi, M., (2005).** Bactériologie Alimentaire compendium d'hygiène des aliments. 2^{ème} Edition, Economica. 292 p.

G

- **Gyles, C.L., (2007).** Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*, 85 (13Suppl): 45-62.
- **Grimont, P.A.D., Grimont, F. et Bouvet, P.J.M., (2000).** *Salmonella*. In : Freney, J., Renaud, F., Hansen, W. et Bollet, C., *Précis de Bactériologie clinique*. Paris : Editions ESKA. P.1 137-1156.

.H

- **Heng, N.C.K., Wescombe, P.A., Burton, J.P., Jack, R.W. et Tagg J.R., (2007).** The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. Ed by: Riley M.A. et Chavan M.A: Bacteriocins: Ecology and Evolution, Eds. Springer Science Business Media, Heidelberg, 45-92.
- **Ho.N.T., Tuan, N., Deschamps, A. et Caubet, R., (2007).** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. International Workshop on Food Safety and Processing Technology. 134-142.

J

- **Jasniewski, J., (2008).** Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous-classe Ia, Thèse : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, Institut National Polytechnique de Lorraine, France, p 155.
- **Jean, L. A., Henry, D., François, D., Henri, M., (1992).** bactériologie clinique 2^{ème} édition, pp152, 507
- **Juillard, V., Spinnler, H.E., Desmazeaud, J., Boquien, C.V., (1987).** Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. Lait, 67(2) : 149-172

K

- **Khalid, N. M. et Marth, E.H., (1990).** Lactobacilli, their enzyme and role. In: Ripening and spoilage of cheese. Rev. Dairy Sci. 73: 158-167.
- **Klaenhammer (T.R.) (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie, 70, 337-349.
- **Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. et Reuter, G., (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 41: 103-125.

L

- **Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachioui, M., et Ouhssine, M., (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. vol. 2, n°144, pp. 237-250.
- **Landolo, J., Carol, W., Clark, Leslie, B., John, O., rdal, Z., (1965).** Repression of *Staphylococcus aureus* associative Culture. Vol.13, n°5, pp. 646-649
- **Leclerc, H., Gaillard, FL., ET Simonet, M., (1994).** Les grands groupes de bactéries. In : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. DOIN. Paris. 445p.
- **Le minor, L., & Popoff, M.Y., (1987).** Requite for an opinion. Designation of

Salmonella enteric sp. nov.nom. Rev, as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Bacteria., 37, 465-468.

- **Léonard, L., (2013).** Evaluation du potentiel bio protecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique, Thèse : Sciences de l'Alimentation, Université de Bourgogne, France, pp 8-18.
- **Levine, M.M., (1987).** Escherichia coli that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enter pathogenic, enter invasive, enter hemorrhagic, and enter adherent .The Journal of Infectious Diseases, 155(3), p.377-389.
- **Lindgren, S.E., et Dobrogosz, W.J., (1990).** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review. 87: 149-164.

M

- **Magusson, J. et Schnurer J., (2001).** *Lactobacillus coryniformis* compound. Appl. Environ. Microbiol. 67:1-5.
- **Mellata, M., Jeffrey, W.T. et Roy, C., (2009).** Full Sequence and Comparative Analysis of the Plasmid pAPEC-1 of Avian Pathogenic *E-coli* chi 7122 (O78:K80 : H9). PLoS One 4(1): 32- 42.
- **Muriana, P.M., Klaenhammer, T.R., (1987).** Conjugal transfer of plasmid encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol, P88

N

- **Nataro, J. P. et Kaper, J.B. (1998).** Diarrhea genic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology. Review, 11 : 142-201

O

- **Olasupo, N. A., Fitzgerald, D. J., Gasson, M. J. et Narbad, A., (2003).** Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enteric* serovar Typhimurium. Letters in Applied Microbiology, 37: 448-451

P

- **Piard, J.C. et Desmazeaud M., (1992).** Inhibitory factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances, 72 (2):113-142.
- **Popoff, M. Y. et Le Minor L., (2001).** Antigenic formulas of the *Salmonella* servars, 8th Edition, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institute Pasteur, Paris, p.22.

R

- **Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N. et Penna, A. L. B., (2012).** Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications .Food Engineering Reviews, 4:124-140.
- **Ripert, C., (2013).** Candidoses In : Mycologie médicale. Tec & doc-Lavoisier. Paris; 215-218 p.
- **Russo, T.A., et Johnson J. R., (2000).** Proposal for a new inclusive designation for extra intestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC. The Journal of Infectious Diseases, 181(5):1753-1754.

S

- **Schillingeret, F.K. Luke., (1989).** Antibacterial activity of Lactobacillus sake Isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol, v55, p1901–1906.
- **Stenutz, R., Weintraub, A., et Widmalm, G. (2006).** The structures of Escherichia olio-polysaccharide antigens .Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews, 30(3): 382-403.
- **Stiles, M. et Holzapfel W.H., (1997).** Review article Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of food microbiology. 36:1-29

T

- **Tabak, S., Bensoltane, A., (2012).** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophiles*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales, Nature & Technologie 6 :71-79.123.
- **Ten brink, B, M., MinekuS, J.M. B.M., Vander Vossen , R.J., Leer et J.H.J., HuisIN'T Veld., (1994),** Antimicrobial activity of Lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46.J..Appl. Bacteriol, 77: 140–148.

V

- **Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D. et Maguin, E., (2002).** Stress responses in lactic acid bacteria .Antonievan Leeuwenhoek, 82:187–216.

W

- **Wijaya, A., Neudeker,C., Holzapfel,W.etFranz,C.,(2006).** Influence of bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* BFE 1071 on *Lactobacillus* spp. In the rat gastrointestinal tract.Proceedings of Food Microbiology ,August 2006

,University of Bologna, Bologna, Italy, p124

Z

- **Zamfir, M, R., Caillewaert, P.C., Cornea, L., savu, L., Vatafu, ET L, Devuyst., (1999)**, Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *J.Appl .Microbiol*, 87:923–931.
- **Zagorec, M et Christians, S., (2013)**. Flore protectrice pour la conservation des aliments .QUAI. Paris.145p.

ANNEXES

Annexe 1

Les milieux de cultures

Milieux MRS: utilisé pour la culture des Lactobacilles (Liofilchim, 610192-500GR)..

Ingrédients	Poids/ml
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Peptone	10g
Glucose	20g
Tween80	1ml
Citrate de sodium	2g
Acétate de sodium	1g
Sulfate de manganèse	0.05g
Phosphate potassique	2g
Eau distillée	1000ml

pH7.2

Autoclavage 120°C pendant 20min

Gélose nutritif

Ingrédients	Quantité g/ml
Peptone	5g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
NaCl	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH7

Autoclavage à 121°C pendant 30min

Mueller Hinton (Mueller et Hinton)(Indicia. Version 01.2012).

Ingrédients	g/ml
Hydrolysate acide de caséine	17.5g
Extrait de viande	2g
amidon	1.5g
agar	17g
Eau distillée	1000ml

pH final à 25°C : 7,3 ±

0,1 Autoclavage à 121°C pendant

30min

Eau physiologique

Ingrédients	Poids/ml
NaCl	9g
Eau distillée	1000ml

Matériel utilisé

1. Produits chimiques et réactifs	2. Autre matériel
<ul style="list-style-type: none">• Violet de Gentienne;• Fushine;• Lugol;• Alcool;• L'huile à émersion pour l'observation microscopique;• Phénolphtaléine (1%) et la soude Dornic(N/9);• HCl (1N) et NaOH (1N) : pour l'ajustement du pH• Eau oxygénée 10V	<ul style="list-style-type: none">• Autoclave;• Bain marie;• Balance;• Vortex;• pH-mètre ;• Centrifugeuse;• Etuve(Mamert);• Four pasteur;• Microscope optique;• Réfrigérateur;• Pipette pasteur, micropipette, burette, bécher, anse de platine;• Boite Pétri, tubes à essais, flacons.