



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

ELMEDDAH Zahia et LADJAL Cherifa

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : NUTRITION ET SANTE

Thème

*Etude de l'activité antibactérienne de souches
lactiques isolées du lait de vache*

Soutenu publiquement le 20/06/2017

Devant le Jury

Président	Mr. Riazi A.	Professeur à l'université de Mostaganem
Encadreur	Mme Kouadri Boudjelthia N.	MAB à l'Université de Mostaganem
Examinatrice	Melle Mokhtare M.	MCA à l'Université de Mostaganem
Examinatrice	Melle Tabet F.	MAB à l'Université de Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de LMBAFS

Année Universitaire : 2016/2017

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

ELMEDDAH Zahia et LADJAL Cherifa

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : NUTRITION ET SANTE

Thème

*Etude de l'activité antibactérienne de souches
lactiques isolées du lait de vache*

Soutenu publiquement le 20/06/2017

Devant le Jury

Président	Mr. Riazi A.	Professeur à l'université de Mostaganem
Encadreur	Mme Kouadri Boudjelthia N.	MAB à l'Université de Mostaganem
Examinatrice	Melle Mokhtare M.	MCA à l'Université de Mostaganem
Examinatrice	Melle Tabet F.	MAB à l'Université de Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de LMBAFS

Année Universitaire : 2016/2017

Remerciement

Le présent travail a été réalisé au laboratoire de microorganisme bénéfique des aliments Fonctionnels et de la santé sous l'encadrement scientifique de **Mme KOUADRI BOUDJELTHIA N.** à qui nous exprimons notre profonde gratitude et nous la remercions d'avoir accepté d'encadrer et diriger cette étude.

Nous exprimons aussi nos respectueux remerciements au **Pr. RIAZI A.** directeur du laboratoire des microorganismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé d'avoir accepté d'être le président du jury.

Nous adressons également nos remerciements à **Melle MOKHTAR M.** et **Melle TABET F.** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Enfin nous remercions tous les membres du laboratoire des microorganismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (**Siham, Latifa, Djahira**) pour leurs aides.

Dédicace

Je remercie le DIEU tout puissant, et Je dédie ce modeste travail a :

Mes chers parents :

*Les mots ne suffiront pas pour témoigner toute ma gratitude pour leur
entière disponibilité, leur assistance et leur dévouement tout au long
de mes études -Que dieu me les gardes-*

Mes chers frères et sœurs :

Larbi, Adda, Mohamed Ilyeses: Hakima, Habiba

Mes cousines :

Siham, Aouda

Mes copines :

Fatima, Kheira, Nebia, Ahlam

A mon binôme CHERIFA

Sans oublier toute la famille ELMEDDAH sans exception

ZAHIA.M

Dédicace

A l'aide de Dieu tout puissant, qui ma tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail que je dédie à :

Mes chers parents:

Qui m'ont beaucoup soutenu et encouragé jusqu'au bout.

Que Dieu leur accorde une longue vie.

Mes chers frères et sœurs:

Hamza, Hachmi, Nouryakin Djazia, Hassiba, Hakima.

Je dédie aussi ce travail à toute ma famille LADJAL.

A mon binôme ZAHIA

A La promotion de 2^{ème} année master Nutrition et santé LMD

Promotion 2017

CHERIFA.L

Résumé

Cette étude consiste à démontrer l'effet antagoniste des bactéries lactiques isolées du lait de vache, vis-à-vis de quelques espèces de bactéries pathogènes responsables de différentes maladies chez l'homme. L'étude phénotypique a permis de confirmer la viabilité de neuf souches lactiques d'une collection de bactéries lactiques isolées du lait de vache : (LMBAFS01 ; LMBAFS02 ; LMBAFS03 ; LMBAFS04 ; LMBAFS05 ; LMBAFS06 ; LMBAFS07 ; LMBAFS08 ; LMBAFS09), dont on dénombre (08) souches apparentées aux Genre *Lactobacillus* par leur forme cellulaire en bâtonnet et (01) souche apparentée aux *lactocoques* par leur forme cellulaire en cocci.

Par ailleurs, les tests d'activité antibactérienne contre *staphylococcus aureus* ATCC 6538; *staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; *Pseudomeunasaeroginosa* ATCC 27853; *Eschérichia coli* ATCC 10536; *shiguelladysenteria* CECT 457; en utilisant la méthode de diffusion en puits, ont conduit à l'apparition d'halot claire autour des souches lactiques testées, avec des diamètres de zone d'inhibition variables, en effet, les souches LMBAFS[01 ;02 ;03 ;04 ;05] ont été les plus performantes contre *staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomeunasaeroginosa* ATCC 27853 et *shiguelladysenteria* CECT 457.

L'interaction d'antagonisme avec les surnageant après neutralisation par une solution de NaOH 1N et filtration par filtre millipore (0.45µm); à révéler une activité antibactérienne seulement contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 chez les souches LMBAFS[01; 02; 03;04; 05]. Ce qui permet de dire qu'il y a d'autres substances antibactériennes produites par nos bactéries et qu'une caractérisation plus poussé permettra de déterminer leur nature (H2O2 ;Diacétyl; ou Bactériocines).

Mots clé : Lait de vache, Les bactéries lactiques, Le pouvoir antagoniste, Agents inhibiteurs, Les souches pathogènes.

Summary:

This study consists in demonstrating the antagonistic effect of lactic acid bacteria isolated from cow's milk, against some pathogenic bacteria responsible of different diseases in humans. The phenotypic study confirmed the viability of nine lactic strains from a collection of lactic acid bacteria isolated from cow's milk: (LMBAFS01; LMBAFS02; LMBAFS03; LMBAFS04; LMBAFS05; LMBAFS06; LMBAFS07; LMBAFS08; LMBAFS09) ; (08) strains related to the *Lactobacillus* genus by their rod-shaped cell and (01) *lactococci*-related strains by their cocci cellular form.

Otherwise, tests for antibacterial activity against: *staphylococcus aureus* ATCC 6538; *staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Escherichia coli* ATCC 10536; *shiguelladysenteria* CECT 457, using the well-diffusion method, led to the appearance of clear halot around the tested lactic strains with variable inhibition zone diameters, in fact the strains LMBAFS[01 ;02 ;03 ;04 ;05] were the best performers against *staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *shiguelladysenteria* CECT 457.

The interaction of antagonism with the supernatant after neutralization with a solution of 1N NaOH and filtration by millipore filter (0.45 µm), revealed antibacterial activity only against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 for the strains LMBAFS[01; 02; 03;04; 05], this makes possible to say that there are other antibacterial substances produced by our bacteria and a more detailed characterization will allow to determine their nature (H2O2,

Diacetyl or bacteriocins).

Key words: Cow's milk, Lactic acid bacteria, Antagonist, Inhibitory agents, Pathogenic strains

ملخص

هذه الدراسة تدل على نشاط التأثير المضاد للبكتيريا الحليبية المعزولة من حليب البقر ضد انواع من البكتيريا المسؤولة عن عدة امراض في الجهاز الهضمي للإنسان والتي تتمثل في، LMBAFS01, LMBAFS05, LMBAFS04, LMBAFS09, LMBAFS08, LMBAFS07, LMBAFS06, LMBAFS03, LMBAFS02 ثمانية بكتيريا من سلالة *Lactobacillus* ذات شكل اعمدة وبكتيريا واحدة من سلالة متعلقة *Lactococcus* ذات شكل كروي. اختبارات النشاط المضاد لنمو البكتيريا التالية، *E.coli* ATCC 6538، *Staphylococcus aureus* ATCC 6538، *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، *Shigella dysenteriae* CECT 457 باستخدام طريقة النشر ادت الى ظهور مناطق شفافة دائرية الشكل حول البكتيريا الحليبية المستعملة (Halot) والتي تتمثل في منطقة التثبيط (Zone d'inhibition) ذات اقطار مختلفة عند كل من LMBAFS [01 ;02 ;03 ;04 ;05] بعد معالجة السائل الطافي بمحلول هدر وكسيد الصوديوم (1N) NaOH وتصفيته بمصفي الميليبيور (0.45) μm والقيام باختبار النشاط المضاد ادت النتائج الى وجود مناطق تثبيط حول نفس البكتيريا الحليبية LMBAFS [01 ;02 ;03 ;04 ; 05] وهذا يعني ان هناك مواد مثبطة اخرى غير الاحماض العضوية المفترزة من طرف هذه البكتيريا الحليبية وتخصصا اكثر في دراسة هذه المواد المثبطة يمكن من تحد يد طبيعتها (ثنائي الاستيل H2O2 او Bactériocine).

كلمات مفتاحية: حليب البقرة, البكتيريا الحليبية, النشاط المضاد, عوامل التثبيط, السلالة الضارة

Liste des abréviations

- **LMBAFS** : Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé.
- **%** : Pourcentage
- **°C** : Degrée Celsius
- **DO** : Densité optique
- **µl**: Microlitre
- **ATCC**: American Type Culture Collection
- **CECT**: Coleccion Espanola de Cultivos Tipos
- **ADT**: Agar well Diffusion Test
- **GN**: Gélose nutritive
- **LB** : bouillon liquide
- **MRS**: de Man-Rogosa et Sharp
- **BHI**: Brain heart infusion
- **Lb**: *Lactobacillus*
- **Lc** : *Lactococcus*
- **Ln** : *Leuconostoc*
- **P**: *Pediococcus*
- **Bf**: *Bifidobacterium*
- **E.coli**: *Escherichia coli*
- **S.aureus** : *Staphylococcus aureus*
- **Ps.aerogenosa**: *Pseudomonas aerogenosa*
- **Sh.dysenteria** : *Shigella dysenteria*
- **g** : gramme
- **h** : Heure
- **H2O2** : eau oxygénée
- **l** : Litre
- **ml** : Millilitre
- **mm** : Millimètre
- **rpm** : Rotation par minute
- **OMS** : Organisation Mondiale de la santé
- **FAO**: Food And Agriculture Organization
- **PH**: Potentiel d'hydrogène
- **sp** : Espèce
- **ssp** : Sous-espèce
- **UFC** : Unité Formant Colonies
- **Zi** : Zone d'inhibition
- **Ppm**: Partie pour million

Liste des tableaux

Tableau -01: Composition nutritionnelle moyenne en % du lait de vache.....	03
Tableau-02 : Les principales constantes physico-chimiques du lait de vache.....	04
Tableau-03 : Flore microbienne du lait.....	05
Tableau -04: Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques.....	09
Tableau -05 : La nature et l'origine de différentes souches lactiques utilisées.....	21
Tableau -06 : La nature et l'origine de différentes souches pathogènes utilisées.....	22
Tableau -07 : Observation microscopiques des différentes souches lactiques utilisées.....	31
Tableau-08 : Résultats de diamètre de la zone inhibition (mm) des souches lactiques contre les souches pathogènes (Cultures jeunes).....	40
Tableau-09 : Résultats de diamètre de la zone inhibition (mm) des souches lactiques contre les souches pathogènes. (Surnageant non neutralisé).....	43
Tableau-10 : Résultats de diamètre de la zone inhibition (mm) des souches lactiques contre les souches pathogènes. (Surnageant neutralisé et filtrée).....	46

Liste des figures

Figure -01 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des Hexoses chez les bactéries lactiques.....	11
Figure-02 : <i>Staphylococcus aureus</i>	17
Figure-03 : <i>Escherichia coli</i>	18
Figure-04 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Figure-05 : <i>Shigella dysenteria</i>	20
Figure -06 : Le schéma du protocole du test d'antagonisme par la méthode de diffusion en puits ADT (agar well diffusion test) pour culture jeunes.....	28
Figure-07 : Le schéma du protocole du test d'antagonisme par la méthode de diffusion en puits ADT (agar well diffusion test) pour surnageant.....	29
Figure-08 : Observation macroscopique des colonies des bactéries lactiques sur milieu MRS (solide).....	30
Figure-09 : La courbe de croissance de la souche S01.....	33
Figure-10 : La courbe de croissance de la souche S02.....	34
Figure-11 : La courbe de croissance de la souche S03.....	34
Figure-12 : La courbe de croissance de la souche S04.....	35
Figure-13 : La courbe de croissance de la souche S05.....	35
Figure-14 : La courbe de croissance de la souche S06.....	36
Figure-15 : La courbe de croissance de la souche S07.....	36
Figure-16 : La courbe de croissance de la souche S08.....	37
Figure-17 : La courbe de croissance de la souche S09.....	37
Figure-18 : La courbe de croissance des cinq souches pathogènes.....	38
Figure-19 : Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène <i>S.aueurs</i> ATCC 6538.....	39

Figure-20 : Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène <i>Ps.aeruginosa</i> ATCC 27853.....	39
Figure -21 : Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène <i>Sh.dysenteria</i> CECT 457.....	39
Figure -22 : Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène <i>S.aueurs</i> ATCC 6538.....	42
Figure -23 : Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène <i>Sh.dysenteria</i> CECT 457.....	42
Figure -24 : Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène <i>Ps.aeruginosa</i> ATCC 27853.....	42
Figure -25 : Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène <i>S.aueurs</i> ATCC 6538.....	45
Figure -26 : Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène <i>Sh.dysenteria</i> CECT 457.....	45
Figure -27 : Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène <i>Ps.aeruginosa</i> ATCC 27853.....	45

Sommaire

Dédicace	
Remerciement	
Résumés	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	01
Chapitre I : Rappels bibliographiques	
I. Généralités sur le lait de vache	03
I.1. Microflore du lait.....	04
i. Flore originale.....	04
ii. Flore de contamination.....	04
II. Les bactéries lactiques	05
II.1.Habitat.....	06
II.2.Classification.....	06
II.2.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	06
II.2.2. Le genre <i>Lactococcus</i>	07
II.2.3. Le genre <i>Stréptococcus</i>	07
II.2.4. Le genre <i>Leuconostoc</i>	08
II.2.5. Le genre <i>Pediococcus</i>	08
II.2.6. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	08
II.3. Les voies fermentaires du métabolisme des bactéries lactiques.....	09
II.3.1. Voie homofermentaire.....	10
II.3.2. Voie hétérofermentaire.....	10
II.4. Intérêt des bactéries lactiques.....	12
II.4.1. Dans l'industrie alimentaire.....	12
II.4.2. Dans le domaine thérapeutique.....	12
III. Antagonisme bactériens	13
III.1. Les substances antibactériennes des Bactéries lactiques.....	13

III.1.1. Les acides organiques.....	13
III.1.2. Le peroxyde d'hydrogène.....	13
III.1.3. Le dioxyde de carbone CO ₂	14
III.1.4. Le diacétyl.....	14
III.1.5. Acétaldéhyde.....	14
III.1.6. Reutéline.....	15
III.1.7. Bactériocine.....	15
IV. Biologie des bactéries pathogènes.....	16
IV.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
IV.2. <i>Escherichia coli</i>	18
IV.3. <i>Pseudomonas</i>	19
IV.4. <i>Shigella</i>	20
Chapitre II : Matériels et méthodes.....	21
1. Lieu de l'étude.....	21
2. Les souches bactériennes.....	21
2.1. Les souches lactiques.....	21
2.2. Les souches pathogènes.....	22
3. Matériels.....	22
3.1. Appareillage.....	22
3.2. Petit matériel.....	22
3.3. Milieux de culture.....	23
4. Méthodes.....	23
4.1. Réactivation des souches.....	23
4.2. Vérification et purification des souches pathogènes et lactiques.....	24
4.2.1. Examen macroscopique.....	24
4.2.2. Examen microscopique.....	24
➤ Technique de coloration de Gram (Baldent., 1997).....	24
4.2.3. Test catalase (Marchal et al., 1991).....	25
5. Cinétique de croissance bactérienne.....	25
5.1. Les souches pathogènes.....	25
5.2. Les souches lactiques.....	25
6. Etude de l'activité antibactérienne des souches bactériennes isolées.....	25
6.1. Pré-culture des souches pathogènes.....	25

6.2. Pré-culture des souches lactiques.....	26
6.3. Antagonisme bactérien.....	26
6.3.1. Méthode de diffusion en puits ADT (Agar well Diffution Test).....	26
6.3.2. Détermination de la nature des substances antimicrobiennes.....	26
➤ A. Surnageant non neutralisé.....	26
➤ B. Surnageant neutralisé à pH 7 par une solution de NaOH.....	27
Chapitre III : Résultats et discussion.....	30
1. Aspect macroscopiques des isolats.....	30
2. Aspect microscopiques des isolats.....	30
3. La cinétique de croissance des souches.....	33
3.1. Les souches lactiques.....	33
3.2. Les souches pathogènes.....	38
4. Antagonisme bactérien.....	39
4.1. Méthode de puits ADT (Agar Well Diffusion Test) (Cultures jeunes).....	39
4.2. Localisation et Détermination de la nature de la substance antibactérienne.....	41
➤ Test d'antagonismes bactérien avec le Surnageant non neutralisé.....	41
4.3. Méthode de puits ADT (Agar Well Diffusion Test) (Surnageant neutralisé).....	44
Conclusion.....	48
Références bibliographiques.....	49

Annexe

Introduction

Introduction

Le lait de vache est un aliment très consommé par l'homme ; d'une part pour sa grande richesse en vitamine et sa composition nutritionnelle équilibrée en protéines, glucides et lipides, et d'une autre part pour sa microflore composée essentiellement de bactéries lactiques lorsqu'il est traité dans de bonnes conditions de stérilité (**Hermier et al. 1997**).

Les bactéries lactiques sont des Gram positives, anaérobies facultatives et fermentent le lactose en acide lactiques avec production ou non de CO₂ et d'alcool, elles sont dites ubiquistes car elles sont très répandues dans la nature : on les trouve dans le sol ; dans l'eau ; sur les végétaux ; et même qu'elles constituent la grande majorité du microbiote digestif de l'homme et de l'animale (**Mayo et al., 2010**).

Les bactéries lactiques jouent un rôle très important dans l'industrie alimentaire et dans le domaine thérapeutique, où certaines souches lactiques s'avèrent bénéfiques pour la santé et sont appelées probiotiques et plusieurs effets inhibiteurs vis-à-vis de nombreuses bactéries pathogènes, leurs sont attribués grâce à la production de diverses substances antibactériennes : l'acide lactique étant le principal produit de la fermentation lactique; ainsi que d'autres acides organiques, les bactéries lactiques sont catalase négative donc l'accumulation du peroxyde d'hydrogène permet d'inhiber aussi certains pathogènes, ainsi que la production de Bactériocine, diacétyl et d'acétaldéhyde (**Leveau et al., 1991 ; Klaenhammer et al., 1994 ; De Vuyst et Leroy., 2007**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude qui vise à mettre en évidence l'activité antibactérienne chez des souches de bactéries lactiques isolées à partir de lait de vache dans le but de sélectionner les souches les plus performantes en production de substances antibactériennes.

Notre travail consiste à :

- En premier lieu, présélection phénotypique des souches lactiques utilisées, par une étude des caractères cultureux (Température de croissance ; aspect des colonies ; coloration de Gramme ; forme cellulaire) et teste de catalase.

- Ensuite ; déterminer la durée de vie des bactéries lactiques ainsi que des bactéries pathogènes, par l'étude de la cinétique de croissance

- En fin, sélection des bactéries lactiques productrices de substances antibactériennes par l'étude de l'antagonisme bactérien de ces dernières contre les bactéries pathogènes par la méthode de diffusion en puits.

Chapitre I
Rappels bibliographiques

I. Généralités sur le lait de vache :

Selon le **Codex STAN 206-1999** de la norme Générale pour l'utilisation de Termes de laiteries : Le lait est la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou de plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur.

Le lait est produit naturellement chez les mammifères femelles, il est sécrété lors de la traite des glandes mammaires et c'est un produit indispensable à l'équilibre de l'alimentation de l'homme et des animaux, (**Roudaut et al., 2005**).

Le lait de vache se présente sous forme d'un liquide opaque, de couleur blanche mat légèrement bleutée ou jaunâtre selon la concentration en β -carotènes et en matière grasse, son odeur est peu marquée et un goût douceâtre (**Cniel., 2006**).

Il contient de nombreux nutriments qui fortifient l'organisme : protéines, glucides, lipides, sels minéraux, vitamines et oligo-éléments, (**tableau-01**) (**Jensen., 1995**).

Tableau -01 : Composition nutritionnelle moyenne en % du lait de vache (**Jensen., 1995**).

Composants	Lait de Vache (%)
Protéines	3.4
Caséines	2.8
Lipides	3.7
Lactose	4.6
Minéraux	0.7

Le lait de vache possède des propriétés physicochimiques comme sa majeure composition en eau, son pH plus ou moins neutre, sa densité (**Tableau-02**), qui lui confèrent une variabilité et une hétérogénéité dans sa nature biologique (**Larpen., 1997**).

Tableau-02 : Les principales constantes physico-chimiques du lait de vache.(FAO, (1990).

Constantes	Vaches
Energie (Kcal/litre)	705
Point de congélation (°C)	1,028 - 1,033
Densité du lait entier à 20°C	-0,520 – 0,550
pH à 20°C	6,60 – 6,80
Acidité titrable (°D)	15 – 17
Tension superficielle du lait entier à 15°C	50
Conductivité électrique à 25°C (siemens)	45 ×10 ⁻⁴
Indice de réfraction	1,45 – 1,46
Viscosité du lait entier à 20°C (centipoises)	2,0 – 2,2

I.1. Microflore du lait :

Dans de bonnes conditions d'hygiène normale, le lait cru renferme de nombreux germes constituant la flore originale. Cette microflore est représentée essentiellement par des lactobacilles et des streptocoques lactiques commensaux provenant du pis et des canaux galactophores (Hermier et al., 1997).

Le lait cru peut être contaminé par différents microorganismes avant, pendant et après la traite, ils peuvent être classés dans les flores suivantes :

i. Flore originale

Cette flore est représentée par le lait non contaminé et contient essentiellement des germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : *Microcoques*, *Streptocoques lactiques* et *lactobacilles* (Guiraud., 1998).

ii. Flore de contamination :

Selon le mode de contamination cette flore est classée en :

- La flore issue de contamination fécale qui est dangereuse pour le consommateur c'est le cas de : *Bacillus cereus*, *clostridium* ; *E.coli* et des représentants des genres *Brucella* et *Salmonella*(Bourgeois et al.,1996).

- Florespsychrotrophes : Il s'agit essentiellement de : *Acinetobacteres*, *Clostridium*, *Pseudomonas* et *Flavobacterium* qui se développent à une température de 3 à 7°C (Leveau et Bouix., 1991). *Listeria monocytogenes* est capable de se multiplier à une température comprise entre 0°C et +10°C est qualifiée de ce fait de psychrotrophe (Rosset., 2001).

Tableau-03 : Flore microbienne du lait (Leyral et Vierling., 2001).

Flore originale		Flore de contamination	
Bactéries des canaux galactophores	Bactéries contaminant le lait pendant et après la traite	Bactéries d'origine fécale	Bactéries présentes sur l'animal malade
<i>Lactobacilles streptocoques lactiques</i>	<i>Pseudomonas, Flavobacterium</i> <i>Enterobacteries, Microcoques</i> <i>Corynébactéries, Bacillus</i> <i>Streptocoques faecalis</i> <i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i> <i>Coliformes fécaux, Yersinia</i> <i>Salmonella</i> <i>Campylobacter</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i> <i>Brucella</i> <i>Listeria</i>

II. Les Bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes de forme hétérogène cocci et de bacilli (Badis et al., 2005). Ce sont des bactéries à Gram positif .Elles sont asporulantes, anaérobies facultatives, à métabolisme fermentaire strict et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4.0 à 6.5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme fermentaire. (Salminen et al., 2004; König et Fröhlich., 2009 ; Pringsulaka et al., 2011).

Elles sont catalase négative, cytochrome oxydase négative, elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (Dellaglio et al., 1994; Salminen et al., 2004).

Elles sont considérées comme un groupe bactérien le plus exigeant du point de vue nutritionnel, car elles requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés,

phosphatés et soufrés ainsi que des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligoéléments. (Gevers., 2002).

II.1. Habitat :

Les bactéries lactiques sont dit ubiquistes : Car on les retrouve dans différentes niches écologiques riches en nutriments comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif, (Mayou et al., 2010 ; Klein et al., 1993), les eaux et les eaux usées, les jus, ainsi que les cavités buccales et vaginales de l'homme. (König et Fröhlich., 2009).

II.2. Classification :

La classification des est basé sur les bactéries lactiques les propriétés phénotypiques et physiologique : la morphologie, et la fermentation des différents hydrates de carbone, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit (DeRoissart et Luquet., 1994; Holzapfelet al., 2001). Les genres qui étudiés sont : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Bifidobacterium*. (Ercolini et al., 2001 ; Holzapfel et al., 2001 ; Stiles et Holzapfel., 1997).

II.2.1. Le genre *Lactobacillus* :

Les bactéries du genre *Lactobacillus* ont des aspects variés allant du bacille long et fin au *Coccobacille* en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Ils sont Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînettes et habituellement immobiles. Les *lactobacilles* se montrent généralement plus résistants au stress acide que les *lactocoques* (Siegumfeldt et al., 2000).

Les *lactobacilles* se répartissent en trois groupes selon leur profil fermentaire, d'après la classification de Kandler et Weiss (1986) :

- **Les *lactobacilles* du groupe I (LBI)** : ils comprennent les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (croissance à 45°C) dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus*. La plupart des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers.

- **Les lactobacilles du groupe II (LBII) :** ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration en glucose limitante. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakeet* *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles (**Laurent et al., 1998**).
- **Les lactobacilles du groupe III (LBIII) :** ils sont constitués des espèces hétérofermentaires obligatoires, c'est-à-dire utilisant la voie des pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis*, *Lb. kefiret* *Lb. sanfransisco*, Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'homme, et participent à l'équilibre de la flore intestinale (**Laurent et al., 1998**).

II.2.2. Le genre *Lactococcus* :

Ce genre est défini par **Schleifer et al., (1985)** pour classé ce genre en fonction. Ils ont sur la base des critères physiologique et du séquençage d'ARNr 16S (**Schleifer et al., 1985; Collins et al., 1989**). Le genre *Lactococcus* comprend 5 espèces. (**Kusuda et al., 1991; Teixeira et al., 1996**), *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus plantarum* et *Lactococcus lactis* Les espèces de *Lactococcus* sont des coques, à Gram positif au métabolisme homofermentaire produisant exclusivement de l'acide lactique. Elles ont un optimum de croissance voisin de 30°C et ne poussent pas à pH 9,6 ou en présence de 6,5 % de NaCl., elles ne sont pas hémolytiques.

II.2.3. Le genre *Streptococcus* :

Ce genre bactérien englobe l'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* qui se différencie des autres streptocoques par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène ; ainsi que ses propriétés technologiques, et c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique. Elle immobile, sphérique ou ovoïde avec un diamètre inférieur à 2µm et une disposition en paire ou en chaîne longue. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique, et la température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH : 9.6. (**Laurent et al., 1998**).

II.2.4. Le genre *Leuconostoc* :

La famille des *leuconostocaceae*, se présentent sous forme de coque ovoïde, pouvant être allongés ou elliptique, disposé en paire ou en chaîne. Elles ont un métabolisme hétérofermentaire, sont incapables de dégrader l'arginine et sont anaérobies facultatifs (Gonzalez et al., 2007).

Ce genre comprend les espèces suivantes : *Ln. mesenteroides* avec ces sous espèce *mesenteroidescremoris* et *dextranicum* et *Ln. lactis* et *Ln. Pseudomesenteroides* et *Ln. Paramesenteroides* (Collins et al., 1981 ; Laease., 2005).

C'est un genre bactérien exigeant et auxotrophes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et les glucides (Dellaglio et al., 1994).

II.2.5. Le genre *Pediococcus* :

Ce sont des coques formées de cellules groupées en paires ou on tétrades. Ils sont mésophiles homofermentaires. Ce genre contient Sept espèces connues : *P.acidilactici*, *P.damnosus*, *P.dextranicum*, *P. inopinatus*, *P.parvvutus*, *P. pentosaceus* et *P.urinaeequi* (Pilet et al., 2005).

Ce sont des agents de dégradation en brasserie (*P.damnosus*). Les *P.acidilactici* et *P.pentosaceus* ont démontré leur utilité dans l'élaboration de plusieurs produits carnés fermentés naturels. Ils sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries. Les *pidiocoques* sont également des bactéries lactiques autochtones qui permettent la maturation des fromages (Gonzalez et al., 2007 ; Gurira et al., 2005).

II.2.6. Le genre *Bifidobacterium* :

Les cellules de *Bifidobacterium* se caractérisent par leur forme très irrégulière, souvent en V et Y. Elles se différencient des autres bactéries lactiques par la présence d'une enzyme, la fructose-6- phosphate phosphocétolase. Celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique, ainsi qu'en moindre proportion de l'éthanol et d'autres acides organiques. Cette fermentation « lactique » a conduit à les rapprocher du groupe des bactéries lactiques. Leur température optimale de croissance est comprise entre 37°C et 41°C. Elles se développent à pH supérieur à 5. (Laurent., 1998).

Tableau -04 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Laurent et al., 1998).

Genre	Morphologie	Type de fermentation	Température optimale	Nombre d'espèces
<i>Lactobacilles</i>	Bacilles	Homo ou hétérofermentaires	Thermophiles Ou mésophiles	G1 :23 G2 :16 G3 : 22
<i>Lactococcus</i>	Coques	homofermentaires	Mésophiles	5
<i>Streptococcus</i>	Coques	homofermentaires	Mésophiles ou thermophiles	19
<i>Leuconostoc</i>	Coques	hétérofermentaires	Mésophiles	11
<i>Bifidobacterium</i>	Forme irrégulière	Acide acétique et lactique	Mésophiles	25

II.3. Les voies fermentaires des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (**Figure 01**). Il s'agit des voies homofermentaires (Embden-Meyerhoff- Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate). Ainsi, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes principaux d'espèces homo ou hétérofermentaires selon la nature et la concentration des produits terminaux issus de la fermentation du glucose. (Makhloufi., 2012).

II.3.1. Voie homofermentaire :

Comprend les espèces de *Streptococcus sp*, *Entérocoquessp*, *Lactococussp*, *Pédiococussp* et *lactobacillus sp*. Ils convertissent le glucose en acide lactique (**Djidel., 2007**).

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. La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA), est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP. (**Thompson et Gentry-Weeks., 1994**).

II.3.2. Voie hétérofermentaire :

Représenté par les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires. Les principaux groupes de bactéries pour ce type de métabolisme sont les *leuconostocs* et certains *lactobacilles*. Ces microorganismes utilisent la voie des pentoses phosphate (**Thompson et Gentry-Weeks., 1994**).

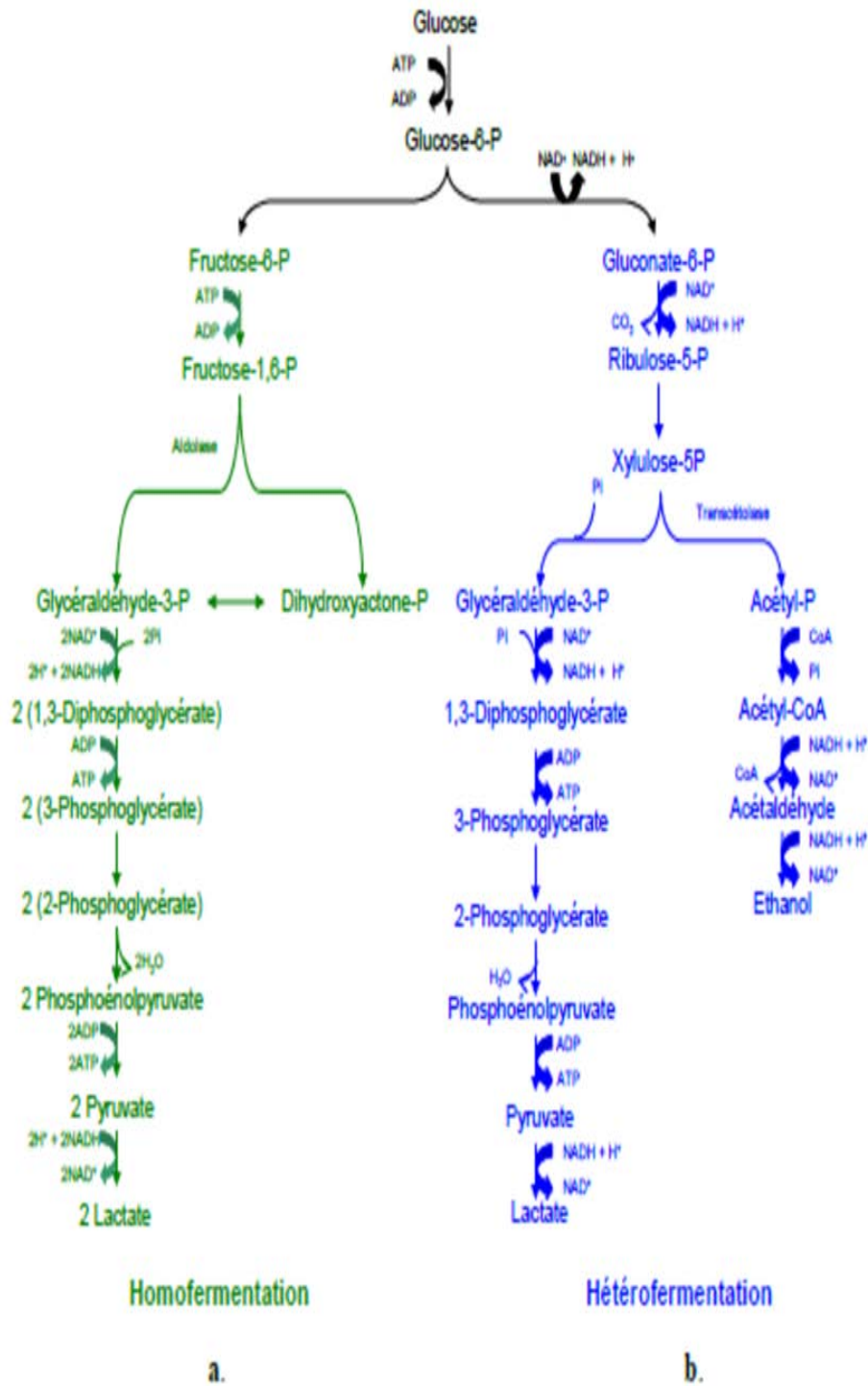


Figure -01 : Représentation schématisée des principales voies de fermentation des Hexoses chez les bactéries lactiques (Makhloufi., 2012).

II.4. Intérêt des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique.

II.4.1. Dans l'industrie alimentaire :

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateemet *al.*, 2008).

Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badiset *al.*, 2005).

L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu et Thonart., 2009).

Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth et Steele, 2001).

II.4.2. Dans le domaine thérapeutique :

Les bactéries lactiques apportent des bénéfices à la santé de l'hôte en stabilisant la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem et *al.*, 2008).

Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (Mkrtychyan et *al.*, 2010). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaishet *al.*, 2011).

Ueharaet *al.*, (2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

III. Antagonisme Bactérien :

L'antagonisme bactérien est un processus qui s'établit entre des espèces microbiennes productrices de substances antibactériennes : le développement d'une espèce se trouve affectée par la présence de l'autre (**Singleton., 1984**).

Plusieurs effets antibactériens ont été attribuer aux bactéries lactiques grâce à leur propriété de produire des substances antibactériennes qui sont : l'acide lactique et autre acides organiques, peroxyde d'hydrogène, Bactériocine, diacétyl et acétaldéhyde (**Leveau et al., 1991 ; Klaenhammer et al ., 1994 ; De Vuyst et Leroy., 2007**).

III.1. Les substances antibactériennes des Bactéries lactiques :

III.1.1. Les acides organiques :

Le métabolisme fermentaire permet une production important en acides organiques que ce soit par métabolisme homofermentaire ou hétérofermentaire, on obtient respectivement uniquement d'acide lactique ou d'acide acétique et formique, éthanol et de dioxyde de carbone. (**Liu., 2003**).

En général, la production d'acides organiques permet une acidification du milieu qui peut limiter la croissance de certaines bactéries entre autres les bactéries indésirables et pathogène par un effet bactériostatique ou bactéricide (**Brul et Coote., 1999**).

Leur utilisation est parfois inacceptable pour le consommateur du fait de leur haute valeur de concentration nécessaires pour inhiber les espèces pathogènes (**Kobilinskyet al., 2007**). L'effet de des acides organiques varie considérablement d'un microorganisme à un autre, par exemple L'acide lactique à pH 5 a un effet inhibiteur contre les bactéries sporulées mais il est inefficace contre les levures et les champignons (**Woolford., 1975**).

III.1.2. Le peroxyde d'hydrogène :

Du fait que les bactéries lactiques sont catalase négatives, certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) essentiellement par le métabolisme des glucides. Le peroxyde d'hydrogène est, depuis longtemps, reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organisme par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (**Zalanet al., 2005**).

L'intervention du peroxyde d'hydrogène dans les phénomènes d'inhibition par les bactéries lactiques a été évoquée par plusieurs auteurs. **Wheater et al., (1951)**, mettent en évidence l'activité antagoniste contre *Staphylococcus aureus* par *Lactobacillus lactis*. Ils montrent que l'agent inhibiteur est en fait le peroxyde d'hydrogène produit par le *Lactobacille* (**Mathotet et al., 1996**).

III.1.3. Le dioxyde de carbone CO₂ :

Les bactéries lactiques hétéro-fermentaire produisent du CO₂ en fin du métabolisme fermentaire du glucose. Ce qui favorise 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**).

III.1.4. Le Diacétyl :

Le diacétyl produit par nombre de bactéries lactiques est un inhibiteur actif contre de nombreux microorganismes, bactéries ou moisissures. Le diacétyl (C₄H₆O₂) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Son action inhibitrice est accrue en milieu acide, et les bactéries Gram négatives sont plus sensibles à l'action du diacétyle que les bactéries Gram positives (**Mathotet et al., 1996**).

Le diacétyle est une substance antimicrobienne efficace contre différentes bactéries Gram négatives et Gram positives, il agit en affectant l'utilisation de l'arginine (**Jay., 1986**) ; bien que les bactéries lactiques soient généralement résistantes (**Gill et Halley., 2003**). Les quantités de diacétyle produites par *Lc. Lactis* subsp. *Lactisbiovar. Diacetylactis* varient de 0,07 à 3,72 ppm (**Burrow et al., 1970**).

III.1.5. Acétaldéhyde :

Les quantités d'acétaldéhyde produites par les *Lactocoques* oscillent entre 2,60 et 6,50 mg/ml (**Bottazzi et Dellaglio., 1967**). Chez *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, l'action d'une thréonine aldolase, clive la thréonine en acétaldéhyde et en glycine. L'acétaldéhyde à une concentration de 10 à 100 ppm empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhimurium* et d'*E. coli* dans les produits laitiers (**Piard et Desmazeaud., 1991**).

La contribution de l'acétaldéhyde à la biopréservation est mineure puisque le seuil de saveur est beaucoup inférieur aux niveaux qui sont considérés nécessaires à l'inhibition des microorganismes (**Kulshrestha et Marth., 1974**).

III.1.6. La Reutéline :

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldehyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobique du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium* (**El-Zineyet al., 1998**).

La reutéline a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les procaryotes Gram-positif ou Gram-négatif, les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires. Elle interfère avec la réplication de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (**Vollenweider., 2004**).

III.1.7. Les Bactériocines :

Le terme « bactériocine » est employé pour la première fois par **Jacob et al., (1953)** pour les peptides à spécificité importante, produits par certaines souches et actifs contre les souches de la même espèce. La première bactériocine, nommé la colicine était produite par *Escherichia coli* S (**Gratia., 1925**).

Depuis, l'étude des bactériocines s'est élargie, **Rogers et Whitter (1928)**, furent les premiers à étudier les inhibiteurs des bactéries lactiques, et plus spécialement des lactocoques **Klaenhammer (1988)** définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice.

Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (**Klaenhammer., 1988**).

Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram+. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram- n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram- ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (**Klaenhammer., 1988**).

Les bactériocines sont utilisées comme additif naturels dans les aliments, en plus d'améliorer l'innocuité microbiologique de l'aliment elles permettent d'augmenter la durée de conservation du produit (**Rogers, 1928 ; Rogers et Whittier, 1928**).

La nisine qui a fait l'objet d'un brevet (**Blackburn et Projan, 1994**) est la seule bactériocine utilisée dans la prévention et le traitement des ulcères gastriques causés par *Helicobacter pylori* (**Gudcret al., 2000**).

Les bactériocines peuvent avoir trois types d'effets :

- Effet bactériostatique : se manifeste par un ralentissement ou arrêt de la croissance telle que la lactocine 27(**Piard et al., 1992**).
- Effet bactéricide : se traduit par une perte de la viabilité avec une lyse cellulaire telle que la nisine et la curvacine IFPL 105 (**Casla et al., 1996**).
- Effet bactéricide sans lyse cellulaire telle que la pédiocine SII (**Schved et al., 1994**).

IV. Les bactéries pathogènes :

Les bactéries pathogènes sont des microorganismes microbiens à l'origine de diverses pathologies et intoxication alimentaires, et le pouvoir pathogène conditionne le type de maladie et va dépendre de l'espèce bactérienne responsable de l'infection (**Carip et al., 2015**).

Ces bactéries pathogènes peuvent faire partie ou non de la flore commensale de l'homme et il existe deux grands types de bactéries pathogènes, le premier type regroupe les bactéries nocives uniquement pour les personnes dont les barrières naturelles sont affaiblies. Par exemple, certaines souches de *Escherichia coli* causent des maladies intestinales chez les enfants et les personnes âgées (**Caripet al., 2015**).

Le deuxième type correspond aux bactéries contagieuses des personnes saines, et on peut citer *Yersinia pestis*, bactérie responsable de la peste et *Vibrio cholerae* qui est l'agent du choléra (**Moraes et al., 2010**).

Pour inhiber la prolifération de ces bactéries pathogènes des traitements antibiotiques sont utilisés, ce qui a conduit à l'émergence du phénomène d'anti bio-résistance menaçant la santé de l'homme. Les recherches scientifiques sont actuellement orientées vers l'exploitation de nouvelles alternatives aux antibiotiques entre autres des substances antibactériennes naturelles comme les bactériocines des bactéries lactiques (**Dortu et Thonart., 2009**).

IV.1. *Staphylococcus aureus* :

Les Staphylocoques sont des bactéries ayant des formes Cocci disposées en amas (**Fig.-02**), sont Gram positif, immobiles, non sporulés, parfois encapsulés, catalase-positif et oxydase-négatif. L'espèce *S. aureus* (staphylocoque doré) se différencie des autres staphylocoques appelés staphylocoques à coagulas négative par la présence d'une coagulas (**Schmitt., 2006**).

Ce sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'homme et de l'animal. Chez l'homme, les *staphylocoques* en particulier les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis* font partie de la flore résidente cutanée de nombreux individus qui sont des « porteurs asymptomatiques » (**Bourgeois et al., 1996**).

Dix-sept de ces espèces sont retrouvées chez l'Homme. D'autres sont présentes chez les animaux ou dans les aliments (**Aouati., 2009**).

Ils sont la cause de différentes pathologies chez l'homme par leurs capacités d'adhésion aux cellules humaines ce qui accélère le processus de colonisation et d'infection ; par exemple : *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* sont responsables d'infection urinaire ; nosocomiale, etc.....(**Avril et al., 2000**).



Figure -02 : *Staphylococcus aureus* (Schmitt., 2006)

IV.2. *Escherichia coli* :

Escherichiacoli(**Fig.-03**)est un bacille ou coccobacille Gram négative de la famille des *Enterobacteriaceae.*, oxydase négative, catalase positive, sporulés. Ces bactéries réduisent les nitrates en nitrites, elles fermentent le glucose et sont anaérobie facultatives ;se multiplient facilement sur milieu ordinaire à pH neutre à une température de 37°C,ce sont des hôtes naturels de l'intestin de l'homme et des animaux et sont responsables d'intoxication alimentaire à cause d'un développement rapide et se sont des contaminants alimentaires très fréquent (contamination fécale directe ou indirect). (**Joseph ; 2003**).



Figure -03 : *Escherichia coli* (Bouvier., 2011).

IV.3. *Pseudomonas* :

Les bactéries du genre *pseudomonas* sont des bacilles à Gram négative aérobies, non capsulés, non sporulés, mobiles (plusieurs flagelles polaires), mésophiles, producteurs de pigment fluorescents ou pas. (Caripet *al.*, 2015).

Les *pseudomonas* vivent en saprophytes dans le sol, l'eau et les milieux humides, comme les eaux douces, les eaux thermales ; dans les robinetteries ou les réservoirs d'eau de pluie. Chez l'homme, *p.aeruginosa* se trouve dans la flore de la muqueuse nasale et comme flore de contamination sur la peau. Il peut également se trouver dans la flore intestinale, (Carip et *al.*, 2015).

Le germe est très souvent retrouvé aussi dans les hôpitaux et, du fait de sa résistance aux antibiotique, est souvent incriminé dans les infections nosocomiales. Il est capable de synthétiser une entérotoxine et des enzymes pathogènes comme la phospholipase ou la collagénase (Carip et *al.*, 2015).

Dans l'industrie agroalimentaire, les *pseudomonas* peuvent parfois entraîner des altérations des aliments par protéolyse ou par lipolyse. La protéolyse peut dégager des amines volatiles et /ou de l'ammoniac qui confèrent une odeur désagréable au produit (viandes, charcuterie, poissons).la lipolyse modifie les propriétés technologiques et gustatives des graisses (gout de rance, oxydation des acides gras insaturés) (Carip et *al.*, 2015).



Figure -04 : *Pseudomonas aeruginosa* a vue au microscope électronique

<http://www.keyword-suggestions.com/c3dpbW1pbmcgcG9uZA/>

IV.4. *Shigella* :

Les *shigelles* sont des bacilles à Gram négatif très proche d'*E. coli*, non capsulés, non sporulés, immobiles, catalase négatif et oxydase négative, capables de fermenter le glucose par fermentation lactique et ne nécessite qu'un milieu simple (gélose sang) avec une température de 37°C et se sont des entérobactéries responsables de syndromes dysentériques (Carip et al., 2015).

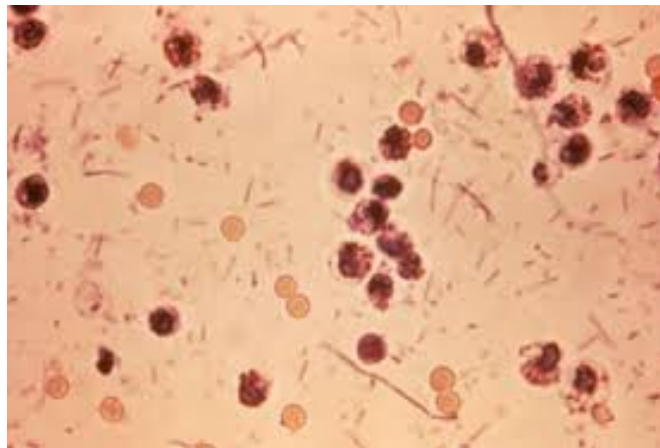


Figure -05 : *Shigella dysenteriae* a vue au microscope <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Shigella>

Chapitre II
Matériels et méthodes

Chapitre II
Matériels et méthodes

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Lieu de l'étude

L'intégralité de ce travail a été réalisé au laboratoire de recherche des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de Santé (LMBAFS) ; de l'université de Mostaganem, durant la période février-Avril de l'année 2017

2. Les souches bactériennes :

2.1. Les souches lactiques :

Les différentes souches de bactéries lactiques utilisées sont reportées dans le tableau-05 suivant :

Tableau -05 : L'origine des différentes souches lactiques utilisées.

Souche	Origine
LMBAFS 01	Lait de vache
LMBAFS 02	Lait de vache
LMBAFS 03	Lait de vache
LMBAFS 04	Lait de vache
LMBAFS 05	Lait de vache
LMBAFS 06	Lait de vache
LMBAFS 07	Lait de vache
LMBAFS 08	Lait de vache
LMBAFS 09	Lait de vache

2.2. Les souches pathogènes

Les différentes souches pathogènes utilisées dans cette expérimentale sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau -06 : La nature et l'origine de différentes souches pathogènes utilisées :

Souches	Référence	Milieu de culture
<i>Escherichia coli</i>	ATCC10536	Bouillon LB à 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Bouillon LBà 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Bouillon LBà 37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Bouillon LBà 37°C
<i>Shigelladysenteria</i>	CECT 457	Bouillon LBà 37°C

3. Matériels

Le matériel utilisé pour les différentes manipulations est représenté :

3.1.Appareillage

- ❖ Autoclave (Réf : 13245, AVX 90 E, GETINGF, France).
- ❖ Agitateur magnétique chauffant (Réf : F20520162, AREX VELP, France).
- ❖ Vortex (Réf : R800003684, Stuart, Conçu par le Royaume-Uni/fabriqué en RPC).
- ❖ Bain marie(Réf : D 3165, KOTTERMANN, Allemagne).
- ❖ Balance(Réf : D-72336, KERN-KB 6000-1, Allemagne).
- ❖ Spectrophotomètre (Réf : JENWAY-7305, Royaume-Uni).
- ❖ Etuve (Réf : HRDP-150AB, Chine).
- ❖ Réfrigérateur
- ❖ Centrifugeuse
- ❖ Incubateur à 37°C
- ❖ Microscope optique
- ❖ pH-mètre

3.2. Petit matériel

- ❖ Boite de Pétri
- ❖ Pipette Pasteur
- ❖ Tube à Essai
- ❖ Tube Eppendorf
- ❖ Tube de centrifugation
- ❖ Erlen Meyer
- ❖ Flacons en verre (250ml)
- ❖ Béchers de 500ml
- ❖ Micropipette (200 µl et 1000 µl)
- ❖ Anse de platine

3.3. Milieux de culture :

Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

Les différents milieux de culture utilisés sont :

- ❖ Milieux MRS (milieu de Man, Rogosa et Sharpe) pour la réactivation des bactéries lactiques.
- ❖ Bouillon BHI (Brainheart infusion) et milieu LB : pour réactivation des bactéries pathogènes.
- ❖ Milieu GN.

Remarque : la composition des milieux est illustrée en Annexe.

4. Méthodes :

4.1. Réactivation des souches

Les souches bactériennes ont été réactivées avant leur utilisation dans les tests d'inhibition à partir d'un stock de culture sur des milieux gélosés, réalisées sur milieu MRS liquide pour les bactéries lactiques, et milieu LB pour les bactéries pathogènes à raison de 5 ml de milieu de culture dans chaque tube ; ensuite, elles sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

4.2. Vérification et purification des souches pathogènes et lactiques :

Les Cinq souches pathogènes conservés dans du BHIB additionné de 15% de glycérol ont été réactivés en bouillon LB et incubés à 37°C pendant 24 H puis ensemencés sur gélose nutritive, et incubés à 37°C pendant 24 H ; la technique a été répétée trois fois pour s'assurer de leurs puretés. Ainsi que les 09 souches lactiques conservés dans du MRS à 15% de glycérol ont été réactivés en bouillon MRS et incubés à 37°C pendant 24 H puis ensemencés sur gélose MRS, et incubés à 37°C pendant 24 H ; des tests de catalase et de coloration de Gram nous ont permis de s'assurer de la pureté des souches.

4.2.1. Examen macroscopique :

La croissance des souches sur milieux MRS solide permet d'observer l'aspect des colonies (la taille, la forme, la couleur), et la détection des troubles dans le bouillon MRS (**Badiset al., 2005**) permet de confirmer la croissance des bactéries.

4.2.2. Examen microscopique :

Des observations microscopiques ont été effectuées pour déterminer la forme des cellules des bactéries lactiques utilisées après coloration de Gram :

➤ Technique de coloration de Gram (Baldent., 1997) :

- Réaliser un frottis et fixer.
- Plonger la lame dans le violet de gentiane (ou cristal violet) phéniqué pendant 1 minute.
- Laver la lame à l'eau distillée.
- Plonger la lame dans une solution de lugol pendant 1 minute
- Laver à l'eau distillée
- Décolorer dix secondes à l'alcool.
- Rincer immédiatement à l'eau distillée
- Plonger la lame dans la safranine (ou la fuchsine) phéniquée pendant 1 minute
- Laver la lame à l'eau distillée.
- Sécher la lame en la tamponnant avec du papier Joseph.

- Observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile.

- **4.2.3. Test catalase :**

Certaines bactéries, durant leur respiration produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), ce dernier est très toxique cependant certaines bactéries ont la capacité de le dégrader grâce à la catalase selon la réaction suivante : $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Sur une lame, on dépose une colonie provenant d'une culture pure avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O₂) (Marchal *et al.*, 1991).

5. Cinétique de croissance bactérienne :

5.1. Les souches pathogènes :

La première pré-culture est réalisée dans 25 ml de bouillon LB contenue dans un tube ensemencé par 1600 µL ce mélange a été agité par un vortex. Puis étuvées à 37°C pendant 8 heures. et le suivi de la croissance se fait par la mesure de la densité optique à 600 nm pour toutes les souches à des intervalles de temps : 0h ; 1h ; 2h ; 3h ; 4h ; 5h ; 6h ; 7h ; 8h.

5.2. Les souches lactiques :

La première pré-culture est réalisée dans 25 ml de bouillon MRS contenue dans un tube ensemencé par 1600 µL ce mélange a été agité par un vortex. Puis étuvées à 37°C pendant 24 heures. et le suivi de la croissance se fait par la mesure de la densité optique à 600 nm pour toutes les souches à des intervalles de temps : 0h ; 1h ; 2h ; 3h ; 4h ; 5h ; 6h ; 7h ; 8h, jusqu'à 24h. (Dilmibouras., 2002 ; Metlef et Dilmibouras., 2009).

6. Etude de l'activité antibactérienne des souches bactériennes isolées :

6.1. Pré-culture des souches pathogènes :

Les cinq souches pathogènes ont été ensemencées sur milieu LB. Un volume de 5 ml de milieu de culture dans chaque tube est inoculé par 100 µl de la bactérie pathogène. Les

c

u

t

u

r

e

6.2. Pré-culture des souches lactiques :

Les 09 souches lactiques ont étéensemencées sur milieu MRS. Un volume de 10 ml de milieu de culture dans chaque tube est inoculé par 100µl de la bactérie lactique. Les cultures sont incubées à 37°C pendant 18 heures. (Dilmibouras., 2002 ;Metlef et Delmibouras .,2009)

6.3. Test d'antagonisme bactérien :

6.3.1. Méthode de diffusion en puits ADT (Agar well Diffusion Test) :(méthode de Barefoot et al., 1983) :(cette méthode est utilisée pour tous les tests réalisés)

Selon la technique de Barefoot et al., en (1983), cette méthode consiste à mettre le surnageant de la souche lactique en contact avec la souche indicatrice pathogène. Les souches lactiques produisent des substances pouvant diffuser dans le milieu de culture semi solide. Les souches

i

n

d

i

6.3.2. Détermination de la nature des substances antimicrobiennes :

c

Cette étude permet la mise en évidence du test d'antagonisme bactérien avec le surnageant des souches lactiques : Les bactéries lactiques sont récupérées après incubation et une centrifugation est réalisée à 3000 tr /min pendant 10min. Le surnageant récupéré est testé par la méthode ADT (neutralisé et non neutralisé) :

c

A. Surnageant non neutralisé:

e

- Les bactéries lactiques sont récupérées après incubation et une centrifugation est réalisée à 3000 tr /min pendant 10min.

s

- Filtration du surnageant par les filtres.

s

- Le surnageant récupéré est testé par la méthode ADT.

o

n

e

n

- Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures, les résultats apparaissent sous forme de zone d'inhibition autour des puits.

B. Surnageant neutralisé à pH 7 par une solution de NaOH. (Figure-07).

- Les bactéries lactiques sont récupérées après incubation et une centrifugation est réalisée à 3000 tr /min pendant 10min.
- Neutraliser le surnageant à pH 7.
- Filtration du surnageant neutralisé par les filtres.
- Le surnageant neutralisé récupéré est testé par la méthode ADT.
- Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures, les résultats apparaissent sous forme de zone d'inhibition autour des puits.

La présence de zone inhibition formées autour des puits est examinée après 24h à 48h d'incubation (**Hwanhlemet *al.*, 2011**).

La lecture de l'activité antimicrobienne se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour du puits (Z_i), exprimée en mm (**Allouacheet *al.*, 2010**).

Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm **Thompson et *al.*, (1996)** cité par **Doumandjiet *al.*, (2010)**.

Z_i en (mm) = diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm) – diamètre de puits (6 mm)

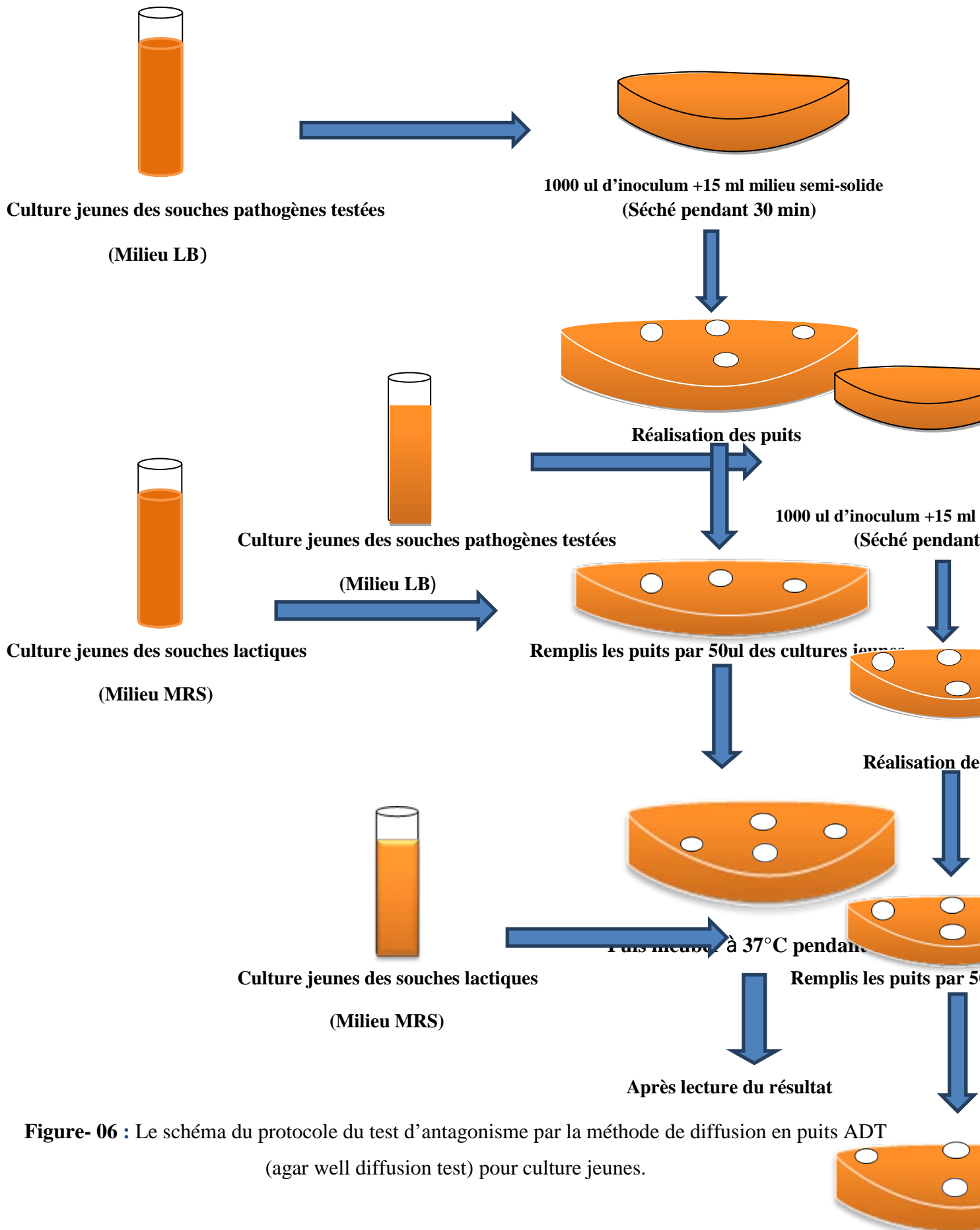


Figure- 06 : Le schéma du protocole du test d'antagonisme par la méthode de diffusion en puits ADT (agar well diffusion test) pour culture jeunes.

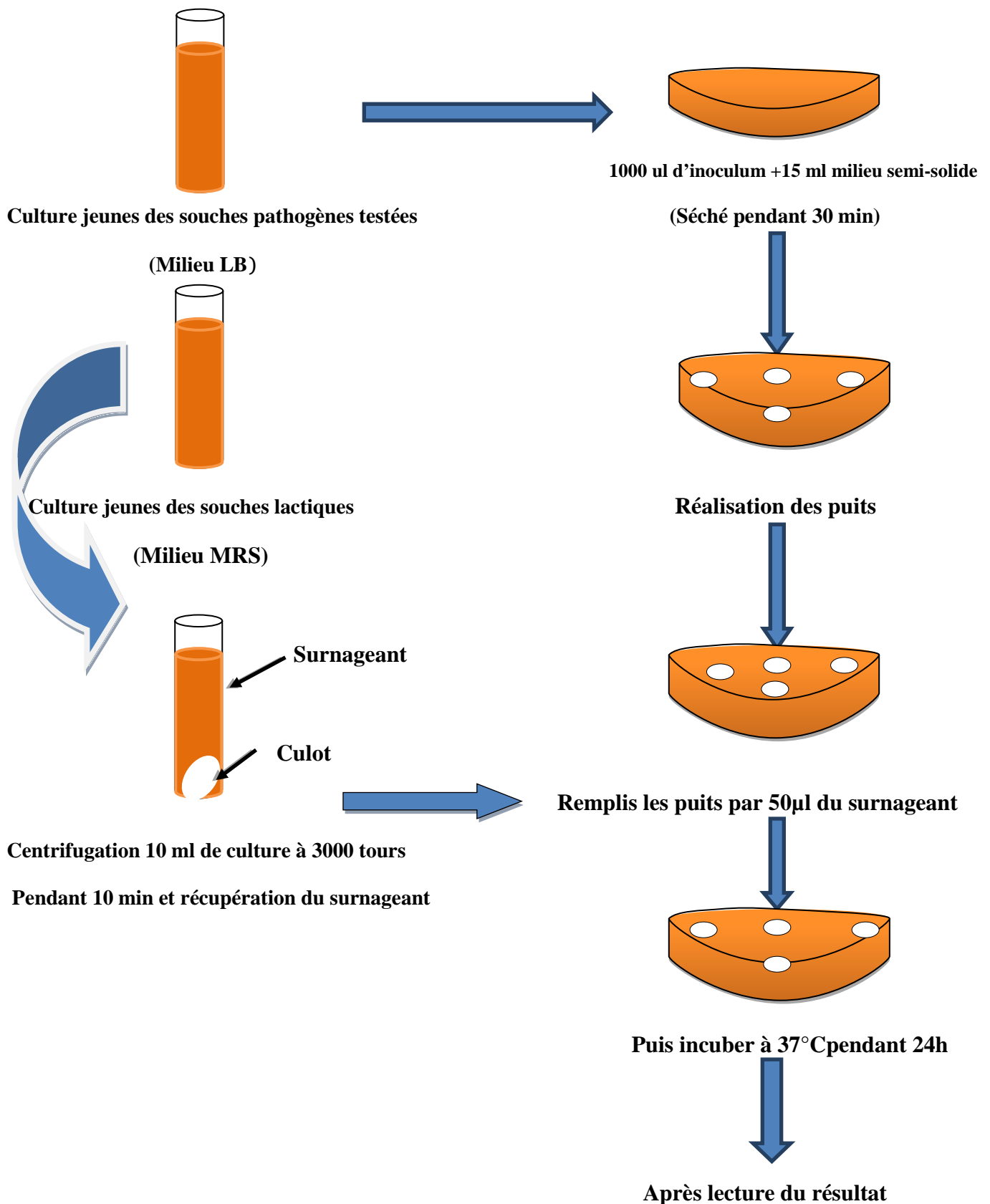


Figure- 07 : Le schéma du protocole du test d'antagonisme par la méthode de diffusion en puits ADT (agar well diffusion test) pour surnageant.

Chapitre III
Résultats et discussion

1. Aspect macroscopiques des isolats :

La croissance bactérienne sur les différents milieux solides, nous a permis d'identifier les différents aspects culturaux des colonies des bactéries lactiques, par observation macroscopique. Après une incubation de 24 h, 48 h à 72 h sur milieux solides (MRS), nous avons obtenus différentes formes de colonies, de contours réguliers ou irréguliers, de couleurs pales transparentes et d'autres opaques (Figure-08)



Figure-08 : Observation macroscopique des colonies des bactéries lactiques sur milieu MRS(Solide).

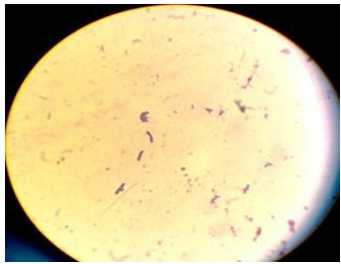
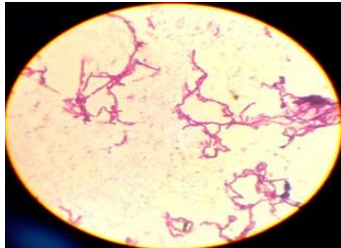
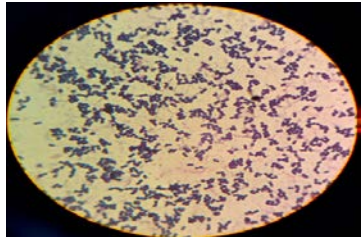
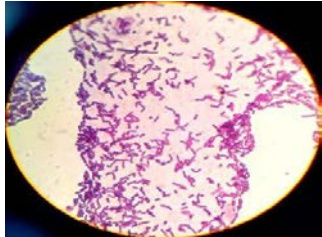
2. Aspect microscopiques des isolats:


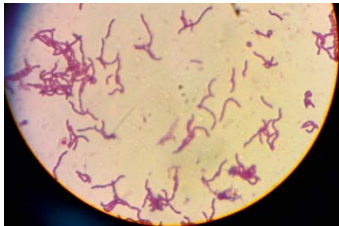
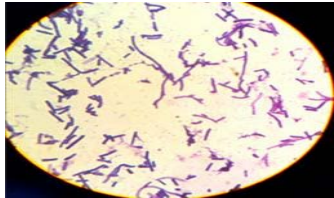
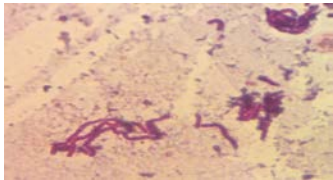
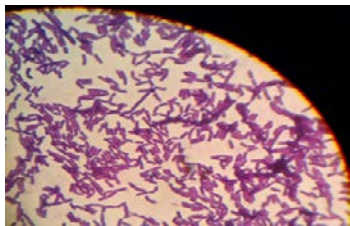
L'observation microscopique après coloration de Gram, a révélé que les bactéries lactiques utilisées sont des Gram positif et la forme des cellules bactériennes varie entre les formes bacillaires (lactobacilles) et les formes coccidés (lactocoques/Entérocoques).

Les bactéries lactiques sont: Gram positif, catalase négative; peuvent se présenter comme des bâtonnets ou cocco bacilles et sont reconnues comme lactobacilles, aussi ils peuvent êtres sous forme coccidé et sont reconnues comme *entérocoques*, *streptocoques*, *pédiocoques* et *lactocoques* selon leurs différents modes d'associations (**Kandler et wise.,1986**).

Les différentes formes cellulaires des souches de bactéries lactiques utilisées sont reportées dans le tableau-07 suivant:

Tableau -07 : Observation microscopiques des différentes souches lactiques utilisées.

Souche	Milieu de Culture	Température D'isolement	Catalase	Gram	Origine	Observation
LMBAFS01	MRS	37°C	négative	positive	Lait de vache	Bacille isolée à diplo 
LMBAFS02	MRS	37°C	négative	positive	Lait de vache	Bacille épais en chaîne court 
LMBAFS03	MRS	37°C	négative	positive	Lait de vache	Cocci 
LMBAFS04	MRS	37°C	négative	positive	Lait de vache	Bacille 

LMBAFS05	MRS	37°C	négative	Positive	Lait de vache	Bacille très court 
LMBAFS06	MRS	37°C	négative	Positive	Lait de vache	Bacille 
LMBAFS07	MRS	37°C	négative	Positive	Lait de vache	Bacille 
LMBAFS08	MRS	37°C	négative	Positive	Lait de vache	Bacille 
LMBAFS09	MRS	37°C	négative	Positive	Lait de vache	Bacille en chaine 

3. La cinétique de croissance des souches

3.1. Les souches lactiques

D'après l'analyse des cinétiques de croissance, on distingue que les 09 souches lactiques sélectionnées présentent presque le même profil de croissance une phase d'adaptation au milieu pendant les quatre premières heures en phase de latence ensuite une phase exponentielle, et elles atteignent ensuite leurs phases stationnaires avec des densités optiques variables selon l'espèce bactérienne, les résultats obtenues sont illustrés ci dessous:

A. La cinétique de croissance de la souche S01:

La croissance et la cinétique de la souche lactique S01 a été étudiée sur le milieu MRS à 37°C pendant 24 heures, la souche atteint la phase stationnaire au bout de 16 d'incubation avec une densité optique (DO) de 0.170 (figure-09)

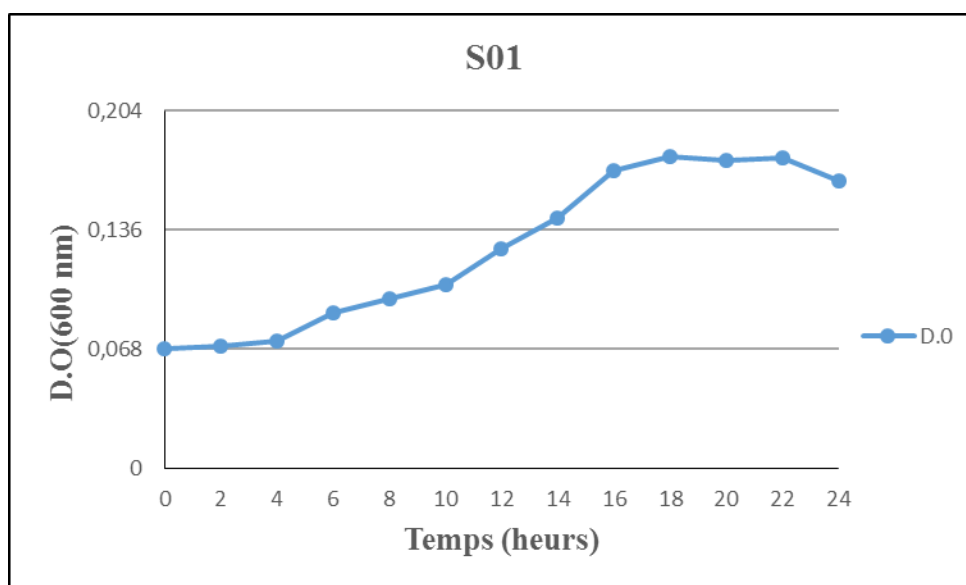


Figure -09 : La courbe de croissance de la souche S01.

B. La cinétique de croissance de la souche S02 :

La croissance et la cinétique de la souche lactique S02 a été étudiée sur le milieu MRS à 37°C pendant 24 heures, la souche S02 atteint la phase stationnaire au bout de 16 d'incubation avec une densité optique (DO) de 0.128 (figure-10).

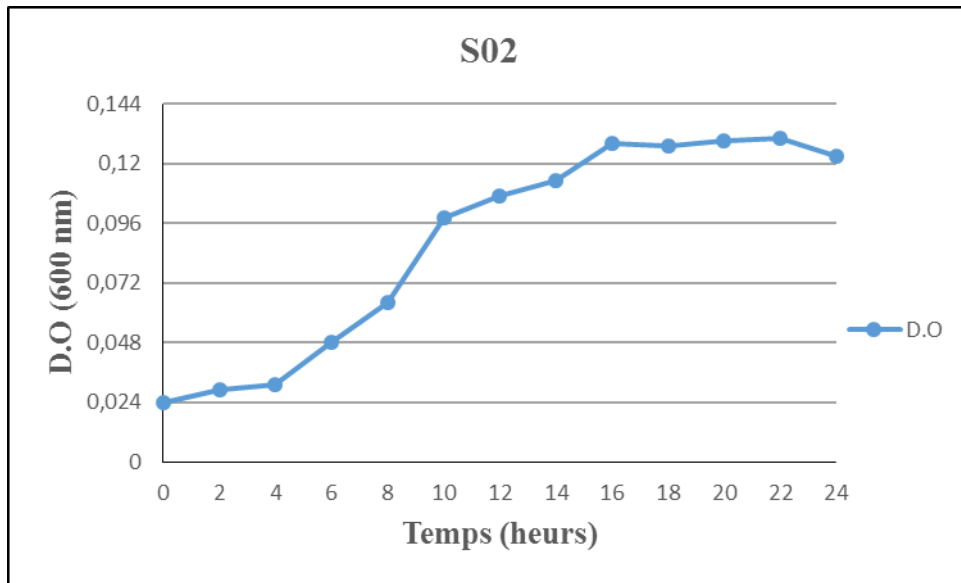


Figure -10 : La courbe de croissance de la souche S02.

C. La cinétique de croissance de la souche S03:

La croissance et la cinétique de la souche lactique S03 a été étudiée sur le milieu MRS à 37°C pendant 24 heures, la souche S03 atteint la phase stationnaire au bout de 16 d'incubation avec une densité optique (DO) de 0.125 (figure-11).

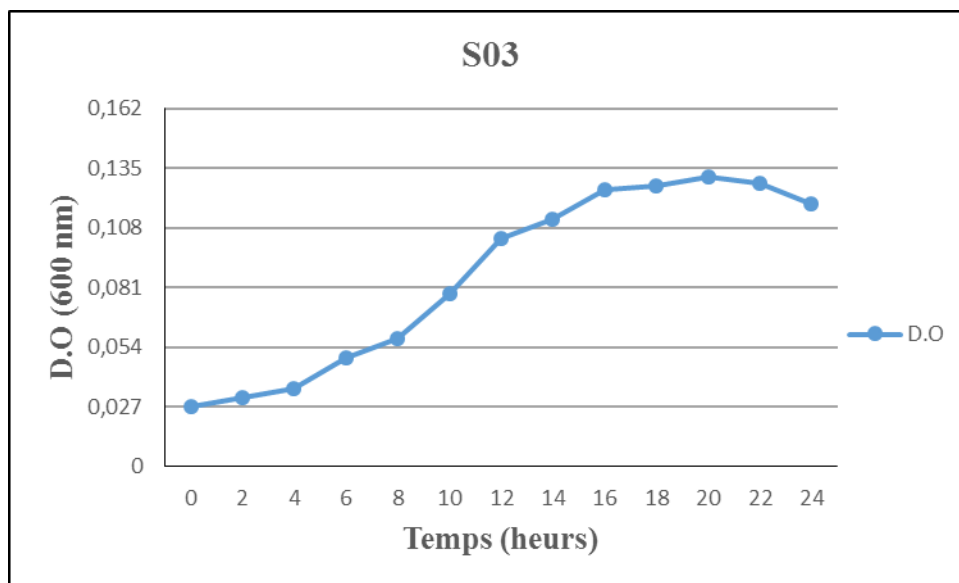


Figure -11 : La courbe de croissance de la souche S03.

D. La cinétique de croissance de la souche S04:

La croissance et la cinétique de la souche lactique S04 a été étudiée sur le milieu MRS à 37°C pendant 24 heures, la souche S04 atteint la phase stationnaire au bout de 16 d'incubation avec une densité optique (DO) de 0.159 (figure-12).

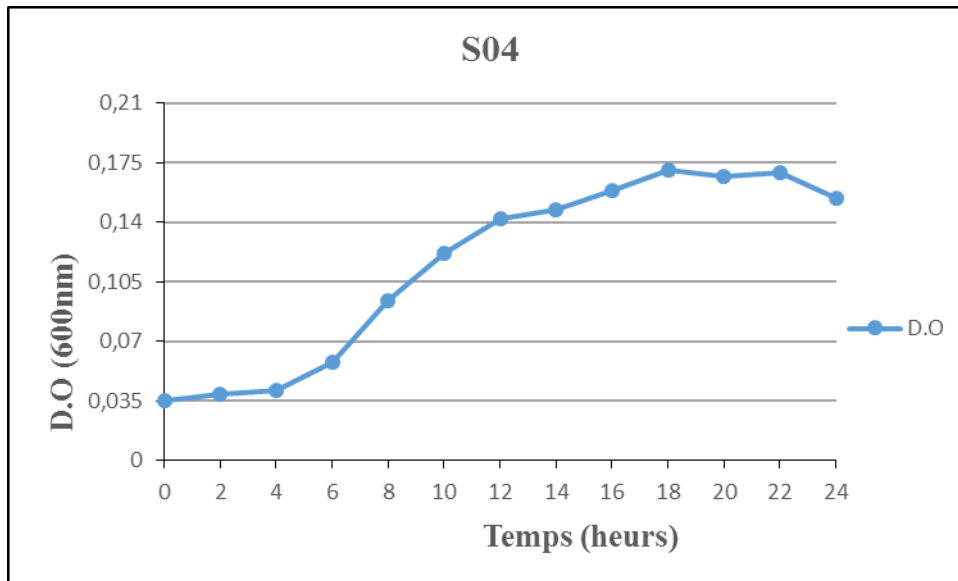


Figure -12 : La courbe de croissance de la souche S04.

E. La cinétique de croissance de la souche S05:

La croissance et la cinétique de la souche lactique S05 a été étudiée sur le milieu MRS à 37°C pendant 24 heures, la souche S05 atteint la phase stationnaire au bout de 16 d'incubation avec une densité optique (DO) de 0.132 (figure-13).

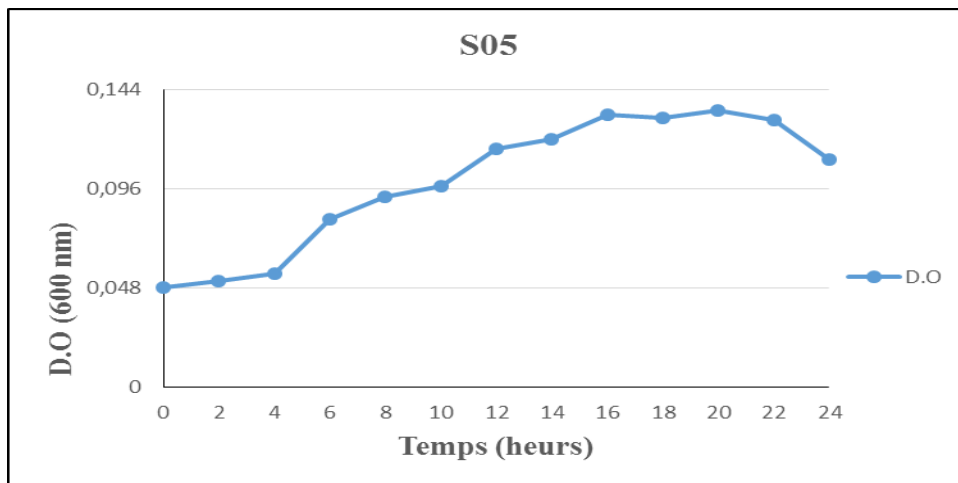
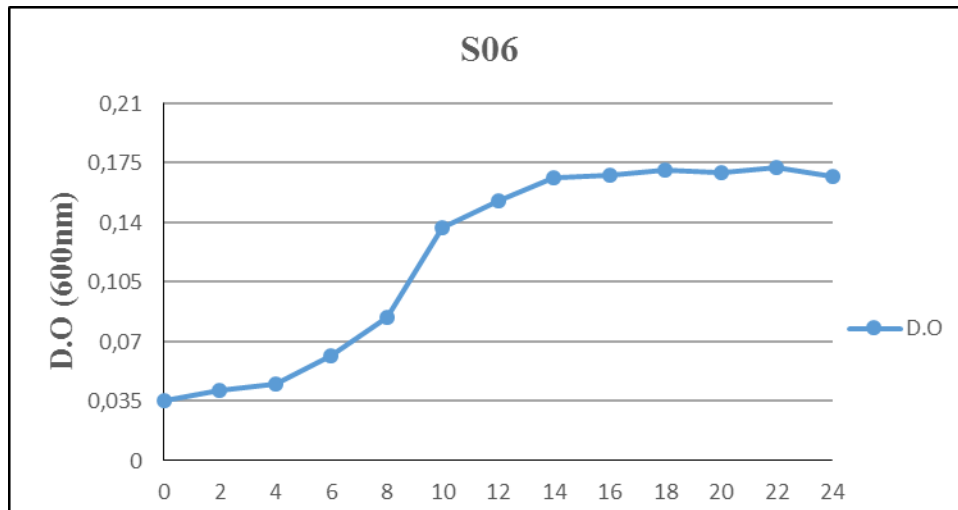


Figure -13 : La courbe de croissance de la souche S05.

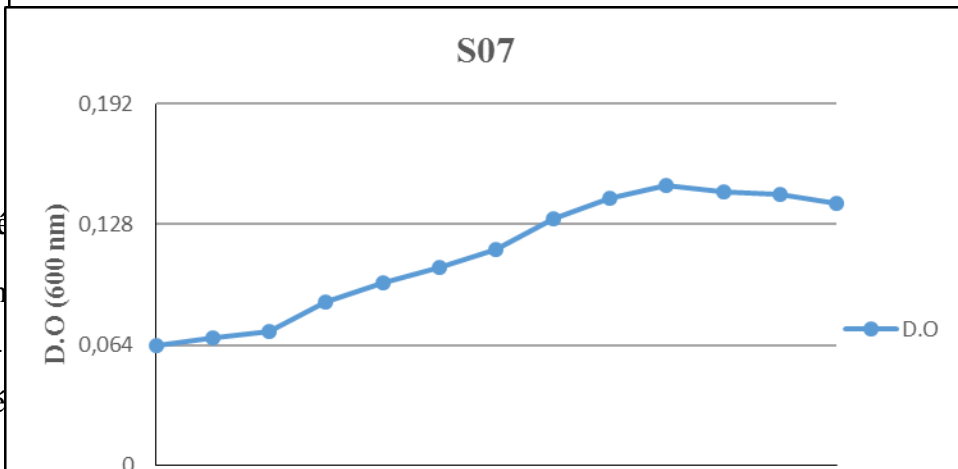
F. La cinétique de croissance de la souche S06:

La croissance et la cinétique de la souche lactique S06 a été étudiée sur le milieu MRS à 37°C pendant 24 heures, la souche S06 atteint la phase stationnaire au bout de 16 d'incubation avec une densité optique (DO) de 0.168 (figure-14).



G. La ciné

La croissan
pendant 24
une densité



à 37°C
on avec

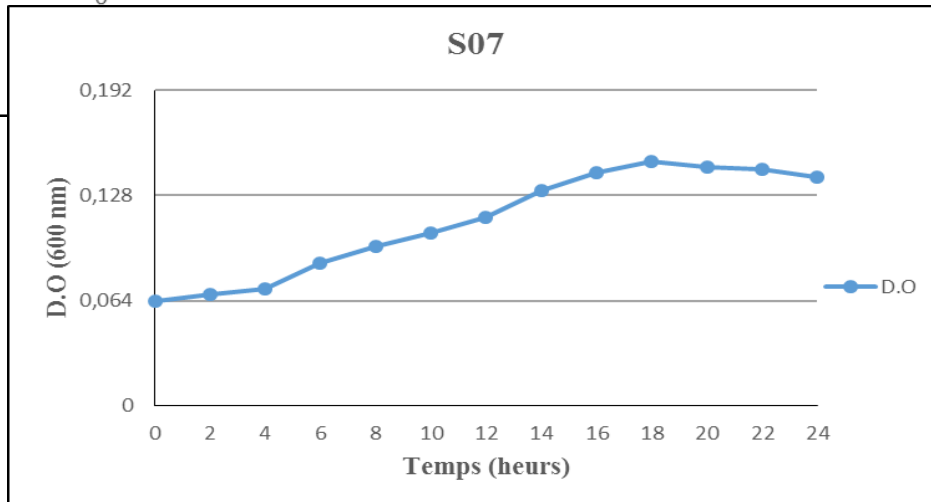


Figure -15 : La courbe de croissance de la souche S07.

H. La cinétique de croissance de la souche S08 :

La croissance et la cinétique de la souche lactique S08 a été étudiée sur le milieu MRS à 37°C pendant 24 heures, et on relève que la souche S08 atteint la phase stationnaire au bout de 16 d'incubation avec une densité optique (DO) de 0.126 (figure-16).

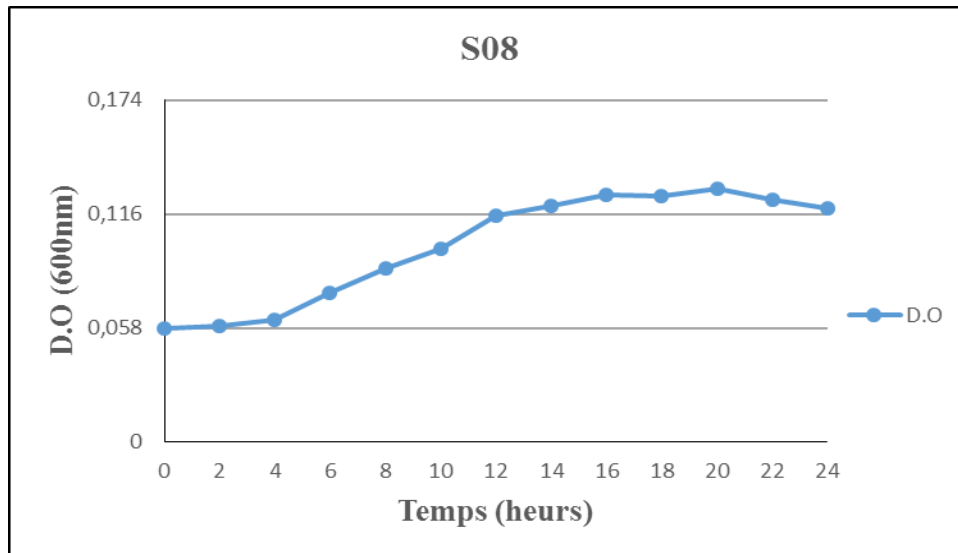


Figure -16 : La courbe de croissance de la souche S08.

I. La cinétique de croissance de la souche S09 :

La croissance et la cinétique de la souche lactique S09 a été étudiée sur le milieu MRS à 37°C pendant 24 heures, et la souche S09 atteint la phase stationnaire au bout de 16 d'incubation avec une densité optique (DO) de 0.132 (figure-17).

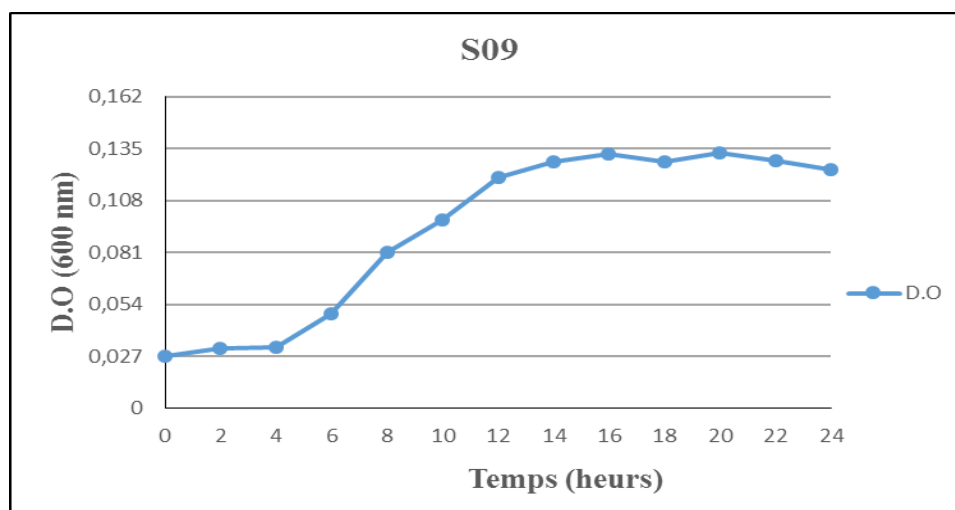


Figure -17 : La courbe de croissance de la souche S09.

3.2. Les souches pathogènes :

L'étude des cinétiques de croissance des souches indicatrices (pathogènes), révèle que les cinq souches pathogènes sélectionnées présentent le même profil cinétique au début de la phase exponentielle, et elles atteignent leur phase stationnaire au bout de 8 heures d'incubation avec des densités optiques variables selon l'espèce comme le montrent la figure suivante:

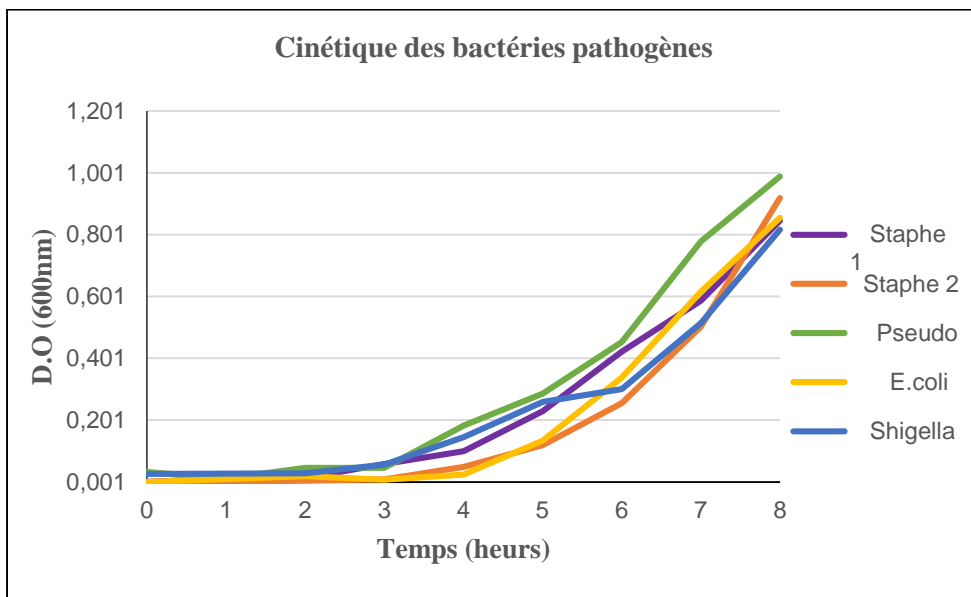


Figure - 18 : La courbe de croissance des cinq souches pathogènes.

4. Antagonisme bactérien :

Dans le but de sélectionner les bactéries lactiques à fort pouvoir antibactérien un test d'antagonisme bactérien à été mis en évidence contre les 05 souches pathogènes afin de déterminer l'aptitude des 09 souches lactiques à inhiber la croissance de ces dernières.

4.1. Méthode de puits ADT (Agar Well Diffusion Test) (Cultures jeunes)

Dans un premier temps de notre étude, les 9 souches lactiques ont été testées pour leurs activités antagonistes vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes. Les résultats obtenus sont démontrés par les photos suivantes :



Figure-19 : Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène *S.aureus* ATCC 6538



Figure-20: Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène *Ps.aeruginosa* ATCC 27853



Figure-21: Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène *Sh.dysenteria* CECT 457

La variation des diamètres des zones d'inhibition des souches lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes est représenté par le tableau suivant :

Tableau- 08 : Résultats de diamètre de la zone inhibition (mm) des souches lactiques contre les souches pathogènes. (Cultures jeunes).

Souche indicatrice Souches Lactiques	<i>S.aureus</i> ATCC 6538	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Sh.dysenteria</i> CECT457	<i>E.coli</i> ATCC 10536	<i>S.aureus</i> ATCC 25923
S 01	03 mm	00 mm	06 mm	00 mm	00 mm
S 02	06 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm
S 03	02 mm	00 mm	04 mm	00 mm	00 mm
S 04	06 mm	06 mm	03 mm	00 mm	00 mm
S 05	14 mm	08 mm	08 mm	00 mm	00 mm
S 06	00 mm	04 mm	00 mm	00 mm	00 mm
S 07	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm
S 08	00 mm	00 mm	03 mm	00 mm	00 mm
S 09	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm

Les souches lactiques LMBAFS04 et LMBAFS05 ont exercé une activité antagoniste contre trois souches indicatrices : *S.aureuse* ATCC 6538, *Ps.aeruginosa* ATCC 27853 et *Sh.dysenteria* CECT 457, avec des diamètres d'inhibition de (6-14 mm), (6-8 mm) et (3-8 mm) Respectivement.

La souche lactique LMBAFS01 présente une inhibition contre deux souches pathogènes *S.aureuse* ATCC 6538 et *Sh.dysenteria* CECT 457 avec les diamètres d'inhibition (3 mm) et (6 mm).

La souche lactique LMBAFS02 à une activité antagoniste contre une seul souche pathogène *S.aureuse* ATCC 6538 avec un diamètre d'inhibition (14 mm).

La souche lactique LMBAFS03 présente une inhibition contre deux souches pathogènes *S.aureuse* ATCC 6538 et *Sh.dysenteria* CECT 457 avec les diamètres d'inhibition (2 mm) et (4 mm).

Les diamètres d'inhibition des souches LMBAFS06 (4 mm) et LMBAFS07 (2 mm) révèlent une activité antibactérienne contre *Ps. aeruginosa*.

Les souches LMBAFS03 et LMBAFS08 ont donné une inhibition contre la souche pathogène *Sh.dysenteria* CECT 457 avec des diamètres d'inhibition de (4 mm) et (3 mm).

Les 09 souches utilisées ne présentent pas tous le même mode d'action vis-à-vis des différentes souches indicatrices :

Ces résultats primitif révèlent que nos souches lactiques sont capables de produire des substances inhibitrices responsables de cette activité antibactériennes, car il été démontré que l'activité antagonistes chez les bactéries lactiques est due à la synthèse de substances antibactériennes (**Kleanhammer.,1988**).

Aussi les bactéries lactiques sont connues par la production de plusieurs composés antimicrobien comme: les acides organiques (lactiques), le diacétyl, peroxyde d'hydrogène ainsi que les bactériocines (**Aslam et Qazi., 2010**).

Plusieurs études ont démontré des activités antagonistes chez les bactéries lactiques comme les travaux de **Allouche et al., (2010)** qui ont révélé une activité antibactérienne de souches de *lactobacilles thermophilles* contre *Staphylococcus aureus*, *Eschérichia coli* et *pseudomonas aeroginosa* ; due à la production d'une Bactériocines.

4.2.Localisation et Détermination de la nature de la substance antibactérienne:

➤ Test d'antagonismes bactérien avec le Surnageant non neutralisé:

Dans un second temps de notre étude,les surnageant des 09souches lactique sont été testée spour leurs activités antagonistes vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes afin de localiser la substance antibactérienne dans la fraction extracellulaire (surnageant).

Les résultats obtenus sont démontrés par les photos suivantes:



Figure-22: Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène *S.aureus* ATCC 6538



Figure-23: Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène *Sh.dysenteria* CECT 457

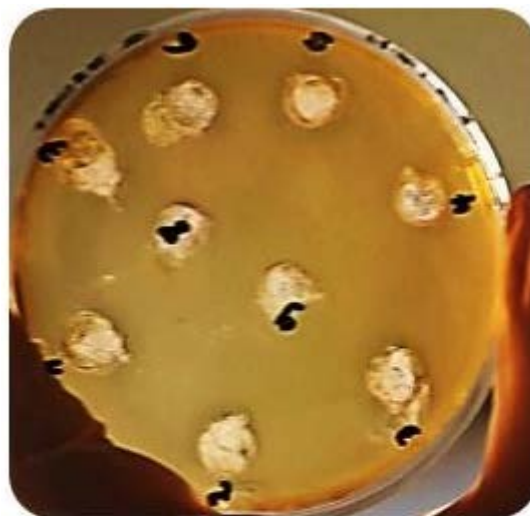


Figure-24: Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène *Ps.aeruginosa* ATCC 27853

La variation des diamètres des zones d'inhibition des souches lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes est représenté par le tableau suivant :

Tableau-09 : Résultats de diamètre de la zone inhibition (mm) des souches lactiques contre les souches pathogènes. (Surnageant non neutralisé).

Souche indicatrice Souches Lactiques	<i>S.aureus</i> ATCC 6538	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Sh.dysenteria</i> CECT457	<i>E.coli</i> ATCC 10536	<i>S.aureus</i> ATCC 25923
S 01	07 mm	00 mm	06 mm	00 mm	00 mm
S 02	06 mm	00 mm	08 mm	00 mm	00 mm
S 03	03 mm	03 mm	03 mm	00 mm	00 mm
S 04	06 mm	04 mm	02 mm	00 mm	00 mm
S 05	14 mm	06 mm	06 mm	00 mm	00 mm
S 06	00 mm	02 mm	03 mm	00 mm	00 mm
S 07	00 mm	02 mm	00 mm	00 mm	00 mm
S 08	00 mm	00 mm	02 mm	00 mm	00 mm
S 09	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm

Les souches lactiques LMBAFS03, LMBAFS04 et LMBAFS05 ont exercé une activité antagoniste contre trois souches indicatrices : *S.aureuse* ATCC 6538, *Ps.aeruginosa* ATCC 27853 et *Sh.dysenteria* CECT 457, avec des diamètres d'inhibition de (3-6-14 mm), (3-4-6 mm) et (3-2-6 mm) Respectivement.

Les souches lactiques LMBAFS01 et LMBAFS02 ont exercé une activité antagoniste contre deux souches indicatrices : *S.aureuse* ATCC 6538 et *Sh.dysenteria* CECT 457, avec des diamètres d'inhibition de (7-6 mm), (6-8mm) Respectivement.

La souche lactique LMBAFS06 présente une inhibition contre deux souches pathogènes *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 et *Sh.dysenteria* CECT 457 avec les diamètres d'inhibition (2 mm) et (3 mm).

La souche lactique LMBAFS07 à une activité antagoniste contre une seul souche pathogène *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 avec un diamètre d'inhibition (02 mm).

La souche lactique LMBAFS08 à une activité antagoniste contre une seul souche pathogène *Sh.dysenteria* CECT 457 avec un diamètre d'inhibition (02 mm).

D'après les résultats obtenus par le test d'antagonisme bactérien avec le surnageant natif nous constatons que la substance inhibitrice se trouve bien dans la fraction extracellulaire (surnageant) et plusieurs recherches confirment que les fraction extracellulaires contiennent les substances antibactériennes (**Dilmi Bouras ., 2002 ;Labioui et al.,2005; Metlef et Dilmi Bouras .,2009**).

Il est nécessaire de noter que l'absence d'antagonisme bactérien avec le surnageant n'exclue pas l'existence de substances antibactérienne. (**Ammors et al., 2006**).

4.3. Méthode de puits ADT (Agar Well Diffusion Test) (Surnageant neutralisé) :

Pour la dernière étape de notre étude ,les surnageant neutralisés des 09souches lactique sont été testée spour leurs activités antagonistes vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes afin de déterminer la nature des substances inhibitrices.

La neutralisation des surnageant nous permetts d'éliminer l'effet des acides organiques au profit des autres substances (**Dilmi Bouras ., 2002 ;Metlef et Dilmi Bouras., 2009**); les résultats obtenus sont démontrés par les photos suivantes:



Figure-25: Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène S.aureus ATCC 6538

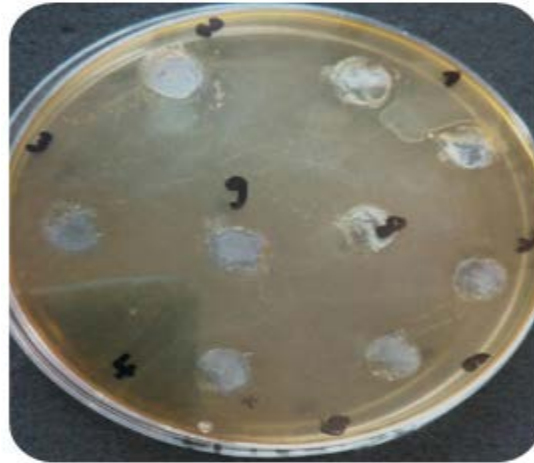


Figure-26: Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène Sh.dysenteria CECT 457



Figure-27: Antagonisme des souches lactiques contre la souche pathogène Ps.aeruginosa ATCC 27853

La variation des diamètres des zones d'inhibition des souches lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes est représenté par le tableau suivant :

Tableau-10 : Résultats de diamètre de la zone inhibition (mm) des souches lactiques contre les souches pathogènes. (Surnageant neutralisé et filtrée).

Souche indicatrice Souches Lactiques	<i>S.aureus</i> ATCC 6538	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Sh.dysenteria</i> CECT457	<i>E.coli</i> ATCC 10536	<i>S.aureus</i> ATCC 25923
S 01	06 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm
S 02	06 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm
S 03	02 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm
S 04	04 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm
S 05	12 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm
S 06	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm
S 07	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm
S 08	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm
S 09	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm

Les résultats obtenus, après élimination de l'effet des acides organiques par neutralisation et filtration des surnageant des différentes souches lactiques, montrent que l'activité antagoniste contre; *E.coli*; *Shigelle*; et *S. aureus* est totalement absente chez toute les souches lactiques et on constate une perte de l'activité antagoniste pour les souches S03.S04.S05. S06 et S07 contre *Pseudomeunas aeroginosace* qui suggère que l'agent responsable de l'interaction avec le surnageant natifest les acidesorganiques.

Les souches lactiques LMBAFS01, LMBAFS02, LMBAFS03, LMBAFS04 et LMBAFS05 ont une activité antagoniste contre une seul souche pathogène *S. aureus* ATCC 6538 avec des diamètres d'inhibition variables (06 mm),(6 mm),(02mm),(04 mm) et (12 mm), ce qui nous permet de dire qu'il existe bien d'autres substances inhibitrices chez les souches :S01;S02;S03;S04; et S05 qui peuvent être: Le H2O2; le

diacétyl et les bactériocines.

Bourgeois et Iarpent., (1996) ; ont démontré des phénomènes d'inhibition de différents contaminants par le peroxyde d'hydrogène chez certaines bactéries lactiques lorsqu'il est libéré à des concentrations suffisantes.

D'autres études révèlent la production de bactériocines chez des souches de *lactococcus*(**Campos et al.,2006**); par exemple la nisine produite par *lc.lactis ssp lactis* qui inhibe presque la plupart des germes à gram positif et la diplococcine produite par *lc.lactis ssp. cremoris* (**Bourgeois et Iarpent., 1996**).

Le diacétyl est une substance antimicrobienne efficace contre différentes bactéries Gram négatives et Gram positives, il agit en affectant l'utilisation de l'arginine (**Jay., 1986**) ; bien que les bactéries lactiques soient généralement résistantes (**Gill et Halley., 2003**). Les quantités de diacétyl produites par *Lc. lactis subsp. lactis biovar. Diacetylactis* varient de 0,07 à 3,72 ppm (**Burrow et al., 1970**).

Conclusion

Conclusion et perspectives

Au totale 09 souches de bactéries lactiques Gram positive et catalase négative, ont été sélectionnées, dont on dénombre 08 souches apparentées aux lactobacilles et 01 souche apparentée aux lactocoques.

L'étude de la cinétique de croissance nous a permis de décrire les différents profils de croissance des neuf souches lactiques ainsi que les cinq souches pathogènes pour déterminer les différentes phases de la courbe de croissance des deux groupes bactériens et connaître le temps d'incubation des cultures jeunes pour chaque type bactérien : 16 heure pour les bactéries lactiques et 08 heure pour les bactéries pathogènes.

Les souches (LMBFAS01 ; LMBFAS02 ; LMBFAS04 ; LMBFAS05 et LMBFAS07), ont été les souches lactiques les plus performantes dans les tests d'antagonisme bactérien et ont présenté un spectre d'action différents d'une souche pathogène à une autre : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 était la plus sensible par rapport aux autres bactéries pathogènes. Les zones d'inhibition observées s'étendaient de (02 mm à 14 mm).

La neutralisation des surnageant nous a permis d'éliminer l'effet inhibiteur des acides organiques (acide lactiques ...) ; et les résultats obtenus confirment la production d'autre substances antibactériennes responsables de cette interaction contre les bactéries pathogènes.

Ces résultats permettent une sélection de souches antibactériennes qui dans l'avenir nous pourrons mieux les caractériser par :

- ✓ Détermination de la nature des substances antibactériennes,
- ✓ Caractérisation de leur potentiel probiotique pour développer leur effet santé.
- ✓ Identification de ces souches lactiques par les méthodes moléculaires.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

- **Allouche F.N., Hellal A., Laraba A., 2010.** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie.*, 3: 13-20.
- **Ammor.M., Salim., Tauvero, Grégoire, Dufour Eric, Chevallier Isabelle., 2006.** Antibacterial of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility.1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control.* 17:454-461.
- **Aouati, H., 2009.** isolement des souches de *Staphylococcus aureus* resistances à la méthicillines:etude de leur sensibilite aux autres familles d'antibiotiques. Département De Biochimie et De Microbiologie, algerie: thèse N° : 006 / SN / 2009.
- **Aslam S. et Qazi J.I., 2010.** Isolation of acidophilic lactic acid bacteria antagonistic to microbial contaminants. *Pakistan Journal of Zoologie.* 42(5): pp 567-573.
- **Avril J.L., Dabernat H., Denis F. et Montail H., 2000.** *Helocobacter pylori* *Bacteriol. Clin.*30 :406-410.
- **Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R., 2005.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, 23: 30-37.
- **Baldent., 1997.** Coloration usuelles en Bactériologie. *Revue de Développement et santé. Février (1997).* www.ledamed.org.
- **Barefoot S.F., Klaenhammer T.R., 1983.** Detection and activity of lactacin B, a89 bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 45(6) :1808-1815
- **Blachkburnet Projan S J., 1994.** Pharmaceutical bacteriocin combination and methods for using the same. United states Patent. Applied. Microbiology. Inc : 5: pp ,304-540.
- **Bottazzi, V., et Dellaglio, F., 1967.** Acetaldehyde and diacétyle production by *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococi. *J. Dairy Res.* 34: 109-113.
- **Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J.J., 1996.** Microbiologie alimentaire aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed.Tec. et Doc. Lavoisier, vol(1), 174p

- **Bourgeois C.M. et Larpent J.P., 1996.** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. *Technologie & Documentation, Lavoisier. Paris. pp 432-704.*
- **Bouvier M., 2011.** Mise au point de méthodes de détection des souches d'Escherichia coli productrice de Shiga-toxines (STEC).Thèse présenté pour l'obtention du diplôme de l'Ecole pratique des Hautes Etude en Science de la vie et de la terre. Université Nancy I.P 13.
- **Brul S.,Coote P.,1999.** Preservative agents in foods:Mode of action and microbial resistance mechanisms.Int.J.Food.Microbiol.,50(1-2):1-17.
- **Burrow, C.D., Sandine, W.E., Elliker, P.R., et Speckman, C., 1970.** Characterization of diacetyl negative mutants of *Streptococcus diacetylactis*. *J. Dairy Sci.* 53: 121-125.
- **Campos C.A., Rodriguez O., Calo-Mata P., Prado M., Barros-Velazquez J. 2006.** Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Research & International journal. vol39: pp356-364.*
- **C**
- **Casla D.,Requena T. et Gomez R., 1996.** Antimicrobiol activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus carvatus* IFPL 105.J.Appl. Bacteriol,81:1,35-41.
- **Chenel., 2006.** Produit laitier. Maison de lait.
- **Codex STAN 206-1999 .** Norme générale codex pour l'utilisation de termes de laiterie - Définitions. P1
- **Collins, M.D., Jons, D. 1981.** Growth Bifidobacteria in milk and preparation of Bifidobacteria infantis for a dietary adjunct. *J. Dairy Sci,* 67: 1376-1380.
- **Collins, M. D., C. Ash, J. A. E. Farrow, S. Wallbanks, and A. M. Williams., 1989.** 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *Journal of Applied Bacteriology* 67, 453–460.
- **Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. et Janssens, C., 1994.** Bactéries lactiques aspects fondamentaux et technologiques, 1 : 25-114.
- **De Roissart, H., Luquet, F.M., 1994.** Les bactéries lactiques. *Uriage, Lorica, France, 1 : 21-286* pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.

0

1

- **De Vuyst Luc, Leroy Frédéric, 2007.** Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J. Mol. Microbiol Biotechnol.*, 13: 194-199
- **Dilmi Bouras A., 2002.** Survie de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* et leur action sur la métabolisme du cholestérol. *Thèse de doctorat d'état*, INA, El Harrach, Alger
- **Djidel A., 2007.** Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei subsp :Rhamnosus* sur jus de dattes : cinétique et optimisation en culture discontinues semi-continues et continues. Thèse présenté pour obtenir le grade de Docteur en Biotechnologies et industries alimentaires, Institut national de polytechnique de Lorraine. P32,33.
- **Dortu, C. et Thonart, P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* , 13: 143-154.
- **Doumandji A., Hellal A., Saidi N., 2010.** Purification de la bactériocine a partir de *Lactobacillus acidophiles* 11, *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 4: 25-47
- **El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El-Mecherfi, K.E., Bazukyan, I., Choiset, I., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y. G., Kuliev, A. A., Mozzi, F., Chobert, J. M., Haertlé, T., 2011.** Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Sci. Technol.* , 22: 509-516.
- **El-Ziney, M.G., Uyttendaele, M., Debevere, J., Jakobsen, M., 1998.** Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Lett.* 20(10), 913-916.
- **Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S., 2001.** Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Current Opinion in Microbiology*, 42:199-202.
- **FAO., 1990.** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO/Alimentation et nutrition, 28p.
- **Gevers, D., 2002.** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium
- **Gill, A.O., et Halley, R.A., 2003.** Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 251-259.

- **Gonzalez L., Sandoval H., Sacristan N., Castro J.M., Fresno J.M., Tornadijo M.E., 2007.** Identification of lactic Acid Bacteria isolated from genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food control.*, 18:716-722
- **Gonzalez, et al., 2007. In Boudjani, W. 2009 .** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.
- **Gratia., 1925.** Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre souches colibacilles. *Conseil Royal Société Biologie.* 93 : 1040-1041.
- **Gudcr A., Wiedemann I. and Sahl H G., 2000.** Posttranslationally modified Bacteriocins the antibiotics. *Review biopolymers:* 55: pp 65-73.
- **Gurira O.Z., Buys E.M., 2005.** Characterization and antimicrobial activity of pedicoccus species isolated from South African farm – style cheese. *Food Microbiology.*, 22:159-168
- **Guiraud, J.P. 1998.** Microbiologie des principaux produits alimentaires, Microbiologie alimentaire. Ed ©Dunod, Paris.
- **Hermier, J., Lenoir, J., Weber, F. 1997.** Rôle des bactéries lactiques dans la production des facteurs anti microbien, les groupes microbien d'intérêt laitier. Ed. Cepil. Paris. pp. 960.
- **Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U., 2001.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73(suppl): 365S–73S.
- **Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S., Tani A., Maneerat S., 2011.** Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control*, 22: 401-407
- **Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A. et Wollman, E., 1953.** Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie, *Ann. Inst. Pasteur.* 84:222-224.
- **Jay M.J., 1986.** Modern Food Microbiology, *Fermented Foods And Related Products Of Fermentation*, 3th ed., Van Nostrand Reinhold Company, New York, New York. 239-255 and 362-406.
- **Jensen R., 1995.** Handbook of milk composition-General description of milks, Academic Press, Inc:3 (919pages).

- **Joseph- Pierre Guiraud., 2003.** Microorganisme intervenant dans l'industrie alimentaire, microbiologie alimentaires application à l'étude des principaux groupes microbiens. 1 Fds 91-294.
- **Kandler, O., Weiss, N., 1986.** Genus Lactobacillus. In :Bergey's Manual of Systematic Bacteriology., vol 2. P.H.A, Sneath., N.S, Mair., Sharpe, M.E., Holt, J.G (Ed). Williams and Wilkins, Baltimore, M.D.
- **Klaenhammer T.R., Fremaux., Hechard Y., 1994.** Activité antimicrobienne des bactéries lactiques In bactéries lactiques, De Roissart H.,Luquet F.M.Tome1,Lorica.pp :353-366.
- **Klaenhammer T.R., 1988.** Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie, 70, 337-349.
- **Klein C., Kaletta , C., and Entian , K., D., 1993.** Biosynthesis of the lantibioticsubtilinis regulated by a histidine Kinase: response regulator system. Appl Environ Microbiol. 59:296-303
- **Kobilinsky A., Nazer A.I. and Dubois-Brissonnet F., 2007.** Modeling the inhibition of *Salmonella* Typhimurium growth by combination of food antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology.* 115: pp95-109.
- **König, H. et Fröhlich, J., 2009.** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- **Kulshrestha, D.C., et Marth, E.H., 1974.** Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. I. *Escherichia coli.* *J. Milk Food Technol.* 37: 510-516.
- **Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R. and Fryer, J.L., 1991.** *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 406-409.
- **Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M., 2005.** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux.* 144 : pp 237-250.
- **Laease., 2005. In Boudjani, W., 2009.** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.
- **Roudaut, H., Lefrancq, É., (2005).** Alimentation théorique. 2ème Ed- Paris : p.115

- **Larpent J.P., 1997.** Microbiologie alimentaire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 1073P.
- **Laurent, S., 1998.** Manuel de bactériologie alimentaire. Poly technica Paris. 307 pages
- **Leveau J-Y., Bouix M., 1991.** La flore lactique In Technique d'analyse et de control dans l'industrie agroalimentaire. Bourgeois C.M., Leveau.J-Y.Tec &Doc, Lavoisier,pp :152-186.
- **Leyral, G., Vierling, E. 2001.** Microbiologie et toxicologie des aliments .3émeédition Doin.France. P. 87-114.
- **Liu S., 2003.** Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations.Int.J.Food.Microbiol.83 (2):115-131.
- **Makhloufi .K. M., 2012.** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité : microbiologie, biochimie.
- **Marchal, N., Bourdon, J.L., Richard, C.L. 1991.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris.
- **Marth, E. H. et Steele, J. L., 2001.** Applied dairy microbiology. Marcel Dekker, Inc., New York.
- **Mathot A.G.,Beliard E., Thnault D., 1996.** Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques In Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaire.Bourgeois C.M., LarpentJ-P.Tome 2,Tec &Doc,Lavoisier,pp :432-452.
- **Metlef S. et Dilmi-Bouras A., 2009.** Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Revue Nature & Technologie. 1* : pp 33-44.
- **Mkrtychyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K., 2010.** Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. Int.J. Antimicrobial Agents., 35: 255-260.
- **Mayou B., Aleksandrzyk - Piekarczyk T., Fernander M., Kowalczyk M., Alvarez - Martin P. et Bardowski J.,2010.** Updates in the metabolism of lactic acid bacteria.Biotechnology of acid bacteria: Novel Application Blackwell Publishing (3 – 34)

- **Moraes, M. P., Perin, L. M., Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., Nero, L. A., 2010.** Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *Food Sci. Technol.*, 43: 1320-1324.
- **Piard JC. , Desmazeaud M., 1991.** Inhibitions' factors produced by lactic acid bacteria: Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le lait*, 72, 113-142.
- **Piard J., Murianal P., Desmazeaud M. et Klaenhammer T., 1992.** Purification and partial characterization of lacticin 481,a bacteriocin produced by *lactococcus lactis sub sp lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.58:279-284
- **Pilet M-F., Magras Catherine et Michel Federighi, 2005.** Bactéries lactiques In *Bactériologie alimentaire "compendium d'hygiène des aliments"*. Federighi M. *Economica*, pp: 219-242
- **Pringsulaka , O., Thonggam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., Rangsiruji, A., 2011.** Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control* , 23: 547-551.
- **Rogers L A., 1928.** The inhibiting effect of *Streptococcus thermophilus* and on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 5: pp 161-168. *Brrlgariczw. J. Bacteriol:* 5: pp 161-168.
- **Rogers L A., et E O Whittier., 1928.** Limiting factors in lactic fermentation. *J. Bacteriol:* 16: pp 211-214.
- **Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A., 2004.** Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.
- **Siegmundfeldt, H., Rechanger, KB., Jakobsen, M., 2000.** Dynamic changes of intracellular Phin individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl Environ Microbiol*, 66: 2330-2335.
- **Singleton., 1984.** Abrégés de bactériologie .Ed. Masson ,Paris :353-364.
- **Schleifer, K., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Baelz, R., Collins, MD. and Fischer, W., 1985.** Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 6, 183-195.
- **Schmitt R., 2006.** *Microbiologie Alimentaire ; Risques microbiologiques par des organismes pathogènes, HEVs*, Susse 10-102.

- **Schved F.,Lalzar A.,Lindner p.et Juven B .J., 1994.** Interaction of the bacteriocin produced by pediococcus acidilactici SJ1 with the cell envelope of lactobacillus spp. *Cett.Appl.Microbiol.*19:281-283.
 - **Stiles ME. et Holzapfel WH., 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36: pp 1-29.
 - **Thompson J., Gentry-Weeks C.R., 1994.** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans :Bactéries lactiques, Vol. I, p 239-290.
 - **Thompson J.K.,Collins M.A. and Mercer.W.D., 1996.** Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *lactobacillus helveticus* CNRZ450.*Journal of applied bacteriology*,80,3:338-348.
 - **Uehara, S., Monden, K., Nomoto, K., Seno, Y., Kariyama, R., Kumon, H., 2006.** A pilot study evaluating the safety and effectiveness of Lactobacillus vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Int. J. Antimicrobial Agents*, 28: 30-34
 - **Vollenweider, S., 2004.** 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.* 64, 16-27.
 - **Wheater M.D., Hirsch H., Mattick A.T.R., 1951.** Possible identity of « lactobacilline » with hydrogen peroxide produced by Lactobacilli. *Nature.*, 170: 623
 - **Woolford M.K., 1975.** Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. *J. Sci. Food Agric.* 26: 229-237.
 - **Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R., 2008.** Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Sci.*3: 194-199.
 - **Zalan Z.,Brath A., Halasz A., 2005.** Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of lactobacillus strains.*Food Technol.Biotech.*,43(3):219-225.
- **Source:**
- <http://www.keyword-suggestions.com/c3dpbW1pbmcgcG9uZA/>
 - <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Shigella>

Annexe

Annexe-01

Composition des milieux de cultures

Milieu MRS (de Man-Rogosa et Sharp)

Composition (gramme /litre)

Peptone 10g

Extrait de viande.....8g

Extrait de levure4g

Glucose20g

Tween 801ml

Hydrogénophosphate de potassium...2g

Acétate de sodium5g

Citrate d'ammonium 2g

Sulfate de magnésium, 7 H₂O..... 0.2g

Sulfate de manganèse, 4 H₂O 0.05g

Agar20g

Eau distillée1000ml

Ph 6.2±0.2 / Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Bouillon LB

Extrait de levure5g

Extrait de viande.....5g

Glucose10g

Peptone10g

NaCl2g

Eau distillée1000ml

pH 7.2 / Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Gélose Nutritive

Extrait de levure5g

Extrait de viande.....5g

Glucose10g

Peptone10g

NaCl2g

Agar15g

Eau distillée1000ml

pH 7.2 /Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Résumé

Cette étude consiste à démontrer l'effet antagoniste des bactéries lactiques isolées du lait de vache, vis-à-vis de quelques espèces de bactéries pathogènes responsables de différentes maladies chez l'homme. L'étude phénotypique a permis de confirmer la viabilité de neuf souches lactiques d'une collection de bactéries lactiques isolées du lait de vache : (LMBAFS01; LMBAFS02; LMBAFS03; LMBAFS04; LMBAFS05; LMBAFS06; LMBAFS07; LMBAFS08; LMBAFS09), dont on dénombre (08) souches apparentées au Genre *Lactobacillus* par leur forme cellulaire en bâtonnet et (01) souche apparentée aux *lactocoques* par leur forme cellulaire en cocci. Par ailleurs, les tests d'activité antibactérienne contre *staphylococcus aureus* ATCC 6538; *staphylococcus aureus* ATCC 25923 ;*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Eschérichia coli* ATCC 10536; *shiguella dysenteria* CECT 457; en utilisant la méthode de diffusion en puits, ont conduit à l'apparition d'halot claire autour des souches lactiques testées, avec des diamètres de zone d'inhibition variables, en effet, les souches LMBAFS [01 ;02 ;03 ;04 ;05] ont été les plus performantes contre *staphylococcus aureus* ATCC 6538 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *shiguella dysenteria* CECT 457.

L'interaction d'antagonisme avec le surnageant après neutralisation par une solution de NaOH 1N et filtration par filtre millipore (0.45µm); à révélé une activité antibactérienne seulement contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 chez les souches LMBAFS [01; 02; 03;04; 05]. Ce qui permet de dire qu'il y a d'autres substances antibactériennes produites par nos bactéries et qu'une caractérisation plus poussé permettra de déterminer leur nature (H2O2; Diacétyl; ou Bactériocines).

Mots clé : Lait de vache, Les bactéries lactiques, Le pouvoir antagoniste, Agents inhibiteurs, Les souches pathogènes.

Summary:

This study consists in demonstrating the antagonistic effect of lactic acid bacteria isolated from cow's milk, against some pathogenic bacteria responsible of different diseases in humans. The phenotypic study confirmed the viability of nine lactic strains from a collection of lactic acid bacteria isolated from cow's milk: (LMBAFS01; LMBAFS02; LMBAFS03; LMBAFS04; LMBAFS05; LMBAFS06; LMBAFS07; LMBAFS08; LMBAFS09) ; (08) strains related to the *Lactobacillus* genus by their rod-shaped cell and (01) lactococci-related strains by their cocci cellular form.

Otherwise, tests for antibacterial activity against: *staphylococcus aureus* ATCC 6538; *staphylococcus aureus* ATCC 25923 ;*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Eschérichia coli* ATCC 10536; *shiguella dysenteria* CECT 457, using the well-diffusion method, led to the appearance of clear halot around the tested lactic strains with variable inhibition zone diameters, in fact the strains LMBAFS[01 ;02 ;03 ;04 ;05] were the best performers against *staphylococcus aureus* ATCC 6538 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *shiguella dysenteria* CECT 457.

The interaction of antagonism with the supernatant after neutralization with a solution of 1N NaOH and filtration by millipore filter (0.45 µm), revealed antibacterial activity only against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 for the strains LMBAFS [01; 02; 03;04; 05], this Makes possible to say that there are other antibacterial substances produced by our bacteria and a more detailed characterization will allow to determine their nature (H2O2, Diacetyl or Bacteriocins).

Key words: Cow's milk, Lactic acid bacteria, Antagonist, Inhibitory agents, Pathogenic strai