



Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie
Département de Biologie

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : Microbiologie Fondamentale

Par

BELKHIR ABDELKADER YAHIA
&
DOUBAL NAZIHA

Theme :

Etude de l'interaction antagoniste entre les bactéries lactiques Et quelques souches pathogènes

Soutenue le 09 juin 2024 devant le jury composé de :

Table with 4 columns: Position, Name, Title, Institution. Rows include: Président (Cheriguene Abderrahim, Université de Mostaganem), Encadreur (Chougrani Fadela, Université de Mostaganem), Examinateur (Bouabssa Foufa, Université de Mostaganem), Co-encadreur (Bouchibane Malika, Université de Médéa).

Thème réalisé au Laboratoire de microbiologie
Année Universitaire : 2023/2024

Remerciements

*Avant tout, on remercie Dieu tout puissant de nous avoir donné le courage,
la force*

La volonté et la patience pour réaliser ce travail.

*Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier infiniment et avec
gratitude notre encadrant Pr CHOUGRANI, qui a accepté de nous
encadrer et de diriger ce travail. Nous le remercions pour sa patience, son
aide très précieuse et ses corrections sérieuses.*

*En second lieu Nos vifs remerciements vont également aux membres du
jury Pr Cheriguene A, Pr Chougrani F, Dr Bouchibane M et Dr Bouabssa f
pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner
notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Nous souhaitant en suite d'adresser nos remerciements les plus sincères à
M^r DJILALI et M^{lle} HAFIDA responsables de laboratoire de microbiologie.*

*Nos remerciements s'étendent également à toute l'équipe pédagogique à
la formation « Microbiologie Fondamentale », département de biologie,
et à tous les professeurs de l'université de Mostaganem qui nous ont
enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la
poursuite de nos études.*

*On n'oublie pas nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur
patience.*

*Enfin, on remercie tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la
réalisation de ce travail.*

Dédicaces

*Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À:
A mes très chers parents qui ont toujours été derrière moi et qui m'ont donné
un magnifique model de labeur, de persévérance, de l'amour et de la force et
dont je suis fière et reconnaissante D'avoir comme parents.*

*Pour vous mes très chers et irremplaçables
A mes chères sœurs : Kheira, Nadjat et Kenza*

A mon cher frère : Abdeljalil

A tous mes amies.

*A mon binôme Yahya, il m'supporté tout le long de ce travail et à qui je
souhaite tout le bonheur du monde et de la réussite. A tous les gens de ma
promotion, enseignants et étudiants.*

A ceux qui sont chers et qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

Naziha

Dédicaces

*Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À :
A mes très chers parents qui ont toujours été derrière moi et qui m'ont donné
un magnifique model de labeur, de persévérance, de l'amour et de la force et
dont je suis fière et reconnaissante D'avoir comme parents.*

Pour vous mes très chers et irremplaçables

A mes chers frères : Tarek et Achraf

A tous mes amies.

*A mon binôme Naziha, elle m'supporté tout le long de ce travail et à qui je
souhaite tout le bonheur du monde et de la réussite. A tous les gens de ma
promotion, enseignants et étudiants.*

A ceux qui sont chers et qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail

YAHYA.

Table des matières

Liste des abréviations.....	<i>i</i>
Liste des tableaux.....	<i>ii</i>
Liste des figures.....	<i>iii</i>
Résumé.....	<i>iv</i>
Abstract.....	<i>v</i>
ملخص.....	<i>vi</i>
Introduction	1

Chapitre I Rappel bibliographique

PARTIE I: Les bactéries lactiques

I-Définition des bactéries lactiques et leurs caractéristiques principales	2
I-1 Les bactéries lactiques	2
I-2 Habitat et origine des bactéries lactiques	2
I-3 Caractéristiques principales des bactéries lactiques	3
I-4 Taxonomie des bactéries lactiques	4
4.1 Le genre lactobacillus	5
4.2 Le genre Enterococcus	7
I-5 Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques	7
5.1 Action des acides organiques	8
5.2 Le peroxyde d'hydrogène	8
5.3 Le dioxyde de carbone	8
5.4 Action de diacétyle	9
5.5 Action des bactériocines	9
II- Les probiotiques	13
II-1 Définition des probiotiques	13
II-2 Classement des probiotiques	14
II-3 Effets des probiotiques sur la santé humaine sur le tractus gastro-intestinal	15

PARTIE II: Les germes pathogènes

I- Bactéries pathogènes	16
I-1 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
I-2 <i>Escherichia coli</i>	17
I-3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
I-4 <i>Bacillus subtilis</i>	18
I-5 <i>Candida albicans</i>	19

PARTIE III : Interactions des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes

I-Définition	Error! Bookmark not defined.
II-Différents types d'interactions	21
II-1-Interactions directes	21
II-2-Interactions indirectes	22

Chapitre II Matériel et méthodes

I-1 Lieu et objectif	23
I-2 Matériel	23
II Méthodes	25

Chapitre III Résultats et discussions

I-Revivification et purification	30
II-Confirmation de la pureté des souches lactiques	30
III-Mise en évidence de l'effet antagoniste	33
III-1 Méthode de diffusion par puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983)	33
III-2 Antibiogramme des bactéries lactiques	36
Conclusion	38

Liste des abréviations

°C	Degrés Celsius
°D	Degrés Dornic
µL	Microlitre
DO	Densité Optique
FAO	L'organisation pour l'alimentation et agriculture
G+	Gramme positive
ILSL	Institut international des sciences de la vie
Ine	Bactériocine
Is	Inhibitory substance (substance inhibitrice)
KDa	Kilo Dalton – 1 Dalton = $1,67 \times 10^{-24}$ g
L	Lactococcus
LAB	Les bactéries lactiques
LB	Lactobacillus
MRS _b	Man, Rogosa et Sharpe (bouillon)
MRS _t	Man, Rogosa et Sharpe (tampon)
N	Nisine
NaCl	Chlorure de sodium
VRBL	Violet red bile lactose
S	Souches
OMS	L'organisation mondiale de la sante
pH	Potentiel D'hydrogène

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des bactéries lactiques	5
Tableau 2. Microorganismes employés comme probiotiques chez l'homme et chez les animaux d'élevage	14
Tableau 3. Origine et identification des souches des bactéries lactiques	23
Tableau 4. Caractéristiques des souches pathogènes (Guiraud, 1998)	24
Tableau 5. Critères morphologiques, la coloration Gram et le test de catalase des deux souches	31
Tableau 6. Critères morphologiques de la coloration de Gram des souches pathogènes	32
Tableau 7. Résultats obtenu par la méthode de Barefoot et Klaenhammer, 1983	33
Tableau 8. Antibiogramme des souches lactiques	36
Tableau 9. Les résultats de la mesure des densités optiques	52
Tableau 10. Diamètres des zones d'inhibition formés par les souches lactiques confrontés avec les bactéries pathogènes en mm	52

Liste des figures

Figure 1. Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques (Desmazeaud et DeRoissart, 1994)	4
Figure 2. Morphologie de <u>A</u> : <i>Lactobacillus casei</i> <u>B</u> : <i>Lactobacillus acidophilus</i>	6
Figure 3. Aspect de <i>S.aureus</i> en microscopie électronique	16
Figure 4. <i>E. coli</i> observés au microscope électronique (Ducluzeau, 2006)	17
Figure 5. <i>P.aeruginosa</i> en microscopie électronique	18
Figure 6. Microscopie électronique de <i>Bacillus subtilis</i>	19
Figure 7. <i>Candida albicans</i> au microscope 400x (Vouriot, 2007).	20
Figure 8. schéma de la méthode de diffusion en puits	28
Figure 9. Spectrophotomètre	28
Figure 10. Aspect des souches lactiques pures en milieu MRS solide	30
Figure 11. Observation microscopique des souches lactiques après la coloration de Gram (Gx100)	31
Figure 12. Observation microscopique des souches pathogènes après la coloration de Gram (Gx100)	32
Figure 13. Effet d'activité antagoniste des bactéries lactiques contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
Figure 14. Effet d'activité antagoniste des bactéries lactiques contre <i>E. Coli</i>	34
Figure 15. Effet d'activité antagoniste des bactéries lactiques contre <i>Staphylococcus aureus</i>	35
Figure 16. Effet d'activité antagoniste des bactéries lactiques contre <i>Bacillus subtilis</i>	35
Figure 17. Résultat d'antibiogramme des souches lactiques	36

Résumé

Les bactéries lactiques sont connues pour leur utilisation dans l'industrie alimentaire, notamment dans la production de produits laitiers fermentés.

Leur capacités à inhiber la croissance des germes pathogènes peut contribuer à la sécurité alimentaire en réduisant les risques de contamination par production de plusieurs facteurs inhibiteurs et tel est l'objectif de ce travail qui consiste à rechercher le pouvoir antagoniste de six souches lactiques qui sont trois *Lactobacillus plantarum* et deux souches de *Lactobacillus fermentum* et une souche de *Enterococcus faecium* après les avoir revivifié et confirmé leur pureté et leur identité par des tests morphologiques et biochimiques vis-à-vis les bactéries pathogènes et d'altération.

La méthode de **Barefoot et al, 1983** utilisée dans cette recherche nous a montré que ces bactéries lactiques exercent un effet inhibiteur sur les bactéries pathogènes avec des diamètres de zones d'inhibition différents d'une bactérie à l'autre.

En effet, les souches lactiques exercent un effet fortement inhibiteur sur la croissance des bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) avec des diamètres élevés compris entre 5mm et 10mm et un effet modéré « selon les souches » vis-à-vis des espèces Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) avec des diamètres de 4mm, 6mm et de 7mm, 9mm respectivement et pour *E. coli* ATCC 25922, le diamètre n'est pas déterminé.

La mesure de la densité optique des bactéries nuisibles montre

Qu'après une croissance rapide, le nombre de bactéries diminue rapidement après avoir ajouté le surnageant de la bactérie lactique qui contient au moins une bactériocine.

L'étude a révélé que les bactéries lactiques ont l'effet le plus sensible sur *Pseudomonas aeruginosa*. La sensibilité des bactéries lactiques a été testée en utilisant la méthode de diffusion des disques antibiotiques. Les résultats ont montré que l'effet antibactérien peut varier en fonction des caractéristiques des bactéries lactiques. ; les bactéries gram-positives sont plus résistantes que celles gram-négatives, et le diamètre des zones d'inhibition varie en fonction de l'antibiotique. Les différences de résistance et de sensibilité peuvent être attribuées à la capacité, à la concentration et au mécanisme d'action des bactéries.

Mots-clés :

Lactobacillus plantarum , *Lactobacillus fermentum* , *Enterococcus faecium* , bactéries lactiques , bactéries pathogènes, bactériocine, zones d'inhibition, antagonisme , *Staphylococcus aureus* , *Pseudomonas aeruginosa* , *E. coli* .

Abstract

Milk bacteria are known for their use in the food industry, in the production of fermented dairy products their ability to inhibit the growth of pathogenic germs may contribute to food security by reducing the risk of contamination by the production of multiple inhibitors.

The objective of this work is to investigate the antagonistic power of six dairy strains, which are *Lactobacillus plantarum* and two strains of *Lactobacillus fermentum* and one strain of *Enterococcus faecium* after they have revived and confirmed their purity and identity as morphological and biochemical against pathogenic and alteration bacteria. The Barefoot et al method, 1983 used in this research, showed that these lactic bacteria exert an inhibitory effect on pathogenic bacteria with different inhibition diameters from one bacterium to the other.

In fact, milk strains have a strong inhibitory effect on the growth of bacteria gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) with high diameters between 5 mm et 10 mm and a moderate "stam-specific" effect on Gram-negative species (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) with diameter 4 mm, 6 mm and 7 mm,9 mm respectively and for *E. coli* ATSC25922, the diameter is not determined. The measurement of the optical density of harmful bacteria shows that after rapid growth, the number of bacteria decreases rapidly after adding the milk bacterial overflow that contained less than one bacteriocine.

The study found that lactic acid bacteria have the most sensitive effect on *Pseudomonas aeruginosa*. The sensitivity of lactic acid bacteria was tested using the antibiotic disk diffusion method. The results showed that the antibacterial effect may vary depending on the characteristics of lactic acid bacteria gram-positive bacteria are more resistant than gram-negative ones, and the diameter of the inhibition zones varies depending on the antibiotic. Differences in resistance and susceptibility can be attributed to the capacity, concentration and mechanism of action of the bacteria.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium*, lactic acid bacteria, pathogenic bacteria, bacteriocin, zones of inhibition, antagonism, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*.

ملخص

تشتهر بكتيريا حمض اللاكتيك باستخدامها في صناعة الأغذية، لا سيما في إنتاج منتجات الألبان المخمرة. إن قدرتها على تثبيط نمو الجراثيم المسببة للأمراض يمكن أن تساهم في سلامة الأغذية عن طريق تقليل مخاطر التلوث من خلال إنتاج العديد من العوامل المثبطة.

هذا هو الهدف من هذا العمل، والذي يتمثل في دراسة القوة المضادة لستة سلالات لبنية وهي ثلاث سلالات من بكتيريا اللاكتيك وهي سلالة *Lactobacillus plantarum* وسلالتان من سلالة *Lactobacillus fermentum* وسلالة واحدة من سلالة *Enterococcus faecium*، بعد إحيائها والتأكد من نقائها وهويتها عن طريق الاختبارات المورفولوجية والكيميائية الحيوية ضد البكتيريا المسببة للأمراض والبكتيريا المفسدة. أظهرت لنا طريقة (Barefoot et al، 1983) المستخدمة في هذا البحث أن هذه البكتيريا اللبنة تمارس تأثيراً مثبتاً على البكتيريا المسببة للأمراض مع اختلاف أقطار مناطق التثبيط من بكتيريا إلى أخرى. في الواقع، تمارس السلالات اللبنة تأثيراً مثبتاً قوياً على نمو البكتيريا موجبة الجرام *Staphylococcus aureus* بأقطار عالية تتراوح بين 5 مم و10 مم وتأثير معتدل "حسب السلالة" على الأنواع سالبة جرام *Pseudomonas aeruginosa* بأقطار 4 مم، 6 مم و7 مم، 9 مم على التوالي وبالنسبة لبكتيريا *Escherichia coli*، لم يتم تحديد القطر. يُظهر قياس الكثافة الضوئية للبكتيريا الضارة ما يلي بعد النمو السريع، انخفض عدد البكتيريا بسرعة بعد إضافة المادة الطافية من بكتيريا حمض اللاكتيك التي تحتوي على بكتيريا واحدة على الأقل من مركب البكتريوسين

وجدت الدراسة أن بكتيريا حمض اللاكتيك لها التأثير الأكثر حساسية على *Pseudomonas aeruginosa* تم اختبار حساسية بكتيريا حمض اللاكتيك باستخدام طريقة نشر قرص المضاد الحيوي. وأظهرت النتائج أن التأثير المضاد للبكتيريا قد يختلف باختلاف خصائص بكتيريا حمض اللاكتيك. ; البكتيريا إيجابية الجرام أكثر مقاومة من البكتيريا سالبة الجرام، ويختلف قطر مناطق التثبيط حسب المضاد الحيوي. يمكن أن تعزى الاختلافات في المقاومة والحساسية إلى قدرة البكتيريا وتركيزها وآلية عملها.

الكلمات المفتاحية:

بكتيريا حمض اللاكتيك. مناطق التثبيط. البكتيريا المسببة للأمراض. البكتريوسين.

Enterococcus faecium, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum,

Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, E.coli

Introduction

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie, elles peuvent tenir parmi les plus d'importants groupes de microorganismes utilisés dans les fermentations alimentaires. La propriété des bactéries lactiques à produire des composés antagonistes tels que les acides organiques, qui font baisser le pH dans le milieu, et par la synthèse de bactériocines qui renforce la conservation est reconnue depuis très longtemps **(Bekhouche et Boulahrouf, 2005)**.

Par cette capacité, l'utilisation des bactéries lactiques permet de satisfaire les besoins de point de vue sanitaire en industrie alimentaire, et permet d'inhiber la prolifération des microorganismes pathogènes et ainsi d'assurer une bonne conservation des aliments **(Paul Ross et al, 2002)**. En raison de leurs bienfaits pour la santé, certaines bactéries lactiques sont largement utilisées comme probiotique comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* **(Bougeurra, 2021)**.

Les probiotiques sont donc définis comme des microorganismes vivants conférant des bienfaits pour la santé aux hôtes et certaines espèces de bactéries lactiques **(Lallali et al, 2018)**. Les souches de probiotiques introduites dans l'alimentation sous forme de produits lactés fermentés ou suppléments alimentaires (dans les produits non-fermentés) et qui vont s'implanter dans le tube digestif, peuvent interagir avec la flore intestinale **(Bechachha et al, 2020)**.

Les bactériocines sont des substances protéiques antimicrobiennes qui ont un large spectre d'inhibition incluant des micro-organismes d'altération et pathogènes. Ceci a conduit les chercheurs à s'intéresser à ces molécules et à leur éventuelle application dans le domaine de l'agro-alimentaire comme bio-conservateurs et en médecine humaine et vétérinaire comme de nouveaux agents antimicrobiens, ces antimicrobiens ont la capacité de s'attaquer de manière sélective aux bactéries pathogènes ou altérantes.

Les bactéries pathogènes sont la cause de différentes maladies et intoxications, c'est pourquoi les antibiotiques ont été employés afin de les éliminer. Cela a entraîné l'apparition du phénomène d'antibiorésistance qui met en péril la santé publique. Actuellement, les recherches se concentrent sur la recherche de substances naturelles, notamment les bactériocines des bactéries lactiques, afin de résoudre ce problème.

Cette étude vise à étudier l'activité antimicrobienne des souches lactiques envers les bactéries pathogènes en procédant selon les étapes suivantes :

La première partie consiste à revivifier et repiquer les bactéries lactiques et les bactéries

pathogènes dans leurs milieux appropriés.

Dans la seconde partie, il est prévu de réaliser des analyses physiologiques et biochimiques sur les bactéries

Enfin, nous examinerons l'effet antimicrobien des souches lactiques sur les bactéries pathogènes.

Chapitre I

Rappel bibliographique

Partie I

Les bactéries lactiques

I- Définition des bactéries lactiques et leurs caractéristiques principales

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation des aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de levains naturels

1. Les bactéries lactiques :

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen (**1919**) au début du XX^e siècle, les bactéries lactiques (LAB) constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique.

Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (requièrent des molécules organiques complexes comme source énergétique) (**De Roissart, 1986**); elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. La fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétéro lactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂...etc.) (**Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al., 2005**).

Elles sont Gram positif généralement immobiles a-sporulées catalase négative oxydase négative généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Dellaglio et al, 1994 ; Hogg, 2005**).

2. Habitat et origine des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (**Hassan et Frank, 2001**).

3. Caractéristiques principales des bactéries lactiques :

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen (1919) et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (Novel G., 1993).

Les bactéries lactiques colonisent de nombreux produits alimentaires tels que les produits laitiers, la viande, les végétaux, et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (Dortu&Thonart, 2009). Elles sont un groupe de bacilles ou coccobacilles ont pour principales caractéristiques d'être : à Gram positif, généralement immobiles, asporulés, anaérobies mais aërotolérantes, dépourvus de cytochromes-oxydase et de nitrate-réductase, ne possède pas le catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase) (Dellaglio et al, 1994 ; Carr et al, 2002 ; Axelsson, 2004).

Pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles) et de nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras (Prescott et al, 1999).

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme fermentaire. Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les bactéries lactiques sont dites :

- **Homofermentaires** : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose.
- **Hétérofermentaires facultatif** : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique ou de l'acide lactique et de l'acide acétique.
- **Hétérofermentaires strict** : elles produisent, en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂.

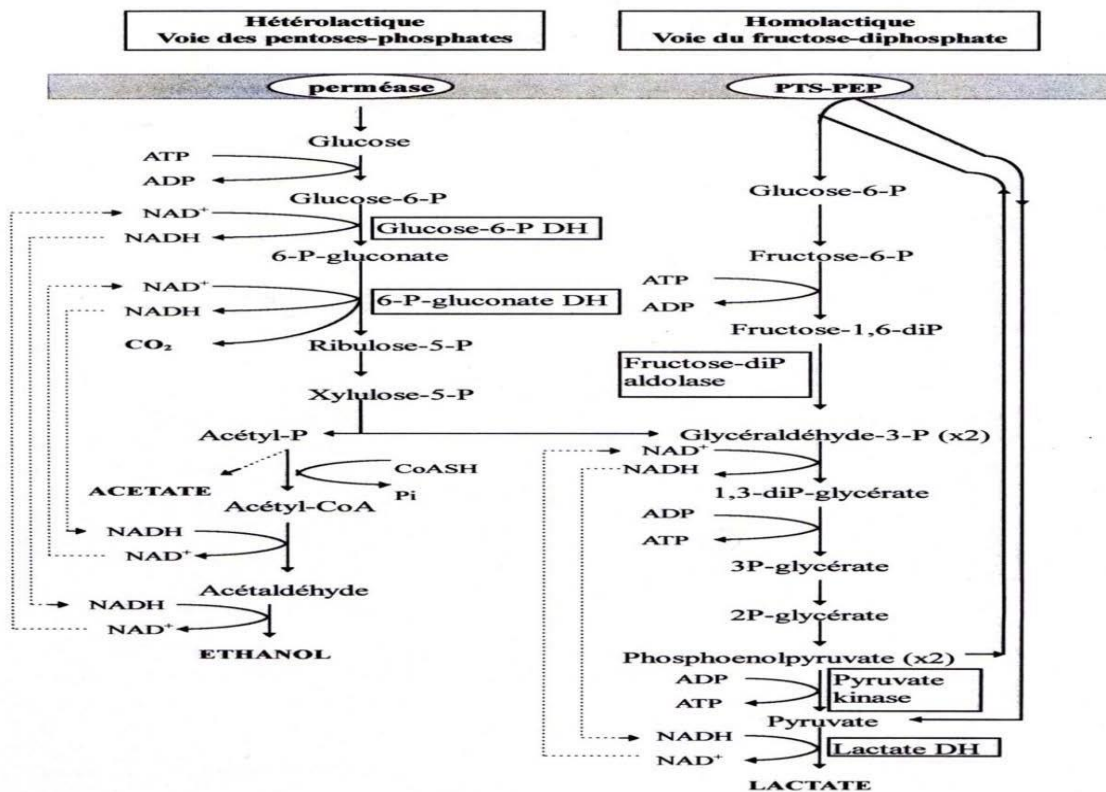


Figure 1. Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques (Desmazeaud et DeRoissart, 1994)

4. Taxonomie des bactéries lactiques :

Depuis la description du *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcuslactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot, 2008).

La classification des bactéries lactiques a été le souci de plusieurs chercheurs qui les ont finalement classés, en se basant sur les techniques moléculaires, comme le montre le tableau suivant :

Tableau 1.Classification des bactéries lactiques

Different genres	<i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Domaine	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Phylum	Fimicutes	Fimicutes	Fimicutes	Fimicutes
Classe	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Ordre	Lactobacillale	Lactobacillale	Lactobacillale	Lactobacillale
Famille	Streptococcaceae	Leuconostocaceae	Lactobacillaceae	Lactobacillaceae
Genre	Streptococcus	Leuconostoc	Pediococcus	Lactobacillus

Source : Novel(1993).

4.1 Le genre *lactobacillus* :

Famille I : *Lactococcaceae*

Genre I : *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans des nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés enchainés (figure2) immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C.

Les *lactobacilles* ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (**Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al, 1994**).

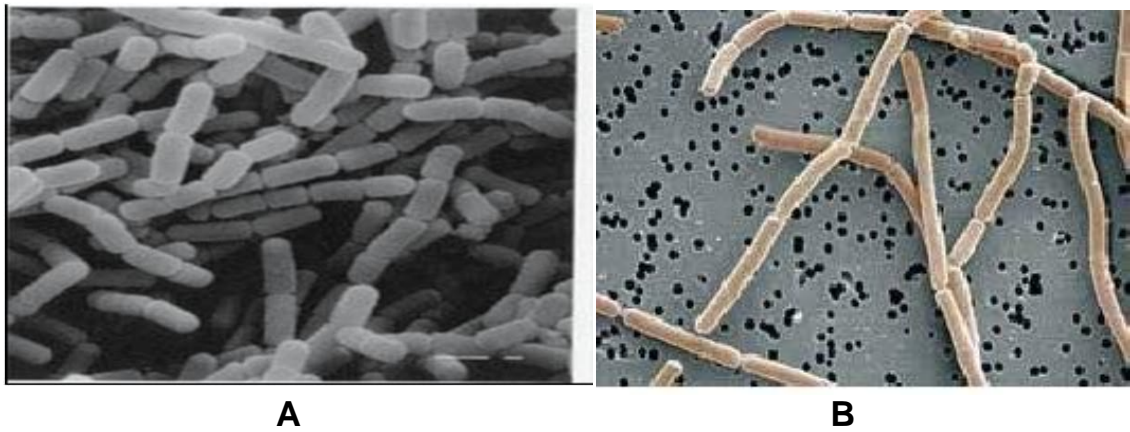


Figure 2. Morphologie de A : *Lactobacillus casei* , B : *Lactobacillus acidophilus*

(Examen en microscopie électronique x7000) **Bottazzi Vittori**

Originellement elles ont été classées en 03 groupes par (**Orla-Jensen, 1919**)

- *Thermobacterium*: homo-fermentaire et thermophile.
- *Streptobacterium* : homo-fermentaire et mésophile.
- *Bétabactrium*: hétéro-fermentaire soit mésophile soit thermophile.

Groupe1 (Lactobacilles homo-fermentaires obligatoires)

Ce sont des cellules longues droites souvent en palissades, incapables de fermenter les pentoses et le gluconate (**Bottazzi, 1988**), fermentent les hexoses et en produisent du lactate jusqu'à 85% à partir du glucose (**Novel, 1993**).

Les espèces les plus connues sont :

- *Lb.lactis*
- *Lb.acidophilus*
- *Lb.helveticus*

Et peuvent produire jusqu'à 18g/l d'acide lactique.

Groupe 2 (groupe hétérogène des lactobacilles homo- fermentaires facultatifs)

Se présentent comme étant des cellules courtes, souvent arrangées en filaments (**Boutazzi, 1988**), fermentent les hexoses par la voie homo-fermentaires (parfois hétéro-fermentaire) et fermentent les pentoses et le gluconate par la voie hétéro- fermentaire et produisent peu d'acides lactiques 3 à13g/l. (**Kandler et Weiss, 1986**).

Les espèces les plus connues sont :

- *Lactobacillusplantarum*
- *Lb.casei*
- *Lb.rhamonosus*

Groupe 3 (groupe des Lactobacilles hétéro-fermentaires obligatoires)

Ce groupe renferme des espèces très diverses, les cellules bactériennes sont courtes droites et séparées (**Bouttazzi, 1988**), fermentent les hexoses en produisant de lactate, de l'acide acétique, de l'éthanol, du CO₂ et fermentent les pentoses en produisant de lactate et de l'acétate. (**Kandler et Weiss, 1986**).

Leur production est faible 5 g/l de lactate (**Novel, 1993**)

Les espèces les plus connues sont :

- *Lb.brevis*
- *Lb.renteri*
- *Lb.fermentum*

4.2 Le genre Enterococcus :

Enterococcus est un genre de streptocoques fécaux présentant une hémolyse de type α , β et dans le groupe sérologique D. Il s'agit de commensaux intestinaux. L'alimentation est principalement composée d'En. faecalis (anciennement Streptococcus faecalis) et de ses variétés En. durans et En. bovis. Les bactéries lactiques les plus controversées sont les Enterococcus. (**Franz et al, 2003**).

Selon Moreno et al. (2006), les entérocoques génèrent des bactériocines (**Sabia et al, 2003, Sabia et al, 2002**).

En outre, on a utilisé des préparations d'En. faecium (anciennement Sp. faecium) et d'En. faecalis comme probiotiques (**Ruiz-Moyano et al, 2008**).

Certaines sont résistantes aux antibiotiques et transmettent ces caractéristiques en utilisant des éléments génétiques mobiles.

5. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques :

On reconnaît depuis longtemps aux bactéries lactiques la propriété de produire des substances antibactériennes leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes.

L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due aux métabolites excrétés : l'acide lactique et autres acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl, reutéline et les bactériocines (**Leveau et al, 1991 ; Klaenhammer et al, 1994 ; De Vuyst et Leroy, 2007**).

5.1 Action des acides organiques

Dans les produits fermentés la baisse du pH dépend de la matière première fermentée et des souches utilisées (plus ou moins acidifiantes). Il est plus souvent entre 4 et 4,5 dans le cas des yogourts 4,8 à 5,3 dans le cas des saucissons c'est dire des valeurs inférieures aux valeurs limites de développement de la plupart des flores d'altération et de la flore pathogène (**Sutra et al, 1998**).

L'effet inhibiteur spécifique des acides organiques est généralement attribué à leur forme non dissociée. Cette forme pénètre librement dans la cellule où elle s'ionise, ce qui provoque un abaissement du pH interne et une inhibition de la flore acido-sensible telle que les *Pseudomonas* et un blocage de certains mécanismes de transport (**Van Den Berg et al, 1995**).

5.2 Le peroxyde d'hydrogène

L'intervention du peroxyde d'hydrogène dans les phénomènes d'inhibition par les bactéries lactiques a été établie. En 1951 Wheeler et al, mettent en évidence l'inhibition de *Staphylococcus aureus* par *Lactobacillus lactis* et l'attribuent à une « lactobacilline ». Dès 1952 ils montrent que l'agent inhibiteur est en fait le peroxyde d'hydrogène produit par le *lactobacille* (**Mathot et al, 1996**).

Les bactéries lactiques sont catalase négatives et certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) essentiellement par le métabolisme aérobie ou en micro-aérobiose des glucides. Le peroxyde d'hydrogène est, depuis longtemps, reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celle des *lactobacilles*. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (**Zalan et al, 2005**).

5.3 Le dioxyde de carbone

Celui-ci est formé pendant la fermentation hétéro-lactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité.

Ainsi le CO₂ peut effectivement inhiber la croissance de nombreux germes d'altération et essentiellement les germes psychrotrophes à Gram négatif (**Ammor et al, 2006**).

5.4 Action de diacétyle

Le diacétyle produit par de nombreuses bactéries lactiques est un inhibiteur actif contre de nombreux microorganismes. L'action inhibitrice est accrue en milieu acide, les bactéries Gram négatives sont plus sensibles au diacétyle que les Gram positives, les premières sont inhibées à la concentration de 200g/l et les dernières au 300g/l (**Hugenholtz et Starrenburg, 1992**).

5.5 Action des bactériocines

a) Définition :

Une bactériocine est une substance de nature protéique possédant une activité antimicrobienne et qui peut être produite aussi bien par des bactéries à gram positif que par des bactéries à gram négatif.

Elle est considérée comme étant un produit extracellulaire primaire, synthétisé par les bactéries par voie ribosomale et peut avoir une activité bactéricide à spectre étroit incluant les bactéries de la même espèce ou du même groupe à l'exception de la bactérie productrice qui possède un mécanisme de protection spécifique (**Aymerich et al, 2000 ; Ammor et al, 2006**).

La nature protéique de cette substance a été identifiée par Hirsch en 1951 qui l'appelle nisine ; « n » : désigne les *straptocoques* de groupe N selon la classification de Lancefield (1993), « is » : est l'abréviation d'inhibitoire substances et « ine » désigne une bactériocine (**DeVuyst et Vandamme, 1993**).

Le spectre d'action des bactériocines se définit comme étant la diversité des bactéries sensibles à l'action bactériostatique ou bactéricide du peptide. On a d'abord attribué aux bactériocines un spectre d'activité limité aux bactéries taxinomiquement proches de la bactérie productrice (**Tagg et al, 1976**).

Certaines bactériocines possèdent un large spectre d'activité qui inclut des bactéries éloignées au point de vue phylogénétique

b) Classement des bactériocines

Bradley (1967) a classé les bactériocines selon leur poids en deux groupes :

- **Bactériocines de faible poids moléculaire** : non sédimentables, résistantes à la trypsine et thermostables.
- **Bactériocines de haut poids moléculaire** : sédimentables, résistantes à la trypsine, thermolabile, visibles au microscope électronique et ressemblent aux queues de phages.

Les bactériocines ont été divisées en quatre classes (**Klaenhammer, 1993**), cependant aucune bactériocine de *L.lactis* n'appartient aux classes III et IV.

➤ **Classe I « les antibiotiques »**

Qui sont de petits peptides hydrophobes (<5KDa) comprenant les acides aminés inhabituels suivants : la lanthionine, la β méthyllanthionine et des résidus déshydratés (la déhydroalanine et déhydrobutyrine) liés par des ponts soufrés intra chaîne, sont synthétisées par plusieurs genres microbiens Gram positif (*staphylocoques*, *bacillus*, *lactococcus* ...) (Cleveland et al, 2001), dans le cas des bactéries lactiques l'exemple type est la nisine produite par *lactococcus lactis* qui a une action bactéricide contre de nombreuses bactéries à gram positif mais n'agit pas sur les bactéries à gram négatif.

➤ **Classe II « bactériocines ne possédant pas d'acides aminés modifiés »**

Comporte des bactériocines constituées de peptides de faible poids moléculaire, généralement inférieur à 15 KDa et thermostable (entre 30 min à 100°C et 15min à 121°C), à spectre étroit où leur activité est dirigée contre les bactéries phylogénétiquement différentes, parmi les bactériocines les plus étudiées dans cette classe la diplococcine qui est produite par plusieurs souches de *lactococcus lactis* ssp. cremoris, la lactococcine A, la lactocine 27, la lactacine B et F, (**Davay et Richardson, 1981**).

➤ **Classe III** est représentée par des bactériocines de haut poids moléculaire (plus de 30KDa), sensibles à la chaleur.

➤ **Classe IV** comporte les bactériocines composées d'une partie non protéique nécessaire à l'activité inhibitrice (sucre ou lipide) cette classe a été ajoutée suite à l'observation de la perte de l'activité de certaines bactériocines après leur incubation en présence d'enzymes dégradant les sucres et les lipides (Jiménez Diaz et al, 1993) mais son existence reste controversée (**Nes et al, 1996**).

c) Caractéristiques des bactériocines :

- **Caractères biochimiques** : vue leur nature protéinique ces substances présentent une sensibilité aux enzymes protéolytiques quel que soit leur origine : pan créatique (α chymotrypsine, trypsine) ou gastrique (pepsine) (Piard et Desmazeaud, 1992).
- **Caractères physiques** : en général les bactériocines de faible poids moléculaire sont très thermostables, à l'opposé de celles qui sont à poids moléculaire élevé (sensibles aux traitements thermiques) (Alves et al, 2006 ; Albano et al, 2007).
- **Caractères chimiques** : Ces molécules sont stables dans les milieux acides et neutres, par contre elles perdent leur activité en milieu basique, c'est le cas de la nisine qui est inactivée à 80% à pH 10 (Belliard et al, 1996). De même, la lactas trypsine qui est stable à pH 4,6 – 5 et devient réversiblement inactivée à pH égal ou supérieur à 6 (Piard et Desmazeaud, 1992 ; Kostinek et al ,2007), cependant Lee et Paik, (2001) rapportent que l'activité de la bactériocine, issue d'un *streptocoque* lactique mésophile, n'est pas affectée par une variation du pH allant de 2 à 11.
- **Caractères antigéniques** : certaines bactériocines peuvent présenter des propriétés antigéniques qui sont en rapport avec leur poids moléculaire élevé et le niveau de complexité structurale.
- **Caractères génétiques** : la synthèse des bactériocines par les *lactocoques* est régie par des facteurs dits « facteurs bactériocinogènes » qui sont portés soit par des chromosomes, soit par des éléments extrachromosomiques telsque les plasmides (Barefoot et Klaenhammer, 1984 ; Larpent ,2000).

En parallèle à la production de bactériocine, les bactéries synthétisent une protéine dite « d'immunité » qui leur permet de contrôler l'action du composé antagoniste l'exemple est celui des gènes NISI et nisFEG qui sont impliqués dans l'immunité cellulaire à la nisine.

En général, les facteurs bactériocinogènes et les protéines d'immunité sont portés par le même gène et la transmission des facteurs bactériocinogènes se fait soit normalement par voie héréditaire ou par transduction ou alors après une manipulation génétique.

En effet, grâce au génie génétique, des souches capables de produire des taux élevés de bactériocines ou de ferments résistants aux inhibiteurs ont été produites (**Ray et al, 1992 ; Leloir et al, 2001**)

d) Mode d'action des bactériocines :

Selon Tagg et al (1976) le mode d'action des bactériocines comporte deux étapes :

1^{ère} étape : elle consiste en l'adsorption de la bactériocine sur les récepteurs spécifiques ou non spécifiques de la membrane des cellules cibles.

2^{ème} étape elle est une phase irréversible implique la modification pathologique de la cellule cible.

Chung et al (2000) ont confirmé que l'action des bactériocines se manifeste par la formation des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles et la perte des constituants cellulaires (ATP, K⁺) qui ont un rôle dans le maintien de l'équilibre des réserves énergétiques et du pH intracellulaire. Cette perte de l'intégrité induit la baisse de la synthèse des macromolécules (ADN, ARN, protéines).

Alors que Schved et al. (1994) assurent que les bactériocines peuvent avoir trois types d'effets :

- Effet bactériostatique : c'est-à-dire ralentissement ou arrêt de la croissance.
- Effet bactéricide : perte de la viabilité et lyse cellulaire telles que la nisine.
- Effet bactéricide sans lyse cellulaire.

II. Les probiotiques

1. Définition des probiotiques

A partir des travaux de Metchinkoff en 1908, l'idée des bactéries lactiques ingérées vivantes pouvaient avoir un effet bénéfique a été développée.

La notion de probiotique est née et a donné lieu à plusieurs définitions au cours du temps, il semble y avoir aujourd'hui un consensus sur la définition récemment publiée par un comité d'expert réunis par la FAO, l'OMS, et l'ILSI qui précisent que les probiotiques sont « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte au-delà de l'effet nutritionnel premier » (**Luquet et Corrieu, 2005**).

Depuis une dizaine d'années, un intérêt considérable s'est développé au tour de l'utilisation de cultures lactiques à effets bénéfiques pour la santé ou « probiotique » pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore alimentation animale.

2. Classement des probiotiques

Les probiotiques sont principalement représentés par quatre grands groupes classés dans le tableau 2 :

Tableau 2. Microorganismes employés comme probiotiques chez l'homme et chez les animaux d'élevage

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Bactéries lactiques ou pseudo lactiques	Bactéries non lactiques et moisissures
<i>Lb.bulgaricus</i>	<i>B.adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lb.brevis</i>	<i>B.animalis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lb.acidophilus</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichi acoli</i>
<i>Lb.casei</i>	<i>B.breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lb.cellobisus</i>	<i>B.infantis</i>	<i>Leuconostocmesenteroides</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Lb.cripatus</i>	<i>B.lactis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Lb.fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	
<i>Lb.gallinarum</i>	<i>B.thermophilus</i>		
<i>Lb.gasseri</i>			
<i>Lb.johnsonii</i>			
<i>Lb.lactis</i>			
<i>Lb.paracasei</i>			
<i>Lb.plantarum</i>			
<i>Lb.reuteri</i>			
<i>Lb.salivarius</i>			

Source: Dacosta, 2001

3. Effets des probiotiques sur la santé humaine sur le tractus gastro-intestinal

Protection contre les maladies inflammatoires du tube digestif :

Lorsque le tube digestif est sain, l'individu tolère sa propre microflore, phénomène perdu au cours des maladies inflammatoires du tube digestif.

Schultz et *al.* (1999) ; Dupont et *al.* (2000) ont mis en évidence une réduction des activités exoglycosidasiques (beta-galactosidase-acétyl-bêta-glucosaminidase, alpha mannosidase) dans les selles de patients ayant une maladie de Crohn active.

Cette diminution était corrélée à une baisse des *Bifidobacterium* dans la flore fécale. Ces travaux soulignent l'importance de la flore bifide en clinique et son interaction avec l'activité métabolique et le mucus.

Partie II

Les germes pathogènes

I- Bactéries pathogènes :

La principale cause de détérioration des aliments est la prolifération des microorganismes qui les contaminent. Ces microorganismes sont présents partout dans l'environnement sur les plantes, les animaux et les humains eux-mêmes. Certains de ces microorganismes provoquent seulement des altérations des produits alimentaires alors que d'autres, causent des maladies aux consommateurs.

Les bactéries pathogènes sont susceptibles d'entraîner des maladies, des toxi-infections alimentaires ou intoxication causé par la production de toxines des bactéries (**Thierry, 2008**).

1- *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* font partie de la famille des Staphylococcaceae.

Sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 μm .

Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Elles sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule, coagulasse et catalase positive. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré (**Patrick et al, 1988**)

Pouvoir pathogène

Staphylococcus aureus tient également à la production d'un grand nombre de substances diffusibles ou associées à la paroi (hémolysines α , β , γ et δ) (**Guiraud et al, 2004**). Elle est la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée (**Steven et al, 2004**).

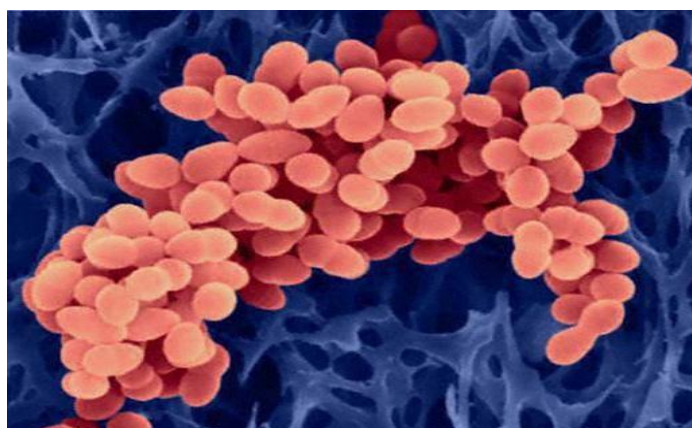


Figure 3. Aspect de *Staphylococcus aureus* en microscopie électrique

(<http://www.museevirtuel.ca>)

2- *Escherichia coli*

Escherichia coli fait partie de la famille des Enterobacteriaceae est un bacille à Gram négatif (Patrick et al, 1988), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm (Steven et al, 2004).

Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux.

Pouvoir pathogène

Ces souches sont responsables de la diarrhée des voyageurs et de syndromes diarrhéiques cholériformes épidémiques dans les pays du tiers-monde. Ce sont des souches capables d'excréter des toxines (toxines LT et buST) (Guiraud et al, 2004). Certaines souches sont virulentes capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives notamment les salmonelles (Federighi, 2005) ou urinaires ou bien encore des méningites néonatales. D'autres souches appartiennent à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies (Patrick et al, 1988).



Figure 4. *E. coli* observées au microscope électronique (Ducluzeau, 2006)

3- *Pseudomonas aeruginosa*

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* font partie de la famille des Pseudomonadaceae sont des bacilles à Gram négatif de 1.5 à 3 µm de long et à 0.8 µm de large, non sporulés généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires *Pseudomonas aeruginosa* est une espèce aérobie à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes (Palleroni, 2008).

Pouvoir pathogène

Cette espèce est responsable de 10% de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3^e rang après *E. coli* et *Staphylococcus aureus*, mais le premier rang pour les infections pulmonaires basses et le 3^{ème} rang pour les infections urinaires (Richard et Kiredjian, 1995).

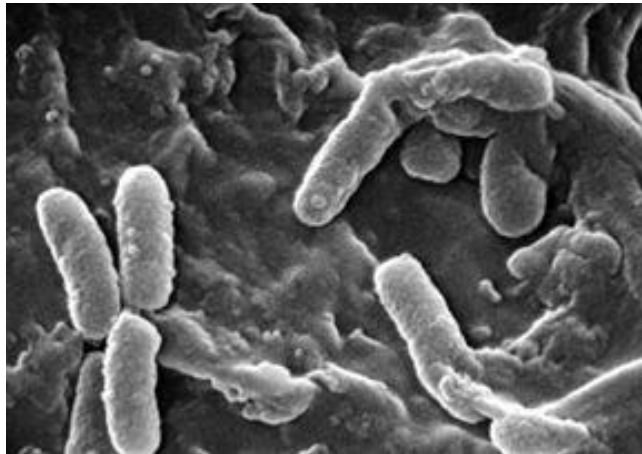


Figure 5. *Pseudomonas aeruginosa* en microscopie électrique

4- *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis fait partie de la famille des bacillaceae correspond à des bactéries en forme de bâtonnets (1,2 à 10 µm de long) chimio hétérotrophes généralement mobiles (présence de flagelles péritriches) habituellement présentes dans le sol à des températures modérées (5°C - 65°C). Ce sont des bactéries aérobies strictes ou facultatives.

Dans sa niche écologique, elle doit souvent faire face à des stress et des carences en nutriments, ce qui l'a conduite à développer diverses stratégies afin de survivre en conditions défavorables. Elle est notamment capable de former des spores qui lui permettent de survivre longtemps dans des conditions extrêmes telles que la dessiccation, la chaleur ou les radiations.

Au cours de l'évolution, sa compétence naturelle lui a également conféré une capacité d'adaptation par recombinaison.

A court terme la bactérie est aussi capable d'affronter des situations telles que les stress osmotiques, oxydatifs, acides ou les chocs thermiques, en particulier grâce à des régulateurs globaux de réponse au stress, les facteurs sigma (Loison, 2013).

Pouvoir pathogène

Malgré que *Bacillus subtilis* est une bactérie à faible potentiel pathogène, elle peut donner lieu à de redoutables infections dans certains cas ou encore être à l'origine d'une intoxication alimentaire d'où l'importance de l'application des recommandations en matière d'hygiène et stérilisation afin d'éviter ces risques (Bouhairi, 2017).



Figure 6.Microscopie électronique de *Bacillus subtilis* (Loison, 2013)

5- Candida albicans

Candida albicans fait partie de la famille des Saccharomycetaceae est une levure non capsulée, non pigmentée et aérobie. Cette levure diploïde dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes (Chu et al, 1993).

Au niveau morphologique, cette levure peut mesurer de 3 à 15µm, et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut trouver in vitro et in vivo et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire (Buffoet et al, 1984).

Pouvoir pathogène

Elle provoque des infections fongiques (candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique. Les candidoses sont une cause importante de mortalité chez les patients immunodéprimés comme les patients atteints du Sida, les patients cancéreux sous chimiothérapie ou après transplantation de moelle osseuse (Sheppard *et al*, 2004).



Figure 7. *Candida albicans* au microscope 400x (vouriot, 2007).

Partie III
***Interactions des bactéries
lactiques vis-à-vis des
germes pathogènes***

I-Définition :

L'évolution des conditions physico-chimiques et la disponibilité en nutriments sont des éléments importants pour le développement des micro-organismes. Ils peuvent ainsi générer des phénomènes d'interaction de différente nature. Tout au long du processus de fabrication, on observe une dynamique au sein des populations. Certains micro-organismes se multiplient activement, alors que d'autres tendent à disparaître (**Nissen et al, 2003**).

Lorsque deux populations différentes de micro-organismes partagent le même environnement, des interactions peuvent s'établir entre elles. Ces phénomènes sont relativement fréquents en œnologie en raison de la non-stérilité des milieux de fermentation (**Nissen et al, 2003**).

II- Différents types d'interactions :

Il existe deux types d'interactions : directe et indirecte.

II-1-Interactions directes :

Impliquent un contact entre deux micro-organismes et comprennent la prédation, le parasitisme, la symbiose et l'inhibition par contact direct entre les cellules ou « cell-cell contact mechanism » (**Nissen et al, 2003**).

Prédation et parasitisme :

Dans ce type de relation, l'une des espèces vit totalement au dépend de l'autre. La victime devient un substrat et est totalement digérée dans le cas de la prédation ou bien une partie de ses tissus est consommée comme dans le cas du parasitisme (**Nehem, 2008**).

Inhibition par contact direct entre les cellules :

Dans ce type d'interaction, une population de micro-organismes est inhibée par une autre et ceci par contact direct entre les cellules des deux populations lors de leur culture mixte. L'inhibition dans ce cas ne résulte ni d'une limitation en nutriments ni de la présence de métabolites extracellulaires inhibiteurs mais plutôt d'un contact direct avec les cellules de la population inhibitrice qui doit présenter une concentration élevée de cellules viables (**Nissen et al, 2003**).

II-2-Interactions indirectes :

Elles sont dues à des métabolites extracellulaires et comprennent le neutralisme,

Le mutualisme, le commensalisme, l'amensalisme, la compétition

(Bailey et Ollis, 1986 ; Nissen *et al.* 2003 ; Kleerebezem *et al.* 1997).

Mutualisme :

On distingue deux phénomènes : le mutualisme (symbiose) et le synergisme (protocoopération) durant lesquels chaque micro-organisme est stimulé par la présence de l'autre.

Dans le mutualisme, la présence de chaque micro-organisme est indispensable pour la survie de l'autre alors que dans la proto-coopération l'interaction n'est pas nécessaire à la survie des populations mais la présence des deux micro-organismes ensemble entraîne une amélioration de leur développement (Nehem, 2008).

Neutralisme :

La présence d'une population n'affecte pas l'autre (Nehem, 2008).

Commensalisme :

Le commensalisme est une interaction où un micro-organisme bénéficie de la présence d'un autre sans que ce dernier en tire profit (Sieuwerts *et al.*, 2008).

Compétition :

Dans le cas de la compétition, les deux populations se développent sur le même substrat et consomment toutes les deux un ou plusieurs nutriments communs nécessaires à leur croissance ce qui aura un effet négatif sur leur vitesse de croissance et celle dont la vitesse de croissance est la plus affectée sera la plus désavantagée (Nehem, 2008).

Antagonisme :

L'amensalisme est une interaction inter-espèces où la présence d'un ou de plusieurs micro-organismes a un effet inhibiteur sur le développement d'autres micro-organismes présents dans le même environnement, sans que le micro-organisme inhibiteur en tire le moindre profit. Certains métabolites tel que les acides carboxyliques, le lactate, le peroxyde d'hydrogène ou encore les bactériocines participent à ce phénomène (Caplice *et Fitzgerald*, 1999 ; Van deGuchte *et al.*, 2001 ; Sieuwerts *et al.*, 2008).

Les effets inhibiteurs agissent sur la croissance des micro-organismes pathogènes, indigènes ou inoculés (Sieuwerts *et al.*, 2008).

Chapitre II
Matériels et méthodes

I. Matériel

I.1. Lieu et objectif

Ce travail a été réalisé au laboratoire de recherche de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Mostaganem.

L'objectif de cette étude articule autour de :

- Etude de l'activité antagoniste vis à vis des bactéries pathogènes

I.2. Matériel

II.2.1 Matériel biologique

Lors de ce travail **07** souches de bactéries lactiques (Tableau 3) ont été utilisées pour étudier l'interaction entre les germes pathogènes et les bactéries lactiques qui ont été isolées, purifiées et identifiées par une technique moléculaire (Spectrométrie de masse MALDI-TOF MS) par D^r Bouchibane Malika (MAB à l'université de Médéa). **(Bouchibane et al., 2022) ; (Bouchibane et al., 2023).**

Tableau 3. Origine et identification des souches des bactéries lactiques

Code des souches	Origine	Région	Score d'identification MALDI-TOF MS	Identification
SL102	J'ben	Blida	2.18	<i>Lactobacillus plantarum</i>
SL105		Naâma	2.012	
SL106		Naâma	2.186	
SL104		Bechar	2.276	<i>Enterococcus faecium</i>
SL107	Zebda	Blida	2.859	<i>Lactobacillus Fermentum</i>
SL101		Naâma	2.384	<i>Lactobacillus Fermentum</i>

Bactéries pathogènes :

Tableau 4.caractéristiques des souches pathogènes (**Guiraud, 1998**)

LES SOUCHES	REFERENCES	CARACTERISTIQUES
<i>E. Coli</i>	ATCC 25922	Gram -
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Gram +
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Gram +
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Gram -
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Gram +

II. Méthodes

II-1 Revivification et purification des cultures des bactéries lactiques et les souches pathogènes :

Les souches lactiques étaient conservées dans du glycérol à -20°C, après décongélation la purification des souches a été effectuée par ensemencement en stries sur milieu MRS solide pour les bactéries lactiques et sur les milieux sélectifs pour chacune des souches pathogènes.

Les boîtes ont été incubées à 37° pendant 24h.

La vérification de l'identité des bactéries utilisées dans notre étude a été réalisée par des observations microscopiques, macroscopiques et test de catalase.

Ces colonies pures sont retenues pour la suite de l'étude.

II-2 Conservation à courte durée des souches

Elle a été réalisée par ensemencement des souches isolées sur gélose MRS inclinée en tubes à essais, les cultures pures sont conservées à + 4°C à l'obscurité et un repiquage est nécessaire toutes les quatre semaines (**Badis et al, 2003**).

II-3 Conservation à longue durée

Se fait par ensemencement des souches dans des eppendorfs contenant 30% glycérol + 70% MRS liquide et on les place dans le congélateur à -20°C (**Badis et al, 2003**).

II-4 Identification et confirmation des bactéries lactiques

L'identification a été établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : production d'enzymes, température de croissance, production de gaz carbonique, fermentation de divers sucres.

II-4-1 Tests morphologiques

A) L 'aspect macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS ou M17 solide et liquide ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies sur milieu MRS solide et le trouble dans le milieu liquide (**Badis et al, 2005**).

B) L 'aspect microscopique

Coloration de Gram :

Pendant une minute, on colore un frottis fixé à la chaleur avec du violet de cristal. Ensuite, on le rince rapidement à l'eau courante, on le traite pendant une minute avec une solution de lugol, puis on le rince à nouveau. Le frottis coloré est ensuite soumis à une étape de décoloration en l'appliquant à l'éthanol à 95%. L'étape critique consiste à maintenir la lame inclinée et à faire couler le solvant sur le frottis pendant seulement 2 à 3 secondes, jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Il est ensuite immédiatement rincé avec de l'eau courante. Les cellules gram- seront blanches à ce stade, tandis que les cellules gram+ seront violettes. Le frottis est ensuite soumis à une coloration à la fushine pendant 30 secondes afin de colorer les cellules gram-positives. Après un court rinçage, le frottis est séché. on l'examine à l'objectif à immersion (grossissement X1000) (Singleton, 1999).

Avec cette coloration double, les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge (**Delarras, 2007**).

II-4-2 Tests physiologiques et biochimiques :

Test catalase :

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O_2) (**Marchal et al, 1991**).

II-5-Interaction bactéries lactiques / bactéries pathogènes :

II-5-1-Préparation des prés cultures des bactéries tests (pathogènes) :

Les bactéries pathogènes sont cultivées dans 10 ml de bouillon BN à 37°C pendant 24h.

Un repiquage sur des boîtes de pétri dans les environnements spécifiques de chaque bactérie permet d'isoler :

Candida albicans présente sur la gélose sabouraud, *Staphylococcus aureus* dans milieu chapman, Exposition de *Pseudomonas aeruginosa* à la gélose au king a, *E. Coli* dans milieu VRBL, *Bacillus subtilis* dans la gelose nutritive.

Le tout est incubé à 37°C pendant 24h.

Après obtention de colonies pures, les bactéries pathogènes sont cultivées dans 10 ml de bouillon BN à 37°C pendant 18h à 24 h.

II-5-2-Mise en évidence de l'effet antagoniste :

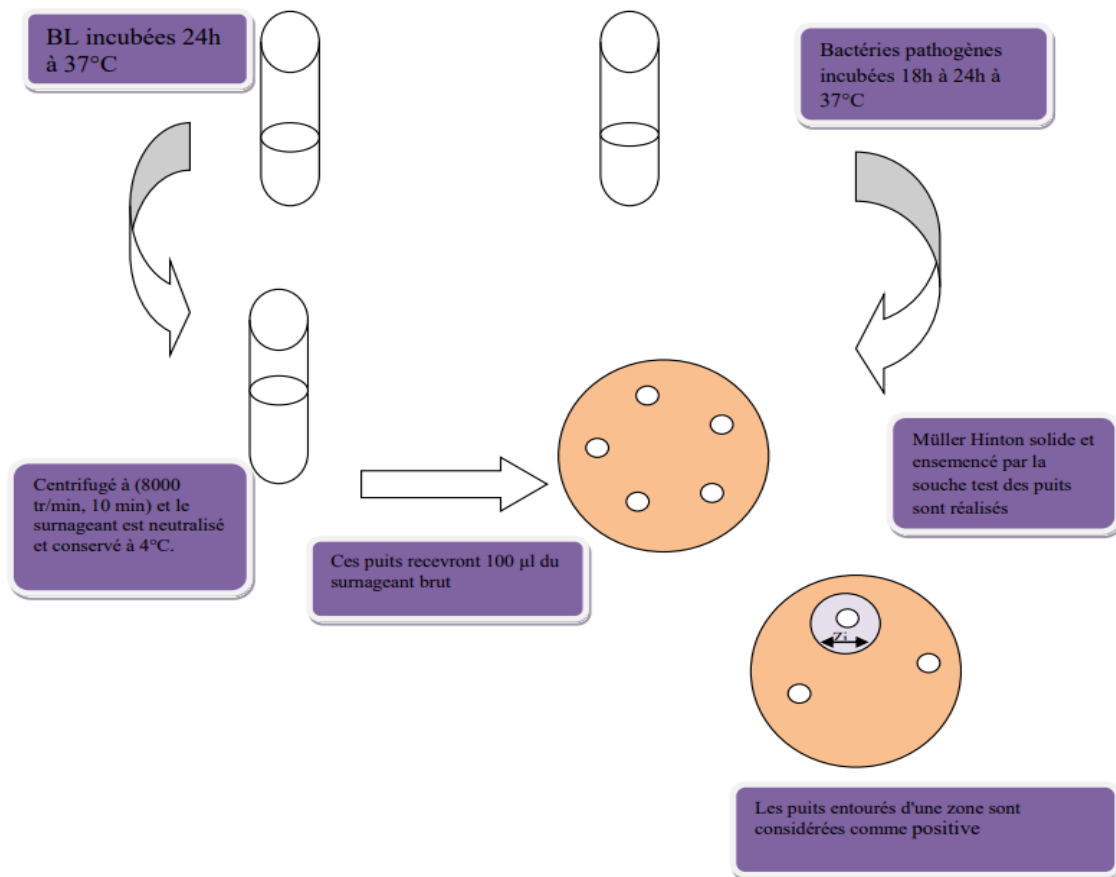
A) Méthode de diffusion par puits (Barefoot et Klaenhammer ,1983) :

Des colonies pures de bactéries lactiques sontensemencées dans des tubes à essai contenant du MRS ou M17 liquide et le tout est incubés à 37°C pendant 24h.

Cette méthode a été modifiée par plusieurs auteurs comme Puizani et al, 1992.

Cette méthode consiste à :

Les souches productrices de substances inhibitrices sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées à 37°C pendant 16 à 24h en anaérobiose, ce qui évite la formation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂);Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 tr/min, 10 min) et le surnageant est alors séparé du culot et filtré à l'aide d'un filtre millipore de 0.45 µm et neutralisé avec du NAOH (N1) afin d'avoir un pH de 6,8-7 et il est conservé à 4°C, Dans une boîte de Pétri contenant du Müller Hinton solide etensemencé par la souche test initialement préparée(DO =0,08à0,1correspondant à106UFT/ml à625nm)par écouvillonnage .On laisse les boites sécher à température ambiante pendant 30minutes, des puits sont ensuite réalisés avec une emporte -pièce ou une cloche de durham stérile; Ces puits recevront 100 µl du surnageant brut de la culture lactique à tester et les boites seront mises à 4°C pendant2heures pour permettre une bonne diffusion du surnageant. Les boites sont incubées pendant24h à37°C. (**Figure 8**)



Zi = diamètre de la zone d'inhibition obtenue – diamètre du puits (6mm)

Figure 8.schéma de la méthode de diffusion en puits

B) La densité optique

Chaque souche pathogène est ensemencée dans un tube contenant 5 ml de bouillon nutritif puis étuvées à 37°C pendant 24h. La densité optique est mesurée toutes les deux heures. À la quatrième heure, 1ml du surnageant neutralisé par NaOH à un pH de 6.8 à 7, est ajouté aux cultures et la mesure de la densité optique continue jusqu'à 12h. (VinodKumar et al, 2006). (Figure 9)



Figure 9.Spectrophotometre

C) Test de sensibilité aux antibiotiques

Pour tester la sensibilité des souches aux antibiotiques la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques a été utilisée, à partir de chaque culture d'une nuit ajustée à une DO convenable à chaque espèce. Un volume de 100 μ l a été étalé à l'aide d'un écouvillon sur la gélose MRS puis les disques suivants : Ampicilline (10 μ l), Érythromycine (15 μ l), Gentamicine (10 μ l) Tétracycline (30 μ l) et Céfazoline (30 μ l) ont été déposés à la surface de la gélose (chaque boîte reçoit 6 disques).

Les boîtes ont été conservées à 4°C pendant 30 min ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 72h.

La sensibilité a été révélée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition entourées chaque antibiotique. Les résultats ont été exprimés comme sensible ($S \geq 21$ mm), intermédiaire (I entre 16- 20 mm), et résistance ($R \leq 15$ mm) (Mulaw *et al*, 2010)

Chapitre III
Résultats et discussions

I- Revivification et purification

Après la revivification et purification de nos souches lactiques, on a obtenu des souches pures, les colonies sont d'un aspect (couleur, taille et forme) typique et homogènes.

II- Confirmation de la pureté des souches lactiques

Lors de cette étude nous avons confirmé la pureté de nos souches par les procédures phénotypique conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

II-1-Etude morphologique

➤ Critères macroscopiques :

L'observation macroscopique des cultures sur milieu MRS montre la présence des colonies présentant les caractéristiques suivantes :

Petites colonies et de couleur blanchâtre ou crème et translucide.



Figure 10.Aspect des souches lactiques pures en milieu MRS solide

➤ **Critères microscopiques**

L'observation au microscope optique nous a permis de déterminer la forme des cellules, leur disposition ainsi que le type de Gram, des bactéries lactiques et pathogènes.

➤ **Les bactéries lactiques**

Les résultats sont présentés dans le (Tableau 5)

Tableau 5. Critères morphologiques, la coloration Gram et le test de catalase des deux souches

Code de souche	Forme	Gram	Catalase
101	Bacille	+	-
102	Bâtonnet	+	-
104	Coques	+	-
105	Bâtonnet	+	-
106	Bâtonnet	+	-
107	Bacille	+	-

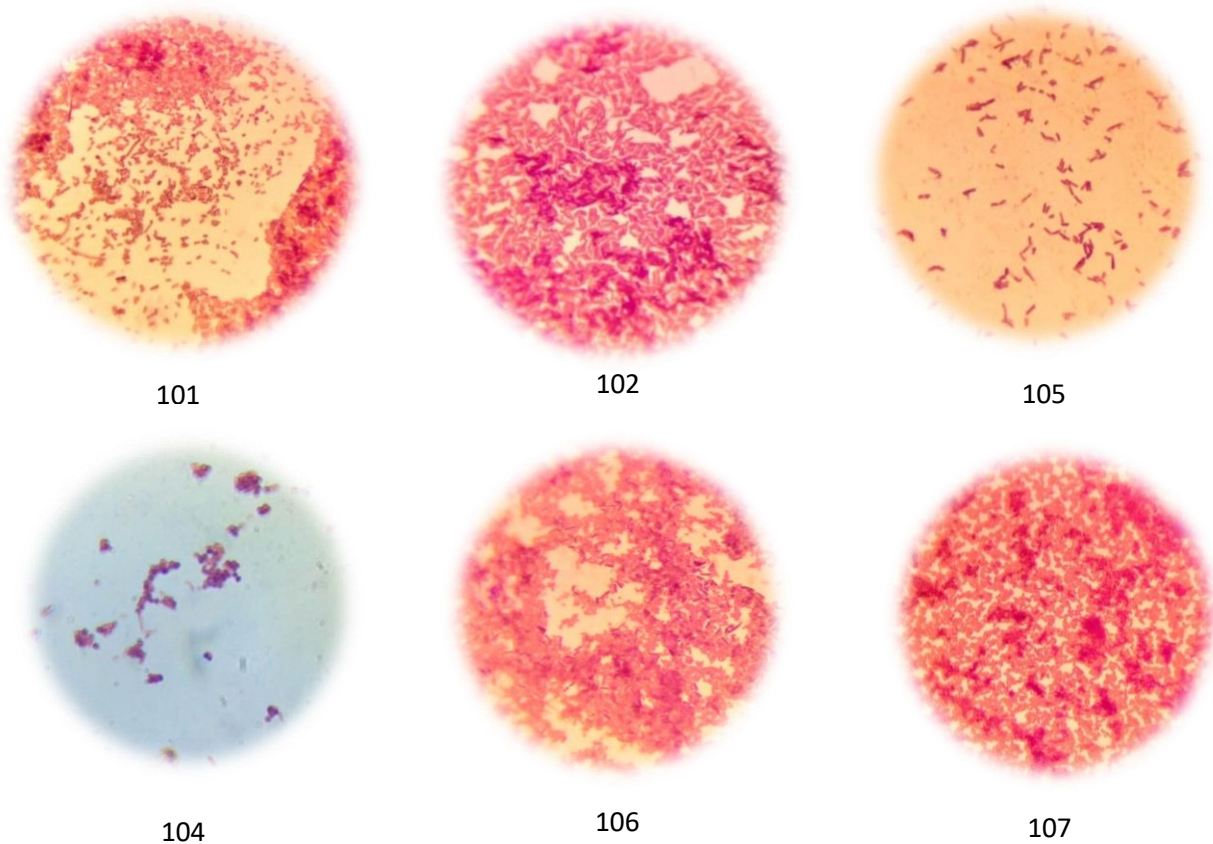


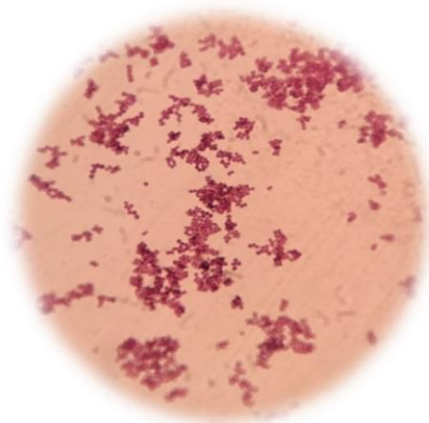
Figure 11. Observation microscopique des souches lactiques après la coloration de Gram (Gx100)

➤ **Souches pathogènes**

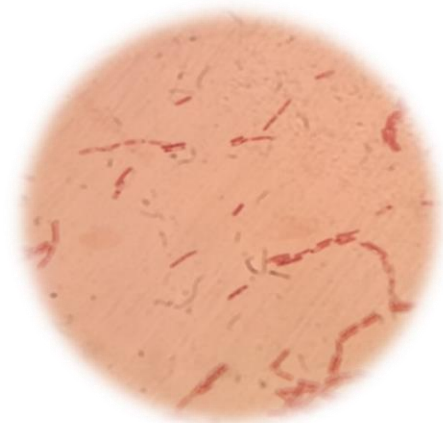
Les résultats sont représentés dans le tableau 06 :

Tableau 6. Critères morphologiques de la coloration de Gram des souches pathogènes

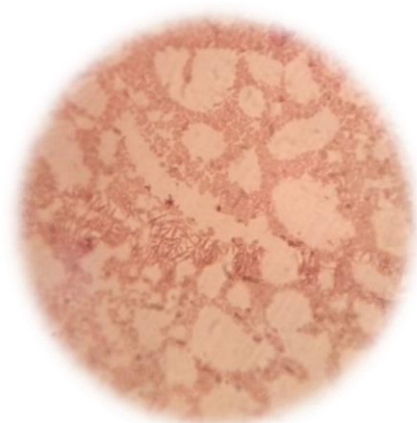
Souches	Morphologie	Gram	Catalase
<i>Staphaphylococcusaureus</i> ATCC 33862	Coques en amas	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Bacilles	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Bacilles	-	-
<i>E. Coli</i> ATCC 25922	Bacilles	-	-



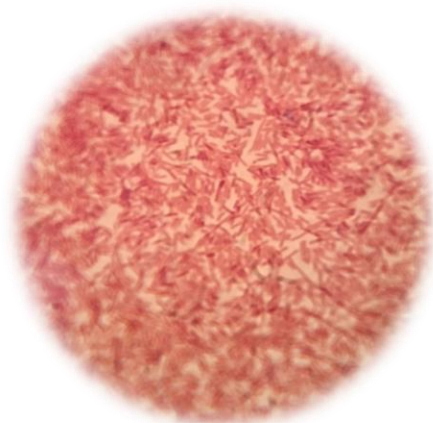
Staphaphylococcus aureus



Bacillus subtilis



Pseudomonas aeruginosa.



E. Coli

Figure 12. Observation microscopique des souches pathogènes après la coloration de Gram(Gx100)

III. Mise en évidence de l'effet antagoniste :

1 - Méthode de diffusion par puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983) :

Dans cette partie nous avons testé la capacité d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis à des bactéries pathogènes par contact directe, Cette méthode dite directe permet de mettre en évidence tous types d'inhibition, par production d'agents inhibiteurs et aussi celles qui sont dues à un contact cellulaire ou compétition vis-à-vis à des nutriments. Les résultats obtenus sont représentés dans tableau 07

Tableau 7.Résultats obtenu par la méthode de Barefoot et Klaenhammer, 1983

S. Lactique S. Pathogènes	<i>Lactobacillus Fermentum</i>	<i>Lactobacillus Plantarum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. Coli</i>	0mm	0mm	0mm
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	1mm	10mm	12mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	8mm	5mm	3mm
<i>Bacillus subtilis</i>	2mm	45mm	5mm

Les diamètres des halos d'inhibition sont exprimés en mm

Après avoir effectué l'ensemble des analyses sur l'effet des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes, nous avons constaté que :

Certaines bactéries pathogènes ont été inhibées par les souches lactiques testées. Les bactéries lactiques ont un effet inhibiteur plus élevé de 2 à 3 fois sur l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* que sur les bactéries de la souche pathogène *Staphylococcus aureus*.

Les bactéries de *Staphylococcus aureus* sont plus sensibles à l'effet inhibiteur des souches lactiques que les bactéries *E. Coli*.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Todorov et Dicks (2006) qui ont examiné l'impact des bactériocines des bactéries lactiques sur des bactéries pathogènes telles que *E. Coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Ils ont constaté que *Pseudomonas aeruginosa* était la plus sensible à l'effet inhibiteur des bactériocines par rapport à *E. Coli* et les bactéries de germes Salmonella.

L'inhibition des bactéries lactiques est due à la présence des agents inhibiteurs qui

correspond aux recherches de Vinod Kumar et *al* (2006)

La souche *Lactobacillus plantarum* produit des bactériocines qui ciblent toutes les bactéries pathogènes.

Les résultats obtenus ont révélé que la souche *Lactobacillus plantarum* a inhibé la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui suggère que l'inhibition n'est pas causée par l'acidité ni le peroxyde d'hydrogène, car la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est catalase positive.

Dans cette situation, il est possible que l'inhibition soit causée par une bactériocine (Ayed2011).

Les résultats obtenus pour la souche *E. Coli* ont démontré une inhibition faible.

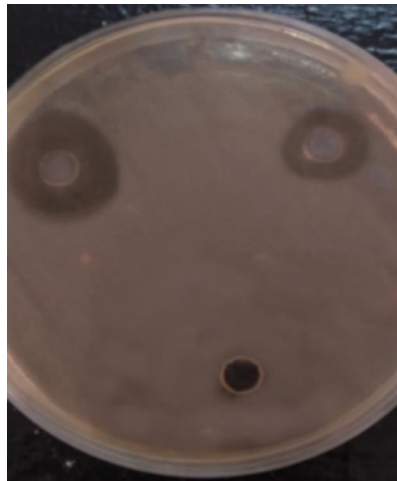


Figure 13. Effet d'activité antagoniste des bactéries lactique contre *Pseudomonas aeruginosa*

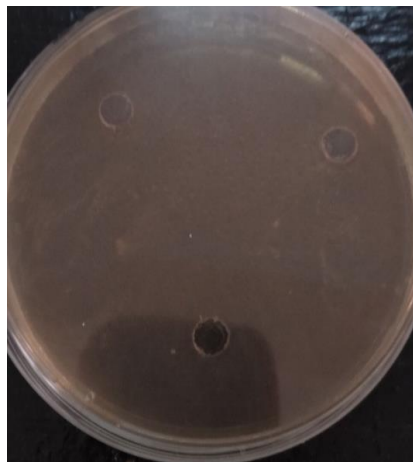


Figure 14. Effet d'activité antagoniste des bactéries lactique contre *E. Coli*

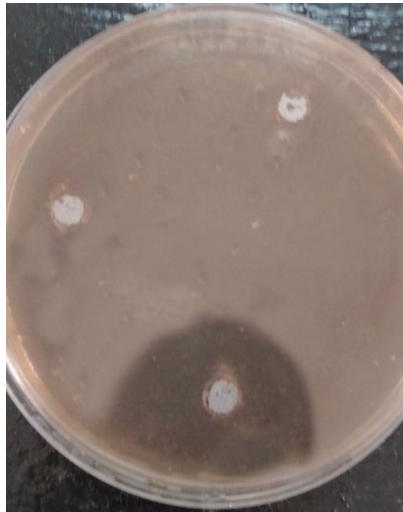


Figure 15. Effet d'activité antagoniste des bactéries lactique contre *Staphylococcus aureus*

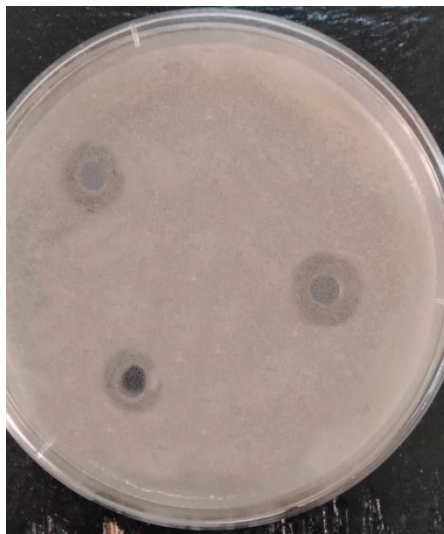


Figure 16. Effet d'activité antagoniste des bactéries lactique contre *Bacillus subtilis*

2 - Antibiogramme des bactéries lactiques :

L'antibiogramme a été effectué sur les deux souches appartenant à l'espèce des *Lactobacilles*, on a testé leur résistance vis-à-vis à 5 antibiotiques après une culture de 72 h. on a mesuré les diamètres des zones d'inhibition de croissance de la souche microbienne, les résultats sont présentés dans le tableau 8 et la figure 17 :

Tableau 8.antibiogramme des souches lactiques

Souches Antibiotiques	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Lactobacillus Fermentum</i>
Tétracycline (30µl)	S	S	S
Gentamicine (10µl)	S	S	S
Ampicilline (10 µl)	S	R	S
Erythromycine (15µl)	R	R	R
Céfazoline(30 µl)	S	R	S

R : Résistante
S : Sensible

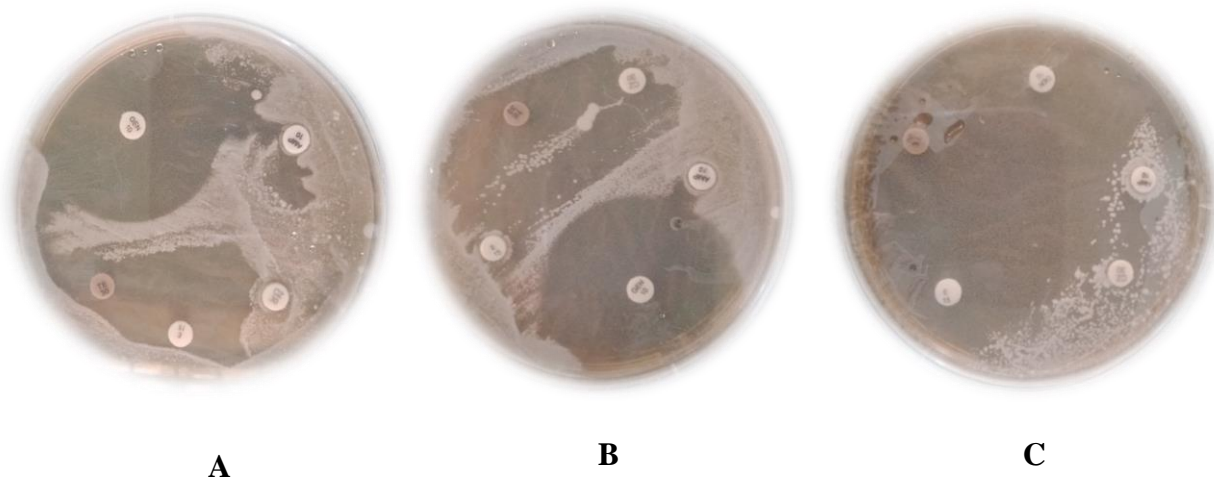


Figure 17.Résultat d'antibiogramme des souches lactiques

A : *Lactobacillus plantarum* **B** : *Enterococcus faecium* **C** : *Lactobacillus Fermentum*

Les souches ont montré une grande sensibilité vis-à-vis a quatre antibiotiques gentamicine (10µg), tétracycline (30µg), et l'ampicilline (10µg), De plus, on a constaté une sensibilité moyenne à la céfazoline (30 µg)

Les souches ont présenté une résistance à l'antibiotique érythromycine (15µg) entre 1 cm à 1,5 cm.

D'après les résultats de détermination de la nature de l'agent anti bactérien on a constaté que : les souches lactiques isolées (*Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus fermentum*) sont douées d'une activité antimicrobienne par production d'un agent inhibiteur.

Les résultats que nous avons obtenus sont similaires à ceux de Kasimin et al. (2020) qui ont rapporté que les souches de *Lactobacillus* isolées des produits laitiers présentent une résistance à l'Érythromycine.

Il a été observé qu'au sein de la même espèce, les souches ont montré une sensibilité et une résistance différentes.

Conclusion :

L'un des moyens de résoudre le problème de la résistance des bactéries pathogènes aux biomolécules pourrait être l'utilisation des bactériocines développées par les bactéries d'origine lactique.

Dans notre recherche, nous avons examiné comment nos six souches lactiques manifestent leur activité antimicrobienne envers les souches pathogènes Gram+ (*Staphylococcus aureus*) et Gram- (*Escherichia coli* et *Pseudomonas sp*) en utilisant la méthode directe de Barefoot et Klaenhammer ,(1983) qui permet de détecter tous les types d'interactions. Grâce à cette méthode, il a été possible d'observer le niveau d'inhibition et de déterminer l'agent inhibiteur.

Grâce à la méthode de Barefoot et Klaenhammer, nous avons pu constater un taux d'inhibition varié avec un diamètre de 12 mm.

L'effet inhibiteur des bactéries lactiques a été le plus sensible à la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

Ensuite on a testé la sensibilité des souches lactiques par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques

On a constaté que :

- L'effet antibactérien peut différer en fonction des caractères des bactéries lactiques et des conditions de culture ;
- Les bactéries Gram positif sont plus résistantes que les bactéries Gram négatif.
- Le diamètre des zones d'inhibition varie en fonction de l'antibiotique pour chaque souche. On peut expliquer la disparité de la résistance et de la sensibilité observées par la capacité des souches, ainsi que par la concentration des antibiotiques et leur mécanisme d'action.

Perspective :

Il faudra réaliser d'autres recherches afin d'approfondir notre compréhension de l'effet des bactériocines sur les champignons, les protozoaires et les bactéries à Gram négatif.

Il sera intéressant de mener une recherche approfondie sur ce sujet.

Notre objectif est de poursuivre ces recherches pour déterminer les substances antimicrobiennes. Pour cela, il est essentiel de réaliser une série de tests, tels que le peroxyde d'hydrogène, le phage et l'effet d'autres enzymes protéolytiques. Ces tests permettront de confirmer que cette substance pourrait être une bactériocine et de

déterminer la nature précise des autres facteurs inhibiteurs afin de l'intégrer dans le domaine pharmaceutique ou agroalimentaire.

Référence

- **ALBANO H., OLIVEIRA M., AROSO R., CUBERO N., HOGG T. ET TEIXEIRA P., (2007).**Anti listerial activity of lactic acid bacteria isolated from “Alheiras” (traditional Portuguese fermented sausages) *In situ* assays *Meat Science*,76: 796-800.
- **ALVESV.F.,MARTINEZ R.C.R ,LAVRADORM.A.S et DEMARTINISE.C.P., (2006).**, Anti listerial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham, *Meat Science*, 74 : 623-627.
- **AMMORS., TAUVERONG., DUFOURE et CHEVALLIERI., (2006).** Antimicrobial activity lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control*, 17: 454-461.
- **Axelsson Lars (2004).** Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology In Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects.SalminenS.,WrightA.v.,OuwehandA.3eEd.,MarcelDekker:1-66
- **AYMERICH M.T., GARRIGA M., MONFORT J. M., NES I. et HUGAS M., (2000).**Bacteriocin producing Lactobacilli in Spanish-style fermented sausages, characterization of bacteriocins *Food Microbiology*, 17: 33-45.
- **Bailey JE, Ollis DF. (1986).** Biochemical Engineering Fundamentals. 2éme Edition,McGraw-Hill,Singapore
- **BALLANGUEJ, (1993).**Bifidobacteria and probiotic action. Lactic acid bacteria. Ed: Salminen, A and Von wright.
- **BARREFOOTS.F. et KLAENHAMMERT.R, (1984).** Purification and characterization of *lactobacillus acidophilus* bacteriocin Lacticin B. *Anti-microbiology Agent Chemather*,26(3).
- **BAUMGART D. C. et DIGNASS A. U., (2002).** Intestinal barrier function. *Current Opinionin Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 5: 685-94.
- **Bechachha, K&Bouderhem, R, (2020),** les bactéries lactiques : Rôles et intérêts. Mémoire de master. Université 8 Mai 1945 Guelma faculté des sciences de la nature et de vie, 89p.
- **Bekhouche F. et Boulahrouf A (2005).** Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactique de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d'élevage de Constantine Sciences & Technologie., 23:38-45.

- **BELLIARDE., THAULTD.et MATHOTA.G.,(1996)** Propriétés anti microbiennes des bactéries lactiques In microbiologie alimentaire. Tome: 01 Coordinateurs: BOURGEOIS C.M et LARPENTJ.P.Ed : Techniques et Documentations Lavoisier Paris.
- **BottazziV.1988:** An introduction to rod shape lactic acid bacteria. *Biochimie*. P70, 303-315.
- **Bouguerra, A.** (2021).Evaluation du potentiel probiotique des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle, Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas, Sétif 1 faculté des sciences de la nature et de la vie, 141p.
- **BOUHNIB.Y., (1993).** Survie et effets chez l'homme des bactéries ingérées dans les laits fermentés *Lait*, 73p.
- **BRADLEYD. E, (1967).** Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins *Bacteriological reviews*, 31(4):230-314.
- **Caplice, E., Fitzgerald, G. (1999).** Food fermentations: role of microorganisms in food.
- **Carr Frank J, Chill Don and Maida Nino (2002).**The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey *Critical Reviews in Microbiology*,28(4):281-370
- **CHARTERISW.P, KELLYP.M, MORTELLI.I. ET COLLINJ.K., (2000).** Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolated. *Journal of Food Protect*, 63(10).
- **CHERBUTC.H., (2001).** Yaourt et laits fermentés. *Lettre N° 04, INRA*
- **CHUNG H. T., MONTEVILLE J. J. ET CHIKINDAS M. L., (2000).** Nisin depletes ATP and proton motive force in mycobacteria. *Letter of Applied Microbiology*, 31(6).
- **CLEVELAND J., MONTVILLET.J, NESI.F.et CHIKINDASML., (2001).** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1-20.
- **CORTHER G., (2007).**Flore intestinale et santé : quels enjeux ? *Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, INRA, Domaine de Vil vert, 78352Jouyen Josas Cedex*, 1-13.
- **DACOSTAY, (2001).**Probiotiques et prébiotiques en alimentation humaine. Ed : Techniques et Documentations Lavoisier Paris.

- **DAVEY G. P. et RICHARDSON B. C., (1981).** Purification and some properties of diplo coccin from *streptococcus cremoris*346. *Applied and Environmental Microbiology*, 141, 84-89.
- **DeRoissart H .1986.**Bactéries lactiques, p.343.InF.M.Luquet (Ed.), Lait et produits laitiers : vache, brebis, chèvre, vol. 3. Lavoisier, Paris.
- **DE VUYST L. et VANDAMME E. J, (1993).** Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis sub sp lactis* batch fermentation using a complex medium. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 40: 17-22.
- **DellaglioF., DeRoissart H., TorrianiS., CurkM.C., JanssensD.1994.** Caractéristique générale des bactéries lactiques. In Bactéries lactiques vol 1.pp.25-116.
- **Dellaglio,F.,deRoissard,H.,Torriani,S.,Curk,M.C.,etJanssens,D.,(1994).**Caractéristiq ues générales des bactéries lactiques. In: Bactéries lactiques (DeRoissard H.et LuquetF.M.). Loriga, Uriage.1:25-116.
- **DESMAZEAUDM., (1996).**Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité. *Cahier Agriculture*, 5:331-343.
- **DesmazeaudM.J et DeRoissartH (1994).**Métabolisme général des bactéries lactiques. In Bactéries lactiques. DeRoissartH. LuquetF.M.Tome1, Lrica:169-207
- **DILMI- BOURAS A. et SADOUN D., (2002b).** Survie des ferments du yaourt dans le tube digestif du lapin. *Lait*, 82(2).
- **DILMI- BOURAS A. et SADOUN D., (2002b).** Survie des ferments du yaourt dans le tube digestif du lapin. *Lait*, 82(2).
- **DILMIBOURASA, (2006).**Assimilation in vitro of cholesterol by yogurt bacteria. *Annals of agricultural and Environmental Medicine AAEM*, 13:49-53.
- **DILMI BOURAS A., KOÏCHE M. ET TABTI M. (2007).**The effect of *Lactobacillus paracasei* on the rabbit's cholesterolemia. *African Journal of Biotechnology*, 6(24): 2840-2845.
- **Dortu Carine et Thonart Philippe (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires *Biotechnol Agron Soc Environ.*, 13(1) :143-154.

- **DUPONT I., ROYD. et LAPOINTE G., (2000).** Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 24:251-255.
- **FredricksonJ, ZacharalJ.2004.**Geomic biology of high-level nuclear waste-contaminates dose sediment at the hand ford site Washington state, P4230.
- **Franz C.M.A.P., Stiles M.E., Schleifer K.H., Holzapfel W.H. 2003.** Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* Enterococci in Foods. Functional and Safety Aspects. vol. 88,105-122
- **Fuqua, C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1996).** « Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators ». *AnnuRevMicrobio*50: 727-751.
- **GOSSELINK M. P, SCHOUTEN W. R., VAN LIESHOUT L. M., HOP W. C.,LAMAN J. D. et RUSELERVAN EMBDEN J. G., (2004).** Delay of the first on set of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Disease of Colon and Rectum*, 47: 876-884.
- **GUIRAUDJ.P.2004.** «Microbiologie alimentaire». Edition DU NOD.P
- **HassanA.N, FrankJ.F.2001.**Starter Cultures and their use In: *Applied Dairy Microbiology* (MarthE.H. ET SteeleJ.L.) 2°Ed, Marcel Dekker, Inc. New York.151-205.
- **HoggT.2005.**Essential microbiology John Wiley & Sons, Ltd.188-190.
- **HUGENHOLTZJ. ET STARRENBURGM.J.C., (1992).** Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis sub sp. Lactis* var. *Diacetylaetis* and *Leuconostoc ssp.**Applied Microbiology and Biotechnology*, 38:17-22.
- **ISOLAURIE, SALMINENS. Et OUWEHANDA.C., (2004).**Probiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 18: 299-313.
- **JIMENEZ-DIAZR., RIOS-SANCHEZR. M., DESMAZEAUDM., RUIZ-BARBAJ.L. et PIARDJ.C, (1993).** Plantaricins and Two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5): 1416-1424.
- **KAILASAPATHY K., (2002).** Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3: 39-48.

- **Kandler Oet Weiss N. 1986.** Regular non-sporing gram-positive rods. In Bergey's manual of systematic bacteriology: 108-109. WILLIAMS. WILKINS. Baltimore. Volume 2.
- **Khalid N.M., Marth E.H. 1990.** Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoil age of cheese. *Rev. Dairy Sci.* 73: 158-167.
- **KLAENHAMMERT.R, (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Biological Revue*, 12.
- **Kleerebezem M, Quadri LEN, Kuipers OP, de Vos WM. (1997).** Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 24: 895-904.
- **KOSTINEK M., SPECHTI., EDWARD V. A., PINTOC., EGOUNLETY M., SOSSA C., MBUGUA S., DORTU C., THONART P., TALJAARD L., MENGU M., FRANZ C. M. A. P. et HOLZAPFELW. H., (2007).** Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 342-351.
- **LANCEFIELD R. C., (1993).** A serological differentiation of human and other groups hemolytic streptococci. *Journal of Experimental Medicine*, 57: 571-575.
- **LARPENT J. P., (2000).** Introduction à la nouvelle classification. Ed : Techniques et Documentation. Lavoisier Paris.
- **LEE N. K. et PAIK H. D., (2001).** Partial characterization of lactic in NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK 24 molted from jeat, gal. *Food Microbiology*, 18(1):17-24.
- **LELOIR Y., NOUAÏLE S., RIBEIRO L., COMMISSAIRE J., CORTIER G., GLBERT S., CHATEL J. M., L'HARIDON R., GRUSS A. et LANGELLA P., (2001).** Sécrétion des protéines d'intérêt thérapeutique chez *Lactococcus lactis*. *Lait* : 81.217-226.
- **Leveau J.Y., Bouix M. 1993.** Les levures. Dans: Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. Eds. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris, pp : 2-39.
- **Loison (2013).** Nouveau procédé de fractionnement de la graine de Neem Sénégalais. Thèse de Doctorat, *Université de Toulouse*.
- **Lues J, Thezon M, Venter P, Rasephei M (2007).** Microbial composition in bio aero sol sofa high-through put chicken-slaughtering facility.

- **LUQUET F.M. et CORRIEUG., (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques.
Ed : Techniques et Documentations Lavoisier Paris
- **LUQUET F.M. et CORRIEUG., (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques .Ed:
Techniques et Documentations Lavoisier Paris
- **MAJAMAA H. ET ISOLAURIE, (1997)** .Probiotics: a novel management of food allergy *Journal of Allergy clinical Immunology*, 99.
- **MARTEAU P. H., POCHART P. H., BOUHNİK Y. et RAMBAULT J. C., (1994).** Ecologie microbienne survie et effets de *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobactéries* de produits laitiers fermentés dans le tube digestif de l'homme. *CATH.Nutr, Diet XXIX*, 1994.
- **Mathot A.G, Beliard E et Thnault D (1996).** Propriétés anti microbiennes des bactéries lactiques In *Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires*. Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, Tec&Doc, Lavoisier:432-450
- **MATSUMOTO M. et BENNO Y., (2004).** Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutation Research*, 568: 147-153.
- **MERCENIER A., PAVAN S. et POT B., (2002).** Probiotics as bio therapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 99-110.
- **METCHNIKOFFE, (1907).** The prolongation of life. In *Optimistic Studies* (Heinemann W, Ed.), pp.1-100. G.P.Putnam and Sons, London, UK.
- **Moreno M.R.F., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. 2006.** The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106, 1–24.
- **Nehem Nancy. (2008).** Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni* impact sur la réalisation de la fermentation malo lactique en cultures séquentielles et mixtes. . Thèse pour obtenir le titre de Docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse. Spécialité: Génie des procédés et Environnement.

- **NES I. F., DIEP D. B., HAVARSTEIN L. S., BRURBERG M. B., EIJSINK V. et HOLOH,(1996).**Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 2-4.
- **NissenP, NielsenD, ArneborgN. (2003).** « Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-Saccharomyces yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast*».20: 331-341.
- **NovelG, (1993).**Les bactéries lactiques In *Microbiologie industrielle: les microorganismes d'intérêt industriel*. Leveau J-Y., BouixM. Tec & Doc, Lavoisier : 170-374.
- **NovelG.1993.**Les bactéries lactiques. In *Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel*, eds. J. Y. Leveau et M. Bouix. Tec et Doc. Lavoisier, Paris ; 1-11.
- **Orla-JensenS.1919.**The Lactic Acid Bacteria. Copenhagen: Host and Son.
- **PATHMAKANTHAN S., MEANCE S. ET EDWARDS C., (2000).** Probiotics: review of human studies to date and methodological approaches. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2:10-30.
- **PaulRossR.Cotter, Colin Hill, PaulD, 2005.** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*,3:777-788
- **PIARD J. C. et DESMASEAUD M., (1992).** Inhibiting factors produced by lactic acidbacteria.2-bacteriocins and other anti-bacterial substances.*Lait*, 72: 113-142.
- **PLUMMER S., WEAVER M. A., HARRIS J. C., DEE P. ET HUNTER J., (2004).** *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C.difficile* diarrhoea. *International Microbiology*, 7:59-62.
- **Pot B. 2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu G., and Luquet F.M. (Eds). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*. Lavoisier. Paris, France pp 1–152.
- **Prescott L. M, Harley J. P and Klein D. A (1999).** *Microbiology*, 4th Ed. New York: WCB/McGraw-Hill.
- **RAY B., (1992).** Pediocin of pedio *coccusacidilacticias* food bio preservatives in food preservatives of microbial original .Ed: RAY B. and Daeschel M.A .BOCA Raton, CRC press265-322.

- **ROSENFELDT V., BENFELDT E., VALERIUS N. H., PAERREGAARD A. et MICHAELSEN K. F., (2004).** Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with a topic dermatitis. *Journal of Podiatry*, 145:612-616.
- **Ruiz-Moyano S., Martin A., Benito M.J., Nevado F.P., Cordoba M.G. 2008.** Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*, In Press, Corrected Proof.
- **SAARELAM, LAHTEENMAKIL, CRITTENDEN, R., SALMINENS.ET SANDOLMM.J, (2002).**Gut bacteria and health foods-the European perspective. *Journal of International Food Microbiology*, 78: 99-117.
- **SAARELA M., MAGENSEN G., FONDEN R., MATTO J. et LASANDHOLM T.M., (2000).** Probiotic bacteria: safety: functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84:197-215.
- **Sabia C., De Niederhäusern S., Messi P., Manicardi G., Bondi M. 2003.** Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages ("cacciatore"). *International Journal of Food Microbiology*. vol. 87, 173-179.
- **Sabia C., Manicardi G., Messi P., De Niederhäusern S., Bondi M. 2002.**Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 75, 163-170.
- **SAINT LAURENT A., (2002).** Les principes fondamentaux de gastro-entérologie : flore normale de l'intestin grêle : 208-295.
- **SAXELIN M., PESSI T. et SALMINEN S., (1995).** Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatin capsules to healthy volunteers. *International Journal of Food Microbiology*, 25:199-203.
- **SCHULTSZC, VAN DEN BERGF. M., TEN-KATE F. W., TYTGAT G. N. ET DANKERT J., (1999).** The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* 117:1089-1097.

- **SCHVED F., LAIZAR A., LINDNER P. ET JUVEN B. J., (1994).** Interaction of the bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactis* SJI with the cell envelope of *Lactobacillus ssp.* *Applied Microbiology*, 19: 281-283.
- **SIEUWERTS, S., DEBOK, F.A.M, HUGENHOLTZ, J .ET VANHYLCKAMAVLIEG, J.E.T. (2008).** «Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches». *Applied and environmental microbiology* 74, 4997-5007. August 15, 2008.
- **SUTRAL., FEDERIGHI. et JOUVEJ.L., (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. Ed : POLYTECHNICA, Paris, 308(6):31-249.
- **TAGGJ.R, DAJONIA.S.ETWANNAMBERL.W, (1976).** Bacteriocin of gram positive bacteria. *Bacteriological revue*, 40: 722-756.
- **TURCHET P., LAURENZANO M., AUBOIRON S. ET ANTOINE J. M., (2003).** Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomized, controlled pilot study. *Journal of Nutrition and Health Aging*, 7: 75-77.
- **TURSI A., BRANDIMARTE G., GIORGETTI G. M. et MODEO M. E, (2004).** Effect of *Lactobacillus casei* supplementation on the effectiveness and tolerability of a new second-line 10-day quadruple therapy after failure of a first attempt to cure *Helicobacter pylori* infection. *Medical Science Monitor*, 10:662-666.
- **Van de Guchte, M., Ehrlich, S. D. et Maguin, E. (2001).** « Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii* ». *Journal of Applied Microbiology* 91, 147-153.
- **VAN DEN BERG D. J. C., ROBIJN G. W., JANSSEN A. C., GUISEPPIN M. L. F., VREEKER R, KAMERLING J. P., Vliegenthart J. F. G., LEDEBOER A. M. et VERRIPS C. T., (1995).** Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0 1 and characterization of the polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2840-2844.
- **VENTURA M., VAN SINDEREN D., FITZGERALD G. F. ET ZINK R., (2004).** Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86:205-223
- **VIGNOLA C. L., MICHEL J. C., PAQUIN P., MOINNEAU M., POULIOT M. et SIMPSON R., (2002).** Sciences et technologie du lait : Transformation du lait. Ed : Techniques et Documentation Lavoisier. 600p.

- **Vouriot M, Berle E, Paillaud E**, *Candidoses* orales chez les personnes âgées hospitalisées fréquence, facteurs de risque et prévention ». *Encycl. Med Hygiènes* 15(2007)385-390.
- **WANG M. F., LIN H. C., WANG Y. Y. et HSU C. H., (2004)**, Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatric Allergy and Immunology*, 15:152-158.
- **Wheater M. D, Hirsch H and Mattick A. T. R (1951)**. Possible identity of « lactobacilline » with hydrogen peroxide produced by *Lactobacilli*. *Nature.*, 170:623.

Annexes 1

Milieux de culture

➤ Milieu de Chapman (Guiraud, 1998)

Composition :

Extrait de viande	1g
Peptone.....	10g
Chlorure de Sodium (NaCl).....	75g
Mannitol... ..	10g
Rouge de phénol... ..	0,025g
Gélose.....	18g
Eau distillée	1000 ml

- Auto claver à 120°C/20mn

➤ Bouillon MRS (Man, Rogosa et Sharpe, 1960)

Composition :

Peptone.....	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure.....	5g
Glucose.....	20g
Tween80... ..	1ml
Phosphate di potassique	2g
Acétate de sodium... ..	5g
Citrate de sodium.....	2 g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse.....	0.05g
Eau distillée	1000 ml

- PH6.5
- Autoclaver à 120°C/20mn

Gélose MRS : Bouillon MRS additionné de gélose à raison de 1.5 %

➤ **Mueller Hinton :**

Infusion de viande de bœuf	2 g
Amidon.....	15 g
Hydrolysate de caséine	17g
Agar.....	17 g
Eau distillée	1000mL

- pH=7
- Autoclaverà120°C/20mn

➤ **Sabouraud :**

Peptone de gélatine... ..	10g
Glucose.....	20g
Agar.....	17g
Eau distillée	1000 ml

- pH5.6
- Autoclavage120°C/20minutes

➤ **Gélose nutritive (GN)**

Peptone	15g
Extrait de levure.....	3g
NaCl.....	6g
Agar.....	15g
Eau distillée	1000ml

- PH 7.5 ± 0.2
- Autoclavage à 121°C pendant15min

Bouillon nutritif est non additionné de gélose à raison de 1.5%

Annexes 2

Tableau 9. les résultats de la mesure des densités optiques

Souches	0H	2H
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,315	0,355
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,261	0,319
<i>Escherichia Coli</i>	0,499	0,517
<i>Candidas albicans</i>	0,254	0,165

Tableau 10. Diamètres des zones d'inhibition formés par les souches lactiques confrontés avec les bactéries pathogènes en mm

Souches bactériennes	<i>Stahylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lactococcus fermentum</i>	14mm	5mm	0mm	14mm
<i>Lactobacillus plantarum</i>	12mm	8mm	0mm	9mm
<i>Enterococcus faecium</i>	15mm	10mm	0mm	9mm