



**Faculté des sciences de la Nature et de la vie**  
**Filière : Sciences Biologiques**  
**Spécialité : Microbiologie appliquée**  
**Option: interaction microorganismes, hôtes et environnement**

## **THÈSE**

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
DOCTORAT 3<sup>ème</sup> cycle LMD

**Par**

**Mme ZERGOUG Amina**

**THÈME**

**Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des  
pathogènes responsables des infections urinaires**

Soutenu publiquement le : 12/12 /2017

<b>Mr DJIBAOUI Rachid</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Président</b>
<b>Mr CHERIGUENE Abderrahim</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Promoteur de thèse</b>
<b>Mme CHOUGRANI Fadela</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de Mostaganem</b>	<b>Co-Promotrice de thèse</b>
<b>Mr ABBOUNI Bouziane</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université de SBA</b>	<b>Examinateur</b>
<b>Mr BEKADA Ahmed Mohamed Ali</b>	<b>Professeur</b>	<b>C.U Tissemsilt</b>	<b>Examinateur</b>
<b>Mr ETTALHI Mehdi</b>	<b>Docteur</b>	<b>EPHP Ain Tedles</b>	<b>Invité</b>

قال الله تعالى: {يرفع الله الذين آمنوا منكم و الذين أوتوا العلم درجات و الله بما

تعملون خبير} المجادلة، 11

قال الله تعالى: {قل هل يستوي الذين يعلمون و الذين لا يعلمون} الزمر 9

## AVANT-PROPOS

Avant tout propos, mes remerciements infinis sont adressés à Dieu le tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné la force et le courage de mener ce travail à terme.

Mes sincères remerciements s'adressent à mon directeur et ma co-directrice de thèse, le Pr. CHERIGUENE Abderrahim et Pr CHOUGRANI Fadela, pour leur soutien, conseils et leurs encouragements continuels à mon égard tout au long de ces 4 années.

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

Je profite aussi pour remercier, the institute of sciences production, Italie, d'avoir accepté de m'accueillir, où j'ai pu effectuer la partie moléculaire de ma thèse, pour une courte durée.

Je remercie vivement Pr DJIBAOUI Rachid, responsable de la formation doctorale Microbiologie Appliquée Option microorganisms, Hôtes et environnements et professeur à l'université de Mostaganem pour ses encouragements, son soutien et ses conseils constructifs tout au long de ma formation, sa gentillesse et sa générosité, qui a fait l'honneur de présider ce jury de soutenance.

J'exprime mes respectueux remerciements à messieurs: Mr ABBOUNI Bouziane, professeur de l'université de Sidi Bel Abbes, Mr BEKADA Ahmed Mohamed Ali Professeur au centre universitaire de Tissemsilt et Mr ETTALHI Mehdi docteur à l'EPHP de Ain Tedles Mostaganem qui me font l'honneur d'accepter d'examiner cette thèse.

Beaucoup d'autres personnes ont également permis que ce travail aboutisse. Mes très chers et précieux parents qui se sont beaucoup sacrifiés à qui je ne saurais trouver les mots pour les remercier, leur amour inconditionnel a fait que grâce à eux je suis là aujourd'hui, merci d'avoir toujours cru en moi... Sans oublier mes très chers frères pour leur aide et tout ce qui ont fait pour moi, mon très cher époux pour son soutien, son aide et sa présence, ma belle famille, tous mes collègues et amis. Je n'en dresserai pas la liste, de peur d'en oublier, mais elles se reconnaîtront certainement.

## **Dédicace**

Je dédie ce modeste travail à mes très chers et précieux parents...

## TABLE DES MATIERES

### Avant propos

Index des principales abréviations.....ii

Index des tableaux.....iii

Index des figures.....iv

### Résumé

### Abstract

### الملخص

Introduction.....1

## Chapitre I : Rappels Bibliographique

I. Les bactéries lactiques.....4

1. Généralités.....4

2. Origine et habitat.....5

3. Interaction bactéries lactiques - Hôtes.....6

4. Taxonomie des bactéries lactiques.....7

5. Physiologie et voies métaboliques.....11

6. Interet des bactéries  
lactiques.....13

6.1. Domaines alimentaire.....13

6.2. Domaine thérapeutique.....14

II. Infections urinaires.....14

1. Epidémiologie et Physiopathologie.....14

1.1. Infections urinaires communautaire.....15

1.2. Infections urinaires hospitalières.....15

2. Prévalence des infections urinaires.....15

3. Types d'infections urinaires.....16

3.1. Infections urinaires basses.....	16
3.2. Infections urinaires hautes.....	16
4. Caractéristiques des Uropathogènes.....	17
5. Processus d'adhésion des Uropathogènes - bactéries lactiques.....	18
6. Effet antibactérien des bactéries lactiques vis à vis des uropathogènes.....	19
III. Les Bactériocines des bactéries lactiques.....	19
1. Substances antagonistes.....	19
Les acides organiques.....	19
Production du peroxide d'hydrogène.....	20
Ions super oxide d'hydrogène.....	21
Les antibiotiques.....	21
Production de bactériocines.....	22
2. Généralités sur les bactériocines.....	22
3. Caractéristiques des bactériocines.....	23
4. Classification des bactériocines.....	23
5. Biosynthese des bacteriocines.....	25
6. Mécanisme d'action des bactériocines.....	27
7. La résistance aux bacteriocines.....	28
8. Régulation de l'expression des genes codant les bacteriocines.....	28
9. Conditions et facteurs de production.....	29
Température et pH.....	30
Composition du milieu de culture.....	30
Temps d'incubation.....	31
10. Purification et caractérisation des bactériocines.....	31
11. Application des bactériocines.....	33
11.1 Dans le secteur alimentaire.....	33
11.2 Dans le secteur sanitaire.....	34

## **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

I. Bactéries lactiques.....	36
1. Prélèvement des échantillons.....	36

2. Milieux et conditions de cultures.....	36
3. Techniques d'isolement et purification des bactéries lactiques.....	36
4. Conservation des souches.....	37
5. Tests d'orientations et identification des bactéries lactiques.....	37
5.1. Caractérisation phénotypique des isolats.....	37
5.2. Identification biochimique des souches.....	38
Détermination du Type fermentaire.....	38
Test de croissance à 15°C et à 45°C et thermorésistance.....	38
Croissance en présence de diverses concentrations de NaCl.....	38
Fermentation des sucres.....	38
Croissance sur pH 9,6.....	39
II. Infections urinaires.....	40
1. Prélèvements des échantillons.....	40
2. Analyse des urines.....	40
3. Milieux et conditions de culture.....	40
4. Isolement des Uropathogènes.....	40
5. Orientation de l'identification des Uropathogènes.....	40
Testes biochimiques.....	40
Mannitol-mobilité.....	40
Utilisation du citrate.....	41
Test de l'indole.....	41
6. Conservation des isolats.....	41
7. Antibiogramme.....	41
8. Galerie API 20 <sup>E</sup> .....	41
II. Bactériocines.....	42
1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et sélection des isolats.....	42
2. Screening des isolats bactériocinogènes.....	42
3. Galerie API 20 Strep.....	44
4. Mesure du pH et dosage de l'acidité Dornic.....	44
5. Cinétique de croissance et production de bactériocines.....	45
6. Estimation de la quantité de bactériocine produite.....	45
7. Optimisation des conditions de production de bactériocines.....	45
7.1. Effet de la composition du milieu de culture.....	46

Effet de la source d'azote.....	46
Effet de la source de carbone.....	47
Effet de la source de potassium.....	47
7.2. Effet de la température d'incubation.....	47
7.3. Effet du pH sur la diffusion de la bactériocine.....	48
8. Propriétés physico-chimique des bactériocines.....	48
Effet de la température.....	48
Effet du pH.....	48
Effet des différents surfactants et sels inorganiques.....	49
9. Caractérisation des bactériocines.....	49
9.1. Extraction des bactériocines.....	49
Extraction par solvants.....	49
Adsorption-désorption.....	49
9.2. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	51
9.3. Révélation par test de Ninhydrine.....	51
9.4. Analyse spectroscopique UV-VIS-NIR des bactériocines.....	52
9.5. Analyse spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR).....	52
9.6. Dosage des protéines solubles.....	52
9.7. Electrophorèse sur gel polyacrylamide (SDS-PAGE).....	52
9.8. Détermination de la CMI.....	53
10. Identification moléculaire des isolats bactériocinogènes.....	53
10.1. Extraction et purification de l'ADN.....	53
10.2. Analyse par RAPD-PCR (Randomly amplified polymorphic DNA analysis).....	54
10.3. Rep- PCR typing.....	55
10.4. PCR et séquençage de l'ADN (Polymerase chain reaction).....	55
10.5. Sensibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques.....	57
10.6. Détection des gènes codants pour bactériocines, résistance aux antibiotiques et facteurs de virulence par PCR.....	57
10.7. Analyse statistique des résultats.....	59
<b>Résultats et Discussion.....</b>	<b>60</b>
<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>114</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>117</b>

## Liste des principales Abréviations

A : Adénine

Amp : Ampicilline

AS : Activité spécifique

BSA : Sérum albumine bovine

C : Cytosine

*cry* : Gène codant la synthèse des  $\alpha$ -endotoxines

ddNTPs : Didésoxynucléotides (ddATP + ddCTP + ddGTP + ddTTP)

dNTPs : Désoxynucléotides triphosphate (dATP + dCTP + dGTP + dTTP)

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Ethylene diamine tetracétique acid

Em : Erythromycine

G : Guanine

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography

PCR : Polymerase Chain Reaction

qsp : Quantité suffisante pour

Rd : Rendement

RP-HPLC : Reverse phase- HPLC

SDS-PAGE : Sodium dodécyl sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis

subsp. : Sous espèce

T : Thymine

TAE : Tris acétate EDTA

UA : Unité arbitraire

UV : Ultra-violet

V : Volume

vvm : Volume d'air par volume de liquide et par minute

*Vip* : Gène codant la synthèse des protéines VIPs

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

RAPD-PCR (Randomly amplified polymorphic DNA analysis)

CMI : Concentration minimale inhibitrice

## Index des Figures

Figure I.1	Arbre phylogénétique de l'ordre de <i>Lactobacillales</i>	09
Figure I.2	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S	11
Figure I.3	Les voies métaboliques des bactéries lactiques	12
Figure I.4	Voies métaboliques homofermentaire, hétérofermentaire et bifide de la dégradation du glucose	13
Figure I.5	Voies excrétrices de l'urine et prostate	15
Figure I.6	Mode d'action des acides organiques produits par les lactobacilles sur les pathogènes	20
Figure I.7	Modes d'action du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés produits par les lactobacilles sur les pathogènes	21
Figure I.8	Séquence et structure de l'antibiotique de type A (Nisine), B (Mercacidine) et d'un antibiotique « two peptides »	25
Figure I.9	Vue d'ensemble des machineries suggérées pour la production de bactériocines classe IIa : système de régulation, synthèse, traitement, excrétion et immunité	26
Figure I.10	Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques	27
Figure I.11	Mécanisme de régulation « quorum-sensing » des bactériocines de la classe I des bactéries lactiques	29
Figure II.1	Montage pour la mesure de l'acidité dornic (titrage)	45
Figure II.2	Protocole d'extraction des bactériocines par la techniques d'adsorption - desorption	50
Figure II.3	Chromatographie sur couche mince	51

Figure III.1	Aspect macroscopique des isolats sur milieu MRS	61
Figure III.2	Observation macroscopiques des colonies lactiques sur MRSc	61
Figure III.3	Observation microscopique des isolats lactiques à l'état frais	62
Figure III.4	Observation microscopiques (Objectif X100) des isolats lactiques avec coloration de Gram	63
Figure III.5	Résultat du type fermentaire pour les isolats purs	64
Figure III.6	Fermentation des sucres par les isolats lactiques	69
Figure III.7	Schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques	69
Figure III.8	Répartition des échantillons positifs selon l'âge et le sexe	71
Figure III.9.a	Aspect macroscopique des uropathogènes sur différents milieux de culture	72
Figure III.9.b	Observation microscopique (Objectif X100) des isolats	73
Figure III.10	Résultats du test d'indole	74
Figure III.11	Répartition des uropathogènes isolés	74
Figure III.12	Résultats de l'antibiorésistance des isolats uropathogènes	75
Figure III.13	Résultats API 20 <sup>E</sup>	76
Figure III.14	Résultats API Staph	77
Figure III.15	Effet antibactérien de quelques isolats lactiques performants	82
Figure III.16	Résultat de l'API strept	84
Figure III.17	Titration de l'acidité dornic	85
Figure III.18	Cinétique de croissance	86
Figure III.19	Effet antibactériens des surnageants de MGM 85 cultivé dans différentes sources d'azotes vis-à-vis d'E. coli	90
Figure III.20	L'effet de source d'azote sur la croissance des bactéries lactiques	91

Figure III.21	Effet antibactériens des surnageants de MGM 85 cultivé dans différentes sources de carbone vis-à-vis d'E. coli	92
Figure III.22	Effet de la source de potassium sur la croissance des isolats lactiques	95
Figure III.23	Effet de la température sur les isolats lactiques	96
Figure III.24	Effet du traitement thermique des bactériocines	97
Figure III.25	Effet du pH sur les bactériocines	98
Figure III.26	Extraction des bactériocines par solvants	100
Figure III.27	Résultats de la révélation par la Ninhydrine sur CCM	101
Figure III.28	Spectrophotomètre UV visible des la souche MGM 85	102
Figure III.29	Résultats de l'analyse spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)	103
Figure III.30	Courbe de dosage des protéines par la méthode de Lowry	104
Figure III.31	Résultats de SDS PAGE	105
Figure III.32	CMI des extraits bactériocinogènes	106
Figure III.33	Amplification des gènes par PCR	107
Figure III.34	Arbre phylogénétique après séquençage des isolats lactiques.	108
Figure III.35	Diagramme de l'analyse RAPD-PCR	109
Figure III.36	Gènes codant pour la bactériocine P	112

## **Index des Tableaux**

Tableau I.1	Propriétés des principales bactéries lactiques mésophiles et thermophiles	05
Tableau I.2	Le poids moléculaire de certains génomes de bactéries lactiques et le nombre de gènes révélés	10
Tableau II.1	Liste des primers utilisés lors de la PCR (Polymerase chain reaction)	58
Tableau II.2	Liste des primers utilisés lors de la PCR pour la détection des gènes codant pour des bactériocines, résistance aux antibiotiques et facteurs de virulence des isolats lactiques	59
Tableau III.1	Caractéristiques physiologiques et biochimiques des BL isolées échantillon	65
Tableau III.2	Répartition de l'échantillonnage selon l'âge et le sexe	71
Tableau III.3	Mise en évidence de l'activité antibactérienne	79
Tableau III.4	Traitement enzymatique des isolats lactiques	83
Tableau III.5	Evolution du pH et l'acidité dans le temps	85
Tableau III.6	Profil Antibiorésistance des isolats lactiques	111

## Résumé

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

Parmi les métabolites des bactéries lactiques, des substances antimicrobiennes appelées les bactériocines se sont des biomolécules antimicrobienne efficaces et très recherchées pour diverses applications permettant ainsi de pallier aux problèmes de résistances aux différentes infections pathologiques.

Les infections urinaires sont fréquentes tant en milieu communautaire qu'en milieu hospitalier. Elle est l'infection la plus commune après celle des voies respiratoires. En effet, ces infections constituent un véritable problème de santé publique tant par leur fréquence que par leur difficulté de traitement

Afin de trouver une alternative aux antibiotiques, l'utilisation des bactéries lactiques est favorisée, plus particulièrement les peptides antimicrobiens.

152 isolats lactiques ont été isolés à partir de lait de vache, chèvre et selles de nourissons et identifié phénotypiquement et génotypiquement parmi lesquels *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *bifidobacterium*. La mise en évidence de l'activité antibactérienne a été évaluée vis-à-vis des souches uropathogènes, ces derniers ayant été isolés à partir de patients atteints d'infections urinaires, les plus résistants aux antibiotiques ont été retenus. Les isolats lactiques dotés d'activité antagoniste la plus performante ont été choisi pour une caractérisation afin de choisir les producteurs de bactériocines.

Une optimisation des conditions de culture a été étudié pour augmenter la production de bactériocines, à savoir la température, la composition du milieu de culture, le temps d'incubation. Puis par la suite une caractérisation physico-chimique de ces bactériocines a été faites après extraction par adsorption-desorption et par différents solvants, une analyse spectroscopique UV-VIS-NIR suivie d'une analyse spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), un dosage de folin, une électrophorèse SDS-PAGE. L'estimation de la quantité de bactériocine produite a été déterminée ainsi que la concentration minimale inhibitrice. Quant au volet moléculaire, l'identification par PCR ADNr 16S a été réalisée ainsi

qu'une analyse par RAPD-PCR, puis une localisation des gènes codants pour des bactériocines par PCR montrant que les isolats choisis codés pour des Enterococci P.

**Mots clés :** Bactéries lactiques - Infections urinaires - Bactériocines - Activité antibactérienne - Optimisation - UV-VIS-NIR - FT-IR - SDS PAGE - PCR - RAPD PCR

## Abstract

For many years ago, lactic acid bacteria have been an effective means of bio-preservation of many food products, regarding to their metabolism. However, their roles have spread to other sectors, such as the Clinical environment.

Among the metabolites of lactic acid bacteria, antimicrobial substances called bacteriocins are efficient and highly sought-after antimicrobial biomolecules for various applications, thus making it possible to overcome the problems of resistance to various pathological infections.

Urinary tract infections are frequent in both community and hospital settings. It is the most common infection after that of the respiratory tract. Indeed, these infections constitute a real public health problem both by their frequency and by their difficulty of treatment. So as to find an alternative to antibiotics, the use of lactic acid bacteria is favored, in particular antimicrobial peptides.

152 lactic isolates were isolated from cow's milk, goat and feces then identified phenotypically and genotypically including *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *bifidobacterium*. The detection of antibacterial activity was evaluated with uropathogenic strains, which was being isolated from patients suffering from urinary infections, the most resistant to antibiotics were retained. Lactic isolates with the most potent antagonistic activity were selected for characterization in order to select bacteriocin-like producers.

An optimization of the culture conditions was studied to increase the production of bacteriocins, namely the temperature, the composition of the culture medium, the incubation time. Then a physicochemical characterization of these bacteriocins was carried out after extraction by adsorption-desorption and by various solvents, a UV-VIS-NIR spectroscopic analysis followed by an infrared spectroscopy analysis with a Fourier transform (FT-IR), A folin assay, SDS-PAGE electrophoresis. Estimation of the amount of bacteriocin-like produced was determined as well as the minimum inhibitory concentration.

As for the molecular aspect, the identification by DNAr 16S PCR was carried out as well as a RAPD-PCR analysis followed by a localization of the coding genes for bacteriocins-like by PCR showing that the selected isolates coded for Enterocin P.

**Keywords:** Lactic acid bacteria - Urinary tract infections - Bacteriocins-like - Antibacterial activity - Optimization - UV-VIS-NIR - FT-IR - SDS PAGE - PCR - RAPD PCR

## الملخص

تعتبر بكتيريا حمض اللاكتيك منذ آلاف السنين وسيلة عضوية فعالة للحفاظ على العديد من المنتجات الغذائية. لكن توسع دورها في مجالات أخرى، مثل البيئة الصحية.

من بين نواتج الأيض من بكتيريا حمض اللاكتيك، والمواد المضادة للميكروبات وهي bacteriocins بحيث هي جزيئات حيوية مضادة للميكروبات فعالة للغاية لمختلف التطبيقات للتغلب و المقاومة على الاعتداءات المرضية المختلفة.

التهابات المسالك البولية شائعة في كل من المجتمع والمستشفيات. و هي من العدوى الأكثر شيوعا بعد الالتهابات الرئوية. في الواقع، هذه الإصابات هي مشكلة صحية عامة رئيسية من وتيرتها صعوبتها على إيجاد بديل للمضادات الحيوية، ويفضل استخدام بكتيريا حمض اللاكتيك، والبيتيدات المضادة للجراثيم خاصة.

تم عزل 152 عزلة اللاكتيك من حليب البقر والماعز و براز الرضع وتحديد النمط الظاهري والجيني بما في ذلك *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*. تم تقييم هذا الاكتشاف من النشاط المضاد للبكتيريا ضد السلالات المتسببة في الالتهابات البولية، وهذه الأخيرة بعد أن تم عزلها من المرضى الذين يعانون من التهاب المسالك البولية، تم اختيار الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية و اختيار النشاط الأقوى لتحديد منتجي bacteriocins.

تمت أيضا دراسة تحسين الظروف لزيادة إنتاج bacteriocins، وهي درجة الحرارة، تكوين المواد المناسبة لنموها و فترة الحضانة. وبعد ذلك تم التوصيف الفيزيائي والكيميائي لهذه bacteriocins عن طريق امتصاص-الامتزاز والمذيبات المختلفة، والتحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية VIS-NIR تليها الأشعة تحت الحمراء فورييه للتحليل الطيفي (FT-IR) فحص فولين، SDS-PAGE و تم تحديد الكمية المنتجة والحد الأدنى للتركيز المثبط.

أما بالنسبة للعنصر الجزيئي، تم إجراء تحديد الهوية من جانب PCR 16S وتحليل RAPD-PCR البحت عن الجينات المسؤولة و المحددة لمنتجات bacteriocins عن طريق تقنية ال PCR تبين أن العزلات المختارة مشفرة ل Enterocin P

**الكلمات المفتاحية:** بكتيريا حمض اللكتيك - التهابات المسالك البولية- التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية- الأشعة تحت الحمراء فورييه- مضادات الحيوية

# INTRODUCTION

---

## INTRODUCTION

Les bactéries lactiques, dotées de propriétés probiotiques sont utilisées depuis des siècles pour la fermentation et bioconservation des aliments, largement répandus dans l'industrie alimentaire, en tant que starters dans les procédés de fermentations, afin d'assurer les exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités et exempts de conservateurs chimiques (**Dortu et Thonart, 2009; Moraes et al., 2010**).

Ces microorganismes produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**), ces peptides antimicrobiens ont la capacité d'inhiber la croissance des germes pathogènes (**Delves-Broughton, 1990**).

Les effets bénéfiques caractéristiques des bactéries lactiques suscitent un intérêt majeur, certains sont maintenant bien établis tels que l'amélioration de la digestion du lactose ainsi que le traitement des désordres diarrhéiques (**Draouault et Corthier, 2001**), entre autre le secteur thérapeutique, considérés comme étant des agents biothérapeutiques vis-à-vis divers pathologies (**Heymann et Heulevin, 2006**).

Parmi les pathologies se voyant introduire les bactéries lactiques en guise de traitement : les infections urinaires. Ces infections sont fréquentes tant en milieu communautaire qu'en milieu hospitalier. L'intérêt porté ces dernières années à cette pathologie des voies urinaires et leur prise en charge en thérapeutique anti-infectieuse restent encore d'actualité.

En effet, ces infections constituent un véritable problème de santé publique tant par leur fréquence que par leur difficulté de traitement. Leur taux élevé pourrait s'expliquer par la prolifération de certains germes au niveau des voies urinaires et la multiplicité des facteurs favorisants (l'âge, le sexe et l'état du patient) (**Traore, 2004**).

Le traitement et contrôle de ce genre d'infection, particulièrement les bactéries nuisibles se fait par la prise d'antibiotiques, le problème qui se pose alors est la résistance à ces derniers. De ce fait les probiotiques seraient une alternative intéressante afin de palier à ce fléau.

C'est alors que née la relation antagoniste entre les uropathogènes et les bactéries lactiques, plus précisément un métabolite qui n'est autre que les bactériocines.

Les bactériocines ou encore peptides antimicrobiens, sont définis comme étant des protéines biologiquement actives ayant un mode d'action bactéricide pouvant même remplacer partiellement les antibiotiques, produites par la plupart des espèces bactériennes, elles peuvent être de différentes natures.

Par rapport aux antibiotiques classiques, l'utilisation des bactériocines comporte de nombreux avantages. En effet, elles agissent rapidement, elles ont un spectre relativement étroit et sont toxiques seulement pour les bactéries étroitement apparentées à la souche productrice

Dans ce contexte, nous nous sommes proposés dans ce présent travail d'apporter une contribution dans le domaine de la santé humaine, par la mise en évidence des bactéries lactiques pour la prévention des infections urinaires. La stratégie adoptée dans cette étude est l'isolement des bactéries lactiques issus de laits de vache et chèvre ainsi que de selles de nourrissons, afin d'avoir un maximum d'isolats potentiellement actives contre les pathogènes responsables d'infections urinaires, produisant des molécules de bactériocines.

La présente thèse est scindée en trois chapitres :

- Le premier chapitre, s'agit de rappels bibliographiques traitant les aspects qui portent sur l'état général des connaissances des bactéries lactiques, des infections urinaires ainsi que des bactériocines.
- Le second chapitre concernera la partie expérimentale et technique.
- Le troisième est essentiellement consacré à la présentation des résultats obtenus à l'issue de nos recherches et investigations, se répartissant quant à lui en six volets :

**Volet 01: Isolement et Identification des isolats lactiques**

**Volet 02: Etat des lieux des infections urinaires, et isolement des uropathogènes**

**Volet 03: Effet antimicrobien des isolats lactiques et Screening pour la production de bactériocines.**

**Volet 04: Optimisation des conditions de cultures des bactériocines**

**Volet 05 : Caractérisation des bactériocines**

**Volet 06: Identification moléculaire et détection de gènes codant pour des bactériocines**

Une discussion concernant les données obtenues est proposée avec analyse des résultats ayant été enregistrés au cours de ce travail, ainsi qu'une conclusion et perspectives.

# Chapitre I

---

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

# I. Les bactéries lactiques

## 1. Généralités

Les bactéries lactiques, de très anciens micro-organismes, utilisés pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans, sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation (**Drider et Prevost, 2009**). Ce n'est qu'à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, époque des grandes découvertes de la microbiologie, que le groupe des bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique a été défini, plus précisément en 1919 par Orla-Jensen. Il a réuni plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Tredez, 2008**).

Ce sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries à Gram positives, immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotoles, dépourvues de catalase (certaines souches possèdent une pseudo catalase sur des milieux riches en hème) de nitrate réductase, et de cytochrome oxydase (**Hélène, 2007 ; Atlan et al., 2008**). Ces bactéries forment un groupe relativement divers, ayant des caractéristiques physiologiques et métaboliques communes (**Schleifer et Ludwig, 1995; Stiles et Holzappel, 1997; Mayra-Makinen et Bigret, 1998; Yang, 2000**).

Leur forme peut être coccoïde, coccobacillaire ou bacillaire, elles sont généralement mésophiles avec une température optimum de croissance entre 20°C et 30°C ou thermophiles entre 40°C et 45°. La majorité des souches se développent à pH 4.0-4.5, certaines sont en activité à pH 9.6 et d'autres à pH 3.2 (**Jozala et al., 2005 ; Carr et al 2002 ; Kotelnikova et Gelfand, 2002**) (**Tableau I.1**).

Les bactéries lactiques sont caractérisées par un métabolisme exclusivement fermentaire leur permettant, en utilisant des sucres fermentescibles tel le glucose, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique.) (**Raynaud., 2006**).

Du point de vue nutritionnel, les bactéries lactiques se caractérisent par des exigences assez complexes, en ce qui concerne les acides aminés, les acides gras, les peptides, les vitamines, les glucides fermentescibles et les sels. Ces bactéries servent à de très nombreux procédés, aussi bien dans la transformation du lait, que dans la fermentation des végétaux, dans l'œnologie et dans la production des produits carnés fermentés (**Guiraud, 1998**), ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (**Generally Recognized As Safe**) (**Klaenhammer et al., 2005**).

**Tableau I.1 : Propriétés des principales bactéries lactiques mésophiles et thermophiles (Liebefeld, 2002)**

Espèces	Propriétés				
	<i>Lactococcus lactis</i> ssp			<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp	
	<i>lactis</i>	<i>cremoris</i>	<i>diacetylactis</i>	<i>cremoris</i>	<i>mesenteroides</i>
<b>Fermentation lactique</b>	homofermentation			hétérofermentation	
<b>Configuration de lactate</b>	L+			D-	D-
<b>Acidité produite</b>	45°SH			25°SH	
<b>Vitesse d'acidification</b>	Rapide			Lente	
<b>T° de croissance* (T° d'incubation)</b>	20- 30°C (30°C)			20- 30°C (25°C)	
<b>Fermentation du citrate</b>	Non			Oui	
<b>Pouvoir de protéolyse</b>	faible				
Propriétés	Espèces				
	<i>Str. homofermentaire.</i>	<i>Lb. homofermentaires</i>		<i>Lb. hétérofacultatifs</i>	
<b>Configuration de lactate</b>	L+	D-		L+ et D-	L+
<b>Acidité produite</b>	35°SH	40 - 70° SH	55 - 70° SH	> 80°SH	<25°SH
<b>T° de croissance* (T° d'incubation)</b>	30- 50°C (38°C)		20- 50°C (38°C)		20- 40/ 45°C (38°C)
<b>Fermentation ducitrate</b>		non			Oui
<b>Pouvoir de protéolyse</b>	faible	moyenne		forte	moyenne
<b>Utilisation</b>	Fromage, Yogourt	fromage	Yogourt, pâtes midures	Spécialités régionales	Culture complémentaire pour Fromage

D: L'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration D; L: L'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration L; D+L: L'acide lactique est sous forme racémique.

Par ailleurs, leur caractère pathogène est extrêmement réduit, puisque seules certaines espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* peuvent être impliquées dans des infections digestives, respiratoires ou urogénitales (Dellaglio et al. 1994). Elles sont considérées comme de bons probiotiques (Ashraf et al, 2009).

## 2. Origine et habitat

Les bactéries lactiques sont des germes ubiquistes, se trouvant dans différents environnements, aptes à se développer sur différents substrats autres que le lait (Tailliez, 2001). Leur présence est révélée dans plusieurs niches écologiques entre autres végétales

(plantes, fruits, légumes, céréales), animales et humaines (tractus digestif, cavités buccales et urogénitales). A titre d'exemple, les espèces du genre *Streptococcus*, *Lactococcus* sont présents chez l'homme et chez les animaux où elles sont isolées à partir de leurs peaux, de leurs matières fécales, et elles sont aussi isolées de l'ensilage du foin et des grains. **(Dellaglio et al., 1994; Mathara et al., 2004)**. Par ailleurs, les espèces du genre *Lactobacillus* sont encore plus répandues dans la nature; elles se trouvent sur les végétaux mais également dans l'intestin des animaux et de l'homme. Certaines espèces comme *Lb. acidophilus* entrent en composition au niveau de la flore commensale de l'intestin et du vagin, où sa présence empêche l'invasion par *Candida albicans*. Les espèces du genre *Pediococcus* ne se rencontrent pratiquement que sur les plantes **(Guiraud, 1998)**.

Même si elles se développent dans une variété d'habitats, les bactéries lactiques exigent des carbohydrates fermentescibles, des acides aminés, des acides gras, des sels et des vitamines pour leurs croissance **(Shihata et Shah, 2000; Hammes et Hertel, 2003)**.

D'une façon générale, les bactéries lactiques sont présentes partout où il y a de fortes concentrations de glucides, de produits de dégradation des protéines, de vitamines et peu d'oxygène **(Marteau, 2007)**.

### **3. Interaction bactéries lactiques-Hôtes**

Les bactéries lactiques se trouvent à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte (homme ou animal) dans un écosystème bactérien tel le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères **(Klein et al., 1998)**.

Les différentes espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis* et / ou *Lc. garvieae*, les plus rencontrées en industrie agroalimentaire, étant communément utilisées comme ferments (starter culture) pour la production de produits laitiers. Par ailleurs, les bactéries lactiques sont également à l'origine de la fermentation utilisée pour la préparation de boissons à partir de plantes (boza, cidre...), il s'agit dans ce cas des espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* **(Gálvez et al., 2011)**.

Les bactéries lactiques ont toutefois la capacité de vivre en symbiose entre elles ainsi qu'avec un hôte. La symbiose est une association intime et durable entre deux organismes hétérospécifiques (espèces différentes), parfois plus. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par les bactéries lactiques (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*). Cependant, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis*, pathogène responsable

de la trichomonase vaginale (**Björkroth et Holzapfel, 2006, Ruiz et al., 2009**) ou encore *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (**Falagas et al., 2006, Pirotta et al., 2004**).

#### 4. Taxonomie des bactéries lactiques

L'élaboration de la taxonomie est basée sur un large ensemble de critères regroupant les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques (**Pot, 2008**).

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'aptitude de croître à de fortes concentrations de sels (6.5%, 18%), la tolérance aux pH acides, alcalins et à l'éthanol, la configuration de l'acide lactique produit à partir de glucose, l'hydrolyse de l'arginine, la formation d'acétoïne, etc. Les marqueurs chimio-taxonomiques comme la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire peuvent aussi être utiles dans la classification (**König et Fröhlich, 2009**).

L'identification des espèces de bactéries lactiques peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates à l'aide du système API 50 CHL (**Curk et al., 1993**).

Selon la dernière édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2009), les bactéries lactiques sont classées dans l'embranchement des *Firmicutes*, la Classe des *Bacilli* et l'ordre des Lactobacillales, renfermant ainsi trente-cinq genres répartis sur six familles (**Figure I.1**).

Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans le domaine de la biotechnologie, il s'agit de :

***Aerococcus*** : De forme ovoïde (1-2µm de diamètre), α-hémolytiques, non-gazogènes, arginine(-), pouvant croître à une concentration de 6.5% de NaCl, la division se déroule sur deux plans formant ainsi des tétrades. Des cellules isolées ou en paires peuvent être observées au milieu de la phase exponentielle.

***Carnobacterium*** : Ce genre est constitué de bâtonnets courts parfois incurvés isolés ou en paires, pouvant se développer à pH 9 et incapables de croître à 8% de NaCl ; quelques espèces sont catalase (+).

***Enterococcus*** : Cellules ovoïdes, isolées en paires ou en courtes chaînes, homofermentaires. Quelques espèces sont mobiles par des petits flagelles et d'autres possèdent une pseudo-catalase. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6.5% de NaCl, un pH 9.6 et un intervalle de température compris entre 10°C et 45°C, avec un optimale de croissance de 35°C à 37°C.

***Lactobacillus*** : Ce sont soit des bacilles longs (incurvés) ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes. Elles sont généralement immobiles à l'exception de quelques espèces qui possèdent des flagelles péritriches. Acidophiles et peuvent croître à un pH optimum variant de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C,

***Lactococcus*** : De forme sphériques ou ovoïdes, isolées en paires, ou en chaînes. De type mésophiles, leur température optimale est comprise entre 10 et 40°C, mais sont incapables de se développer à 45°C. Celles-ci se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5.

***Leuconostoc*** : Ce genre comprend 10 espèces fastidieuses dans leurs exigences nutritionnelles, de forme ellipsoïdales à sphériques généralement allongées qui s'arrangent en paires ou en chaînes, non acidophiles avec un pH optimum de croissance égal à 6.5. Concernant la température optimale est comprise entre 20°C et 30°C. Capables de produire du dextrane en milieu concentré en saccharose.

***Oenococcus***: Immobiles, asporulantes de forme ellipsoïdale à sphérique, avec un arrangement en paires ou en chaînes, non hémolytiques et généralement non protéolytiques. Exigeantes quant au milieu de culture qui doit être riche en acides aminés et en facteurs de croissance, leur pH optimum étant de 6 à 6,8 et la température optimale de 20°C à 30°C.

***Pediococcus*** : Immobiles de forme sphérique parfois ovoïdes, isolées ou en paires qui se divisent en deux directions perpendiculaires formant ainsi les tétrades mais jamais les chaînes. Les cellules sont acidophiles à pH : 5, la température optimale de croissance est comprise entre 25°C à 35°C.

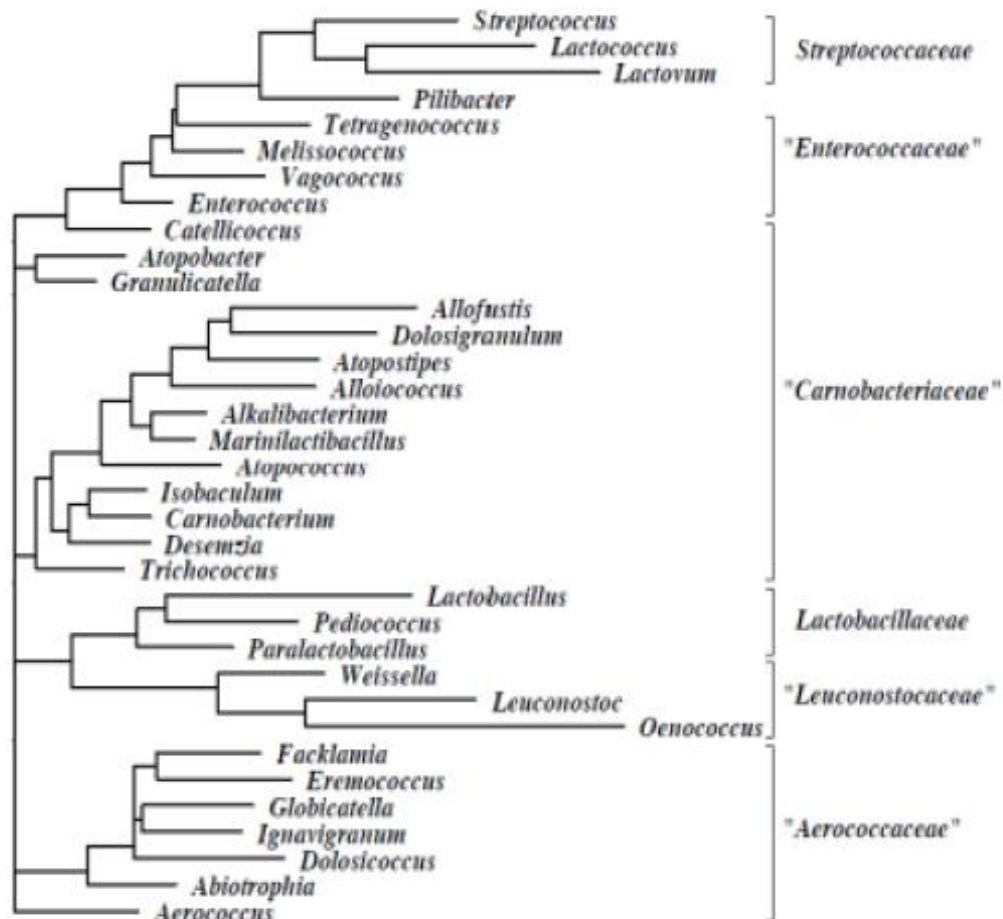
***Streptococcus*** : Immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à un pH 9.6.

***Vagococcus*** : Ovoïdes isolées, en paires ou en chaînes. La plupart des espèces sont mobiles par des flagelles péritriches. Elles sont capables de croître à 10°C mais non à 45°C sans production de gaz ni d'arginine dihydrolase (ADH).

***Tetragenococcus***: Cellules sphériques ou ovoïdes avec un diamètre de 0.5-1.0 µm, immobiles, formant des tétrades, comme elles peuvent être isolées ou en paires. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 35°C et ne peuvent pas croître à 10°C et à 45°C.

**Weissella** : Ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes et sont immobiles. Leur température optimale de croissance est de 15°C, mais quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 45°C.

Parmi tous les genres cités, seulement *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* répondent aux caractéristiques générales d'une bactérie lactique proprement dit (Salminen *et al.* 2004).



**Figure I.1** : Arbre phylogénétique de l'ordre de *Lactobacillales* (Ludwig *et al.*, 2008).

La taxonomie bactérienne moderne basée sur les caractéristiques phénotypiques et génotypiques a eu comme conséquence la reclassification de beaucoup d'espèces de bactéries lactiques, ces derniers sont un groupe phylogénétique divers avec un GC de 50% (guanine et cytosine) en leur ADN (Novel, 1993).

Les méthodes taxonomiques modernes appliquées aux BL incluent la caractérisation phénotypique et l'analyse génotypique. Les méthodes phénotypiques employées sont l'analyse de la composition de la paroi cellulaire bactérienne (de Ambrosini *et al.*, 1996), empreinte digitale de protéine par l'analyse de toutes les protéines cytoplasmiques solubles et la mobilité

électrophorétique de certaines enzymes (**Kunene et al., 2000**), incluant la nature des acides gras, tels que l'acide des lactobacilles (C19:0) et les acides gras insaturés (C14:0, C16:0, C18:0) qui la composent (**Gilarová et al., 1994**).

La classification est également possible avec des méthodes génotypiques (RAPD-PCR, ribotyping) ou d'autres techniques semblables. Elle permet une nouvelle approche phylogénétique. Le génome des bactéries lactiques varie selon le genre et selon l'espèce (1 à 5 millions de paires de base). Cette variabilité peut servir pour différencier les groupes bactériens (**Tableau I.2**) (**Bolotin et al., 2001**).

**Tableau I.2** Le poids moléculaire de certains génomes de bactéries lactiques et le nombre de gènes révélés (**Mills, 2004**)

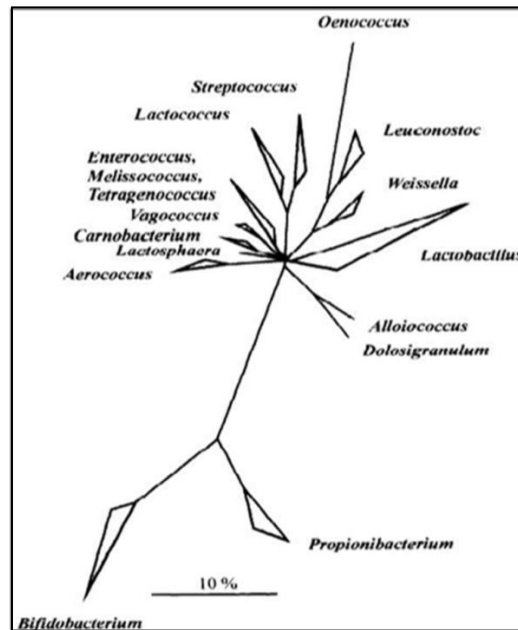
Espèce	Souche	Kpb (10 <sup>3</sup> )	Genes
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	SK11	2.3	2693
<i>Ln. mesenteroides</i>	ATCC 8293	2	1882
<i>Pc. pentosaceus</i>	ATCC 25745	2	1673
<i>Lb. delbruecki</i> subsp. <i>bulgaricu</i>	BAA-365	2.3	1602
<i>Lb. casei</i>	ATCC 334	2.5	2526
<i>Lb. gasseri</i>	ATCC 33323	1.8	1708
<i>Lb. brevis</i>	ATCC 367	2	1573
<i>Sc. thermophilus</i>	LMD-9	2.1	1910
<i>Bf. longum</i>	DJ010A	2	2122
<i>Br. linens</i>	BL2	3	4231

Les BL possèdent un % GC au dessous de 50%, cependant certaines espèces de *Lactobacillus* ont des valeurs pouvant atteindre 55% (**Axelsson, 2004**). Le contenu en GC peut être déterminé selon le Tm, dans le cas de la dénaturation (**Marmur et Doty, 1962; Xu et al., 2000**) ou directement à partir de la dégradation des nucléosides par la méthode HPLC (**Mesbah et al., 1989**).

Les méthodes d'hybridation ADN/ADN sont basées sur le fait que deux molécules d'ADN dénaturées peuvent se réassocier à condition de présenter une homologie. La renaturation est réalisée à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de bactéries différentes. Une étude basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S et/ ou 23S des bactéries lactiques propose une classification en 3 groupes : groupe des *Leuconostoc*, groupe

des *Lactobacillus delbrueckii* (*Lb. delbrueckii*) et groupe des *Lb. casei*, *Pediococcus* (Rodrigues *et al.*, 1991).

La stabilité des ARNr est mise à profit afin d'analyser les relations des bactéries au niveau de l'espèce et à des niveaux hiérarchiques plus élevés (Stackebrandt et Goebel, 1994). L'ARNr 16S est utile à la classification phylogénétique et à l'identification bactérienne puisqu'il est présent chez toutes les bactéries (Figure I.2) (Collins *et al.*, 1989 b; Collins *et al.*, 1990).



**Figure I.2 :** Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzappel, 1997).

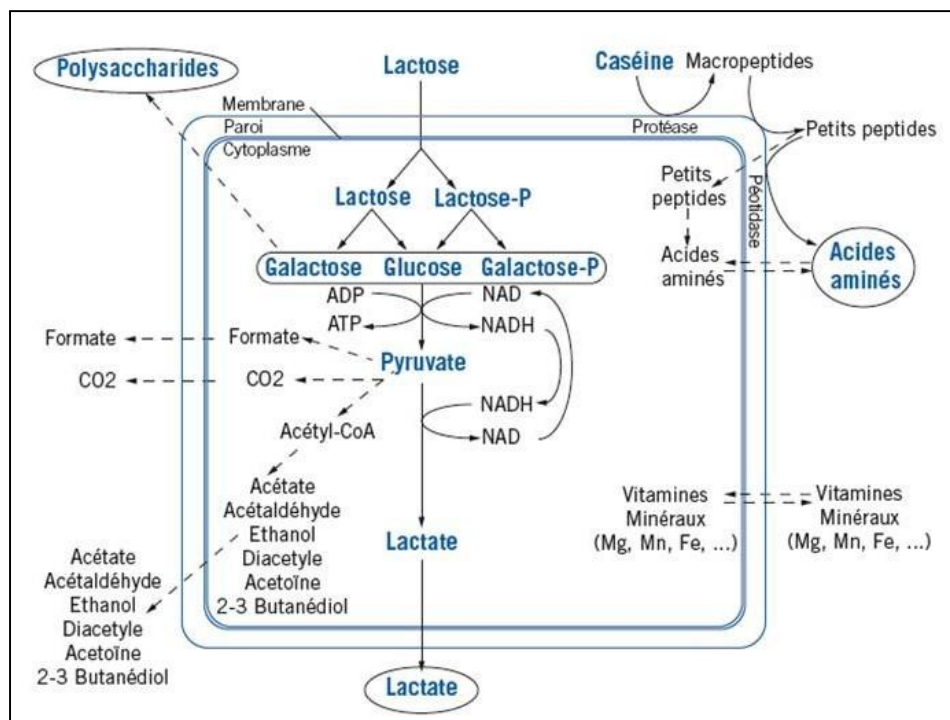
Les programmes FASTA et BLAST permettent de comparer une séquence nucléotidique d'une souche inconnue avec les banques de séquence, qui vont par la suite retenir les séquences les plus proches (Altschul *et al.*, 1997).

La possibilité d'analyser l'ADN par des enzymes de restriction a aussi ouvert la voie à la comparaison directe des génomes en particulier après électrophorèse en champs pulsés (Ventura *et al.*, 2001).

Ces techniques modernes d'identification permettent d'établir de véritables arbres généalogiques entre les bactéries et aussi de reconnaître l'évolution des espèces et leur phylogénie au fil du temps, notamment que l'espèce représente l'élément de base de la taxonomie bactérienne (Schleifer *et al.*, 1991). De plus, un grand nombre d'outils sont disponibles, permettant d'étudier et de contrôler l'expression des gènes. Récemment, le génome de la sous-espèce *lactis* a été entièrement séquencé (Bolotin *et al.*, 2001).

## 5. Physiologie et voies métaboliques des bactéries lactiques

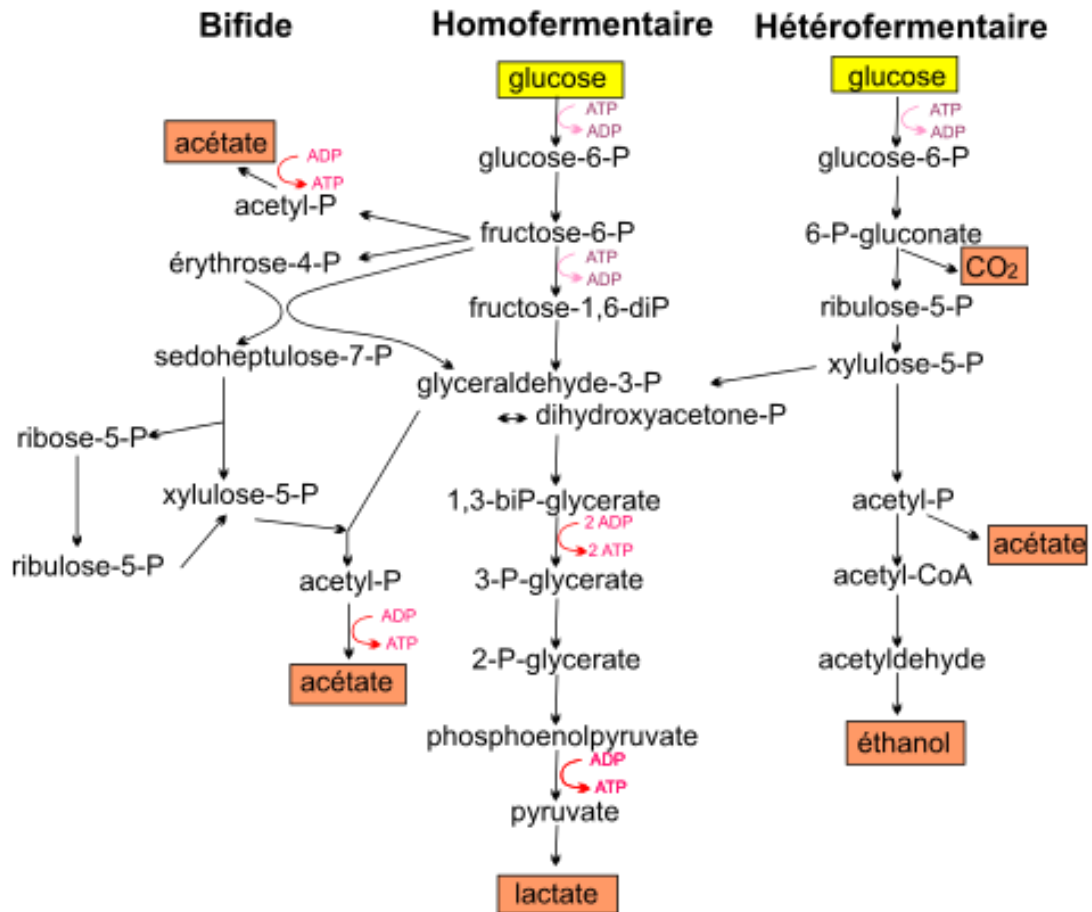
Afin de classer les bactéries lactiques, deux principales voies de fermentation des hexoses sont utilisées. Lors de la réunion des conditions d'excès de glucose et d'oxygène limité, les bactéries lactiques homofermentaires catabolisent une mole de glucose dans la voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pour donner deux moles de pyruvate. Grâce à l'oxydation du NAD, l'équilibre Redox intracellulaire a été maintenu, concomitante avec la réduction du pyruvate en acide lactique. Ce processus donne deux moles ATP par le glucose consommé (Luquet et Corrieu, 2009) (Figure I.3).



**Figure I.3:** Les voies métaboliques des bactéries lactiques (Luquet et Corrieu, 2009)

A titre d'exemple, le groupe des bactéries lactiques dit Homolactique comprend *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, et du Groupe I lactobacilles. Cependant, les bactéries lactiques Hétérofermentaires utilisent la voie des pentoses phosphates. Une mole de glucose-6-phosphate est initialement déshydrogénée à 6 phosphogluconate puis décarboxyler d'une mole de CO<sub>2</sub> (Figure I.4). Le résultant des pentoses-5-phosphate est clivé en un phosphate glycéraldéhyde mole (GAP) et un phosphate acétyle taupe. GAP est par la suite métabolisé en lactate comme dans l'homofermentation, avec l'acétyl phosphate réduite à l'éthanol par l'intermédiaire de l'acétyl-CoA et acétaldéhyde (Alomar, 2007).

Enfin, le métabolisme du genre *Bifidobacterium* est assez particulier, en effet il s'agirait de la voie fermentaire bifide ou voie de la fructose-6-P phosphocétolase (FPC). Le fructose-6-P est scindé par la fructose-6-phosphate phospho-cétolase en érythrose-4-phosphate et en acétyl-phosphate et du glycéraldéhyde-3-phosphate afin de former de l'acétyl-phosphate et du glycéraldéhyde-3-phosphate (**Figure 04**) (**Drideret al. 2009**).



**Figure I.4 :** Voies métaboliques homofermentaire, hétérofermentaire et bifide de la dégradation du glucose (**Drider et al., 2009**).

## 6. Intérêt des bactéries lactiques

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

### 6.1. Dans le domaine alimentaire

L'implication des bactéries lactiques dans la fermentation et la bioconservation des aliments est connue depuis la nuit des temps. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (**Yateem et al., 2008**). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le

pain au levain sont entre autres des produits de fermentation des bactéries lactiques (**Yvette Soustre, 2009**). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et par conséquent augmenter la durée de leur conservation sans pour autant utiliser de conservateurs chimiques, et ce grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles produisent (**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, innocuité, facilité de culture, de conservation, et maintenance des propriétés désirables lors du stockage (**Marth et Steele, 2001**).

## **6.2. Dans le domaine thérapeutique**

Les bactéries lactiques, considérées comme tant des probiotiques, confèrent des bénéfices à l'hôte en maintenant une balance de la microflore intestinale (**Yateem et al., 2001**). Différentes études ont démontré aussi bien le rôle préventif que curatif de ces bactéries sur différents types de diarrhées (**Mkrtchyan et al., 2010**). D'autres ont cité leur capacité à diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (**El-Ghaish et al., 2011**). Cependant depuis quelques années l'usage des bactéries lactiques dans d'autres écosystèmes (vaginal, mammaire) est évalué, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques (contre les métrites ou les mammites) (**Bouchard, 2013**), également dans l'élaboration des vaccins (**Calvez et al., 2009**).

**Uehara et al., (2006)** ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires à 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, ainsi que des problèmes liés aux infections urinaires.

## **II. Infections urinaires**

### **1. Epidémiologie et Physiopathologie**

La présence d'un germe pathogène anormal dans l'urine, correspond à une infection urinaire, et ce suite à une symptomatologie compatible. Les infections urinaires (IU) peuvent être localisées dans les voies urinaires basses (cystite, urétrite, prostatite) comme dans les voies urinaires hautes (pyélonéphrite ou pyélite) (**Vorkauffer, 2011**).

Ce sont les infections bactériennes les plus communes chez la femme en particulier, elles correspondent à une inflammation associée à une infection de la vessie suite à la prolifération anormale d'agents infectieux dans le système urinaire (**Abad et al., 2009**).

50% des femmes ont au moins un épisode symptomatique au cours de leur vie. Un tiers de femmes ayant eu un premier épisode d'IU souffrira d'infections urinaires récidivantes. Contrairement chez les hommes, les infections urinaires surviennent dans 20% des cas. On y distingue deux types:

**1.1. Infection urinaire communautaire (Endogène):** Infection urinaire d'origine communautaire, dite endogène lorsqu'elle est acquise hors de l'hôpital c'est à dire une infection non nosocomiale (**Delaeare ,2000**). Elle est provoquée par la propre flore du malade à partir des germes cutanés (staphylocoques à coagulase négative, corynébactéries), ou muqueuses du périnée, de la peau de l'abdomen ou digestifs d'origine intestinale (entérobactéries, streptocoques, anaérobies) (**Lentilhac, 2002; Botto, 2003**).

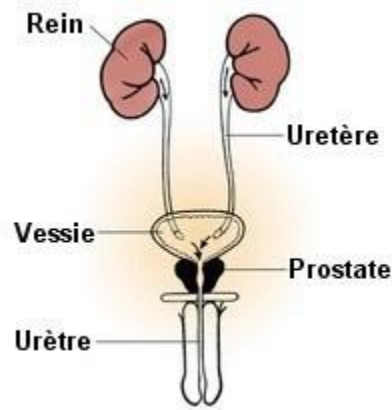
**1.2. Infection urinaire hospitalière (Exogène):** Infection urinaire d'origine clinique (hospitalière) est dite nosocomiale, provoquée par un germe provenant d'un autre patient hospitalisé, lorsqu'elle est acquise dans une structure de soins ou d'une manière plus générale reliée à la prise en charge du patient, de manière directe ou indirecte par l'intermédiaire de matériel ou de l'environnement soignant (**Girard et al., 2009**).

## **2. Prévalence des infections urinaires**

Chez la femme, la fréquence augmente avec l'âge, avec 2 pics importants, l'un au début de l'activité sexuelle et l'autre en période post ménopausique. Contrairement, chez l'homme, la fréquence augmente après 50 ans, en relation notamment avec la pathologie prostatique (**Figure I.5**).

Différents facteurs favorisant l'infection urinaire ont été identifiés (**Foxman et al., 2000 ; Foxman, 2002 ; Czaja et Hooton, 2006**) :

- Activité sexuelle
- Utilisation de spermicides
- Troubles du comportement mictionnel (mictions rares, retenues, incomplètes)
- Diabète déséquilibré et/ou compliqué (neuropathie vésicale).



**Figure I.5 :** Voies excrétrices de l'urine et prostate

### 3. Types d'infection urinaire

#### 3.1. Les infections urinaires basses

- **La cystite**

Atteinte infectieuse de la paroi vésicale, très fréquente chez la femme. Elle associe une pyurie, des brûlures mictionnelles et douleurs abdominales (**Jardin, 1993**).

La cystite résulte de la réponse inflammatoire à l'adhérence des bactéries à la surface de la muqueuse de la vessie ou de l'urètre. Le plus souvent secondaire à une infection par des germes pathogènes tels qu'*Escherichia coli* ou *Proteus mirabilis*, et plus rarement à des champignons (*candida albicans*). Elle doit être considérée comme bénigne, sans gravité ni conséquence démontrée sur la fonction rénale. 30 à 40 % des cystites guériraient spontanément sans traitement (**Stamm et Hooton, 1993 ; Sa Ussine, 2005**).

- **L'Urétrite**

L'infection de l'urètre entraîne chez l'homme une difficulté à uriner, une douleur à l'écoulement de l'urine et généralement un écoulement urétral (**Aninch et Tanagho, 1991**).

- **La prostatite**

Infection chronique ou récidivante de la prostate par des agents bactériens (**Delavierre, 2007**). Une bactériurie significative ne peut être mise en évidence que chez quelques 5% des patients ayant une symptomatologie. Les signes évocateurs sont les mêmes que ceux d'une cystite chez la femme à la différence qu'elle est fébrile chez l'homme. C'est la cause la plus fréquente d'infections urinaires à répétition chez l'homme (**Bruyère et al., 2008; Emonet et al., 2011**). Elle débute chez l'adulte jeune par une fièvre élevée, intense, avec frisson, des myalgies et des arthralgies associées à des signes d'infection urinaire tels que la brûlure mictionnelle (**Daniel et al., 2003**).

### 3.2. Les infections urinaires hautes

- **La pyélonéphrite**

C'est une atteinte des voies urinaires hautes et du parenchyme rénal. Les signes cliniques sont : la fièvre élevée, les vomissements les lombalgies aiguës et chroniques, définie par des critères : cliniques et bactériologiques (**Pangon et Chaplain, 2003**).

- **Germes en cause**

Les infections urinaires sont généralement causées par un seul micro-organisme. *L'Escherichia coli* est l'agent responsable dans plus de 80 % des infections. Le genre *Staphylococcus* représente 10 % à 15 % des infections (**Tajeddin et Stalder, 2002 ; Ronald, 2002**).

#### 4. Caractéristique des Uropathogène

- ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Gram négatifs, anaérobies facultatifs, non sporulés, oxydase négative. Il s'agit de courts bâtonnets mobiles au moyen de flagelles. Bactérie généralement commensale de la microflore bactérienne normale du tube digestif de l'homme. *Escherichia coli* peut également être à l'origine de pathologies extra-intestinales (méningites, infections urinaires) ou intestinales (**Brinon, 2007**).

*Escherichia coli* pathogènes regroupent à ce jour six pathotypes responsables d'infections intestinales (**Kaper et al., 2004**) ainsi que les *E. coli* extra-intestinales (**Anderson et al., 2004, Mokady et al., 2005, Smith et al., 2007, Wiles et al., 2008**).

- ***Proteus spp***

Les principales bactéries isolées dans les urines et les organes de l'appareil urinaire sont une flore fécale, à dominante colibacillaire. (**Dupas M., 2004**).

Selon **Avril, 1988**, les espèces du genre *Proteus spp*, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, sont des bacilles Gram négatif fins (0,5µ) et protéiformes (d'où leur nom). Bactéries saprophytes du tube digestif (5% de la flore aérobie), *Proteus sp* sont extrêmement mobiles.

Ainsi, les espèces du genre *Proteus* sont largement répandues dans l'environnement, elles peuvent se comporter comme des germes pathogènes opportunistes dans certains cas très particuliers. Chez l'homme, les infections les plus fréquentes par ces bactéries concernent l'appareil urinaire, il s'agit de la souche la plus souvent isolée dans les infections urinaires, après *Escherichia coli* (**Madec., 1990**).

- ***Klebsiella spp***

*Klebsiella* Gram négative, ce sont des bactéries immobiles en diplobacilles généralement capsulées, très abondante dans la nature, commensales de l'homme et responsables d'infections opportunistes hospitalières. Parmi les espèces couramment rencontrées, *Klebsiella pneumoniae* qui est un agent de pneumopathies aiguës, représente une cause fréquente d'infections urinaires nosocomiales (**Madigan et Martinko, 2007**).

Les infections associées à *Klebsiella spp* sont, plus fréquemment, urinaires mais touchent aussi les voies respiratoires supérieures, les voies biliaires et les plaies chirurgicales (**Harrison, 2002**). La production de la capsule fait aussi obstacle aux défenses de l'hôte en perturbant la phagocytose (**Perry et al., 2004**).

- ***Staphylococcus spp***

*Staphylococcus spp*, coques à Gram positif, présente des cellules immobiles sphériques de 0,5 à 2,5 µm de diamètre, isolées par paires ou en amas.

Les infections urinaires à staphylocoques sont la plupart du temps dues à l'espèce *S. saprophyticus*. Cette bactérie est un pathogène opportuniste important qui entraîne des infections des voies urinaires (cystite, pyurie ou pyélonéphrite), en particulier chez les jeunes femmes sexuellement actives. *S. saprophyticus* est considéré comme la deuxième cause d'infections des voies urinaires chez ces patientes (**Jidar, 2007**).

D'autres espèces de staphylocoques comme *S. warneri*, *S. epidermidis* et *S. aureus* peuvent également être impliquées dans les infections urinaires (**Götz et Bannerman 2006**).

- ***Candida albicans***

Les levures représentent une infection réelle des voies urinaire. On distingue *Candida albicans*, parmi les dizaines d'espèces qui sont pathogènes pour l'homme, le pathogène de loin le plus fréquemment isolé (**Feigin et Cherry, 2004**).

Les *candida* sont des commensaux naturels du tube digestif, de la peau et de l'appareil génital chez la femme. La cystite à *candida* se développe par voie ascendante (**Querin et Valiquette, 2000**).

Certaines conditions favorisent son passage à un stade pathogène (**Bonn et Blanc, 2008 ; Hopp et Blatensweiler, 2009**).

Cette levure vit à l'état saprophyte dans le tube digestif humain où elle est présente dès les premiers mois de la vie, transmise par contact maternel (**Agbo-Godeau et Guedj, 2005**).

## 5. Processus d'adhésion des uropathogènes - bactéries lactiques

Parmi les étapes primordiales lors de la colonisation de l'hôte par les uropathogènes notamment au sein de l'écosystème urogénital, est leur adhésion aux tissus épithéliaux. Les bactéries lactiques probiotiques présentent un réel intérêt, et ce grâce à leurs propriétés pouvant ainsi réduire l'adhésion des microorganismes aux muqueuses intestinales et vaginales, en agissant sur les muqueuses les stimulant ainsi à la production de mucus, en entrant en compétition pour les sites d'adhésion des pathogènes ou bien par action directe sur le pathogène lui-même en bloquant son interaction avec l'épithélium, notamment par leur capacité d'auto- et de co-agrégation (Velraeds et al., 1998).

Il est par ailleurs prouvé que les espèces de *Lactobacillus* comme *L. acidophilus* peuvent inhiber l'adhésion des souches de *Escherichia coli* uropathogènes à diverses surfaces (Velraeds et al., 1998). Mc Millan et al. 2011 a pu montrer l'aptitude d'une souche de *L. rhamnosus*, à déplacer un biofilm d'*Escherichia coli* uropathogènes.

## 6. Effet antibactérien des bactéries lactiques vis-à-vis des Uropathogènes

Différents agents antimicrobiens ayant la capacité d'inhiber le développement des bactéries pathogènes sont produits par les bactéries lactiques. Cependant, lorsqu'ils atteignent une certaine concentration, ces composés peuvent interrompre la croissance des souches productrices (autoinhibition). Ces interactions négatives faisant intervenir la production de substances inhibitrices, s'agiraient d'amensalisme (Gilliland, 1985). Ces métabolites, tels que le dioxyde de carbone, les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène ou encore les bactériocines participent à ce phénomène (Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Van de Guchte et al, 2001 ; Siewewerts et al, 2008).

Ces moyens de défense inhibiteurs peuvent être à la fois bénéfiques et nuisibles vis-à-vis de la santé de l'hôte ; néanmoins ils contribuent fortement au maintien de l'équilibre de la flore intestinale. (Klaenhammer, 1993). L'hôte est affecté positivement, et ce en améliorant la balance de cette flore intestinale par le biais des bactéries lactiques (Fuller et al., 1989). Cependant, ces derniers permettent également la création des conditions défavorables pour le développement des flores pathogènes (Mauntzairis et al., 2007).

De nombreuses souches de lactobacilles présentent un effet protecteur pour l'organisme hôte contre une variété des entéropathogènes incluant *Salmonella* (Gill et al., 2001), *C. difficile* (Billes et al., 1995), et *E. coli* (de Waard et al., 2002).

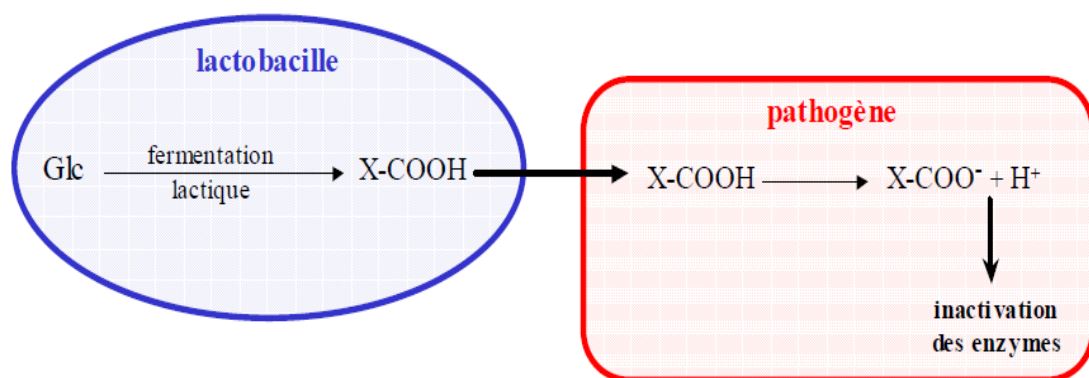
### III. Les bactériocines des bactéries lactiques

#### 1. Substances antagonistes

Les bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser des substances antagonistes, de nature non protéique pouvant être des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, les ions super oxyde d'hydrogène, les phages lactiques ou de nature protéique les antibiotiques et bactériocines (Klaenhammer et al., 1994).

- **Les acides organiques**

Les bactéries lactiques sont capables de produire de l'acide lactique, cette molécule neutre, seul acide issu de la glycolyse par voie homofermentaire, se diffuse librement à travers la membrane cellulaire contrairement à la voie hétérofermentaire où l'acide acétique est produit en plus de l'acide lactique, réduisent ainsi le pH, et empêchant par conséquent le développement des pathogènes (Crooks et al., 2012). L'action de l'acide lactique contre les bactéries Gram négative se fait par perméabilisation de la membrane (Alakomi H-L, et al 2000). De plus, les bactéries lactiques semblent être compétitives en conditions acides, causant l'inhibition d'autres bactéries (Klaenhammer et al., 1994). Cependant si l'acidité du milieu dépasse les seuils acceptés par la souche, des cas d'auto-inhibitions peuvent être observées, l'administration en continue de glucose au cours de la fermentation lactique, conduit à la production d'une manière continue des acides organiques, et par conséquent, une diminution progressive du pH du milieu et si celui-ci n'est pas contrôlé, la bactérie peut s'auto-inhiber (Figure I.6) (Grattepanche, 2005).



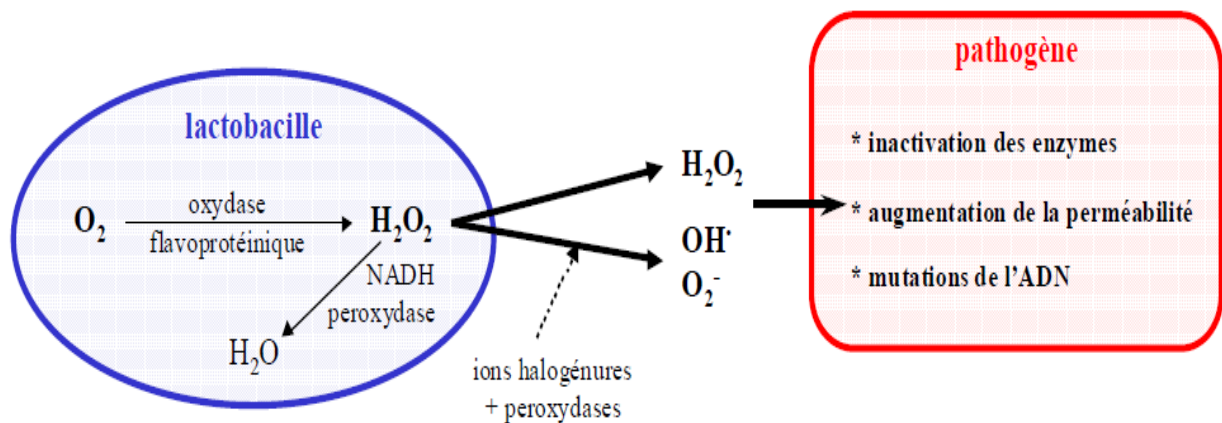
$\text{X-COOH} = \text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$  dans le cas de l'acide lactique

**Figure I.6 :** Mode d'action des acides organiques produits par les lactobacilles sur les pathogènes (Boskey et al., 2001).

- **Production du peroxyde d'hydrogène**

Les bactéries lactiques ne possèdent généralement pas de catalase. L'accumulation du peroxyde d'hydrogène sous l'action des oxydases, est la cause de la présence de l'activité antimicrobienne, notamment chez les lactobacilles (**Figure I.7**) (**Daeschel, 1989**). Cet effet antimicrobien, peut résulter de l'oxydation des groupes sulfhydryliques causant la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes, ainsi que de la peroxydation des lipides membranaire, de ce fait s'engendre l'augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire (**Kong et Davison, 1980; Davidson et al., 1983**). L' $H_2O_2$  peut également agir comme précurseur de la production de radicaux libres bactéricides à partir de l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) tels que le superoxide ( $O_2^*$ ) et radicaux d'hydroxyle (OH) qui peuvent endommager l'ADN (**Byczkowski et Gessner, 1988; Lindgren et Dobrogosz, 1990**). Capables également de transformer cet oxygène moléculaire en peroxyde ( $H_2O_2$ ) ou en eau ( $H_2O$ ) (**Touati, 2000**).

La quantité du peroxyde d'hydrogène produite par les bactéries lactiques dépend en grande partie de la souche et de la disponibilité de l'oxygène (**Helander et al., 1997**). Le peroxyde d'hydrogène possède donc un effet inhibiteur sur la croissance de micro-organismes ne possédant aucun système de défense adéquat comme les catalases (**Touati, 2000**).



**Figure I.7 :** Modes d'action du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés produits par les lactobacilles sur les pathogènes (**Ocana et al., 1999b ; Lepargneur and Rousseau, 2002**).

- **Ions super oxyde d'hydrogène**

Produit principalement par les bactéries lactiques hétérofermentaire. Cependant le mécanisme précis de son action antimicrobienne reste encore inconnu. Néanmoins cette action antimicrobienne, se traduit par la création d'un environnement anaérobie empêchant

les décarboxylations enzymatiques, ainsi que l'accumulation du CO<sub>2</sub> dans le milieu afin de générer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Eklund, 1984**).

Le CO<sub>2</sub> peut également empêcher la croissance de beaucoup de microorganismes pathogènes, plus particulièrement les bactéries psychrotrophes à Gram négatif (**Hotchkiss et al., 1999**). Le degré d'inhibition par le CO<sub>2</sub> dépend considérablement des espèces (**Lindgren et Dobrogosz, 1990**).

- **Les antibiotiques**

**Axelsson et al., (1989)** ont mis en évidence l'action inhibitrice d'une substance produite par *Lactobacillus reuteri* lorsque le glycérol est utilisé comme source de carbone (**Stackengrand et Tenber, 1988; Talarico et al., 1990**).

La reutéline fait partie des antibiotiques produits par les bactéries lactiques, la plus caractérisée et purifiée, identifiée en tant que reutéline (3-hydroxypropionaldéhyde), et est donc une substance antimicrobienne produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie (du glycérol). Elle a un large spectre d'activité, et une action contre les procaryotes (Gram positif ou Gram négatif). Ses applications sont aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (**Vollenweider, 2004**). Cependant Cet antibiotique bloque la synthèse de l'ADN, ce qui explique son large spectre d'action (**Talarico et Dobrogosz, 1989**).

- **Production de bactériocines**

Parmi les métabolites produits par les bactéries lactiques citées précédemment, il y a entre autres la synthèse de molécules de nature protéique : Les bactériocines. **Klaenhammer (1988)**, suggère que 99 % des bactéries peuvent produire au moins une bactériocine. Il s'agit de métabolites aux propriétés antibactériennes, des peptides ayant le pouvoir d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes (**Jasniewski, 2008**).

## **2. Généralités sur les bactériocines**

La découverte de la première bactériocine remonte à **1925** par **Gratia**, isolée d'*Escherichia coli*, possédant une activité bactéricide envers une autre souche d'*E. coli*. Elle fut nommée colicine V.

Le terme « bactériocine » a été proposé plus tard, par **Jacob et ses Collaborateurs** en **1953** afin de désigner les protéines et peptides antimicrobiens synthétisés selon la voie ribosomique (**Morisset, 2003**). Ces données conduisent à une utilisation intéressante des bactériocines comme outil biochimique en physiologie cellulaire (**Becker et al., 1993**). La

survenue d'interactions antagonistes entre les bactéries a été signalée par Pasteur et Joubert à la fin du 19ème siècle.

Les peptides antimicrobiens des bactéries lactiques sont les plus abordées dans la recherche. Ces substances de nature protéiques, ou partiellement protéique, dotées d'une activité antagoniste vis-à-vis des souches phylo-génétiquement proches des souches productrices, sont des toxines à spectre d'action plus ou moins large (**Riley et Wertz, 2002**). Elles sont généralement cationiques, hydrophobiques ou amphiphiliques, de faible poids moléculaire (2-6 kDa) composées de 20 à 60 acides aminés (**Nes et holo, 2000**).

Ces molécules constituent la deuxième cause de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques, après celle causée par les acides organiques. Leur synthèse par voie ribosomique les différencie des antibiotiques de nature peptidique provenant de l'assemblage enzymatique d'acides aminés libres (**Morsset, 2003**).

Parmi leurs propriétés communes, les bactériocines sont synthétisées dans la cellule sous forme de polypeptides, qui subiront une maturation au cours de leur transport vers le milieu extérieur (**Sebti, 2002**). Une nouvelle attention a été accordé à ces peptides antimicrobiens, plus particulièrement en épidémiologie des infections nosocomiales (**Lebek et al., 1993**).

### **3. Caractéristiques des bactériocines**

Les bactériocines, ces molécules anti-bactériennes, sont produites généralement lorsque les conditions de stress sont réunies, tel que les carences en nutriments. Leur action résulte en éliminant d'une façon rapide des cellules bactériennes utilisant d'une manière compétitive les substances nutritives (**Riley et Gordon, 1999**). La production des peptides antimicrobiens survient le plus souvent à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase de croissance stationnaire de la courbe de croissance (**Riley et Wertz, 2002**).

Les bactériocines sont des peptides synthétisés par les ribosomes, possédant une partie biologiquement active et démontrent un mode d'action bactéricide ou bactériostatique contre les souches bactériennes (**Jack et al., 1995**). Généralement thermostables et tolérantes aux variations du pH. Une classification a été établie sur la base de leur taille ainsi que leurs propriétés biochimiques et génétiques (**Drider et al., 2006**).

### **4. Classification des bactériocines**

Les bactériocines présentent une diversité structurale, à partir de laquelle une classification fut établie. Cette classification a été proposée en se basant sur leur structure primaire, leur structure tridimensionnelle, leur mode d'export, leurs mécanismes d'action, la

composition en acides aminés, la taille, le spectre d'activités ou la thermostabilité (Nes et al., 1996 ; Klaenhammer, 1993).

Cependant leur classification reste encore confuse et les critères précis de différenciation sont quant à eux aussi mal définis. Cette forte divergence a rendu leur classification assez difficile (Makhloufi, 2011).

**Bradley (1967)** a classé ces peptides antimicrobiens selon leur poids moléculaire en deux groupes :

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

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

- ❖ **Classe I : les lantibiotiques ou bactériocines modifiés** : Ce sont de petits peptides hydrophobes, possédant une masse moléculaire comprise entre 1.8KDa et 4.1KDa comprenant les acides aminés inhabituelles obtenus par modification post-traductionnelle (Van Der Meer et al., 1993) : la lanthionine - la P méthyllanthionine et des résidus déshydraté (la déhydroalanine et déhydrobutyrine) (Carine et al., 2009) liés par des ponts soufrés intra chaîne, sont synthétisées par plusieurs genres microbiens Gram positif (Cleveland et al., 2001). Dans le cas des bactéries lactiques l'exemple type est la nisine produite par *Lactococcus lactis*. Ce groupe de bactériocines se scinde en trois catégories selon la structure des peptides et leurs modes d'action : les linéaires (type A), les globulaires (types B) et les multi-composantes (type C) (Heng, N. C. K., et al 2006, Jung, G. (1991). Les lantibiotiques dits linéaires sont habituellement des peptides cationiques ayant une forme allongée. Cette catégorie comprend des bactériocines comme la nisine A, l'épidermine et la lacticine 481. Ils sont en plus subdivisés en deux sous-classes, A(I) et A(II), selon leur structure. Les globulaires, pour leur part, comprennent des peptides de forme sphérique chargés négativement comme la mersacidine et la cinnamycine (McAuliffe, 2001, Nagao et al., 2006). Quant aux peptides multi-composants sont des bactériocines dont l'activité antibactérienne est le résultat de la combinaison d'au moins deux peptides. La lacticine 3147 (Ryan., et al 1996) et la cytolysine (Coburn et al., 2003) se retrouvent dans cette catégorie (Figure I.8).

- ❖ **Classe II : bactériocines ne possédant pas d'acides aminés modifiés** : Contient-les bactériocines constituées de peptides de faible poids moléculaire, habituellement inférieur à 15 KDa et thermostable (entre 30 min à 100°C et 15 min à 121°C), à spectre étroit où leur activité est dirigée contre les bactéries phylogénétiquement différentes, les plus étudiées dans cette classe : la diplococcine qui est produite par plusieurs souches de *Lactococcus lactis sp cremoris*, la lactococcine A, la lactocine 27, la lactacine B et F (Davay et Richardson, 1981).
- ❖ **Classe III** : Cette classe concerne les bactériocines de haut poids moléculaire (plus de 30KDa), étant sensibles à la chaleur. L'entérollysine A, synthétisée par *En. faecalis*, appartient à cette classe et présente une activité anti-*Listeria sp.* (Nilsen et al., 2003; Nigutova et al., 2008). Cette protéine possède dans sa région N-terminale une activité « endopeptidase-like ».
- ❖ **Classe IV** : Comporte les bactériocines couplées à une partie non protéique, sucre ou lipide nécessaire à l'activité inhibitrice, cette classe fut ajoutée suite à l'observation de la perte de l'activité de certaines bactériocines après leur incubation en présence d'enzymes dégradant les sucres et les lipides (Jiménez -Diaz et al., 1993) mais son existence reste controversée ( Nés et al, 1996).

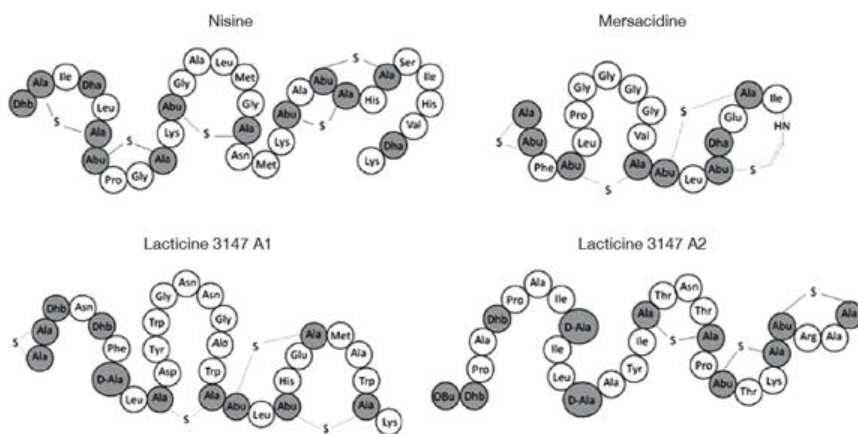


Figure 1. Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2) — Sequence and structure of a type A lantibiotic (Nisin), a type B lantibiotic (Mersacidin) and a « two-peptides » lantibiotic (Lacticin 3147 A1 and A2).

**Figure I.8** : Séquence et structure de lantibiotique de type A (Nisine), B( Mercacidine) et d'un lantibiotique « two peptides » (McAuliffe et al, 2001).

## 5. Biosynthèse des bactériocines des bactéries lactiques

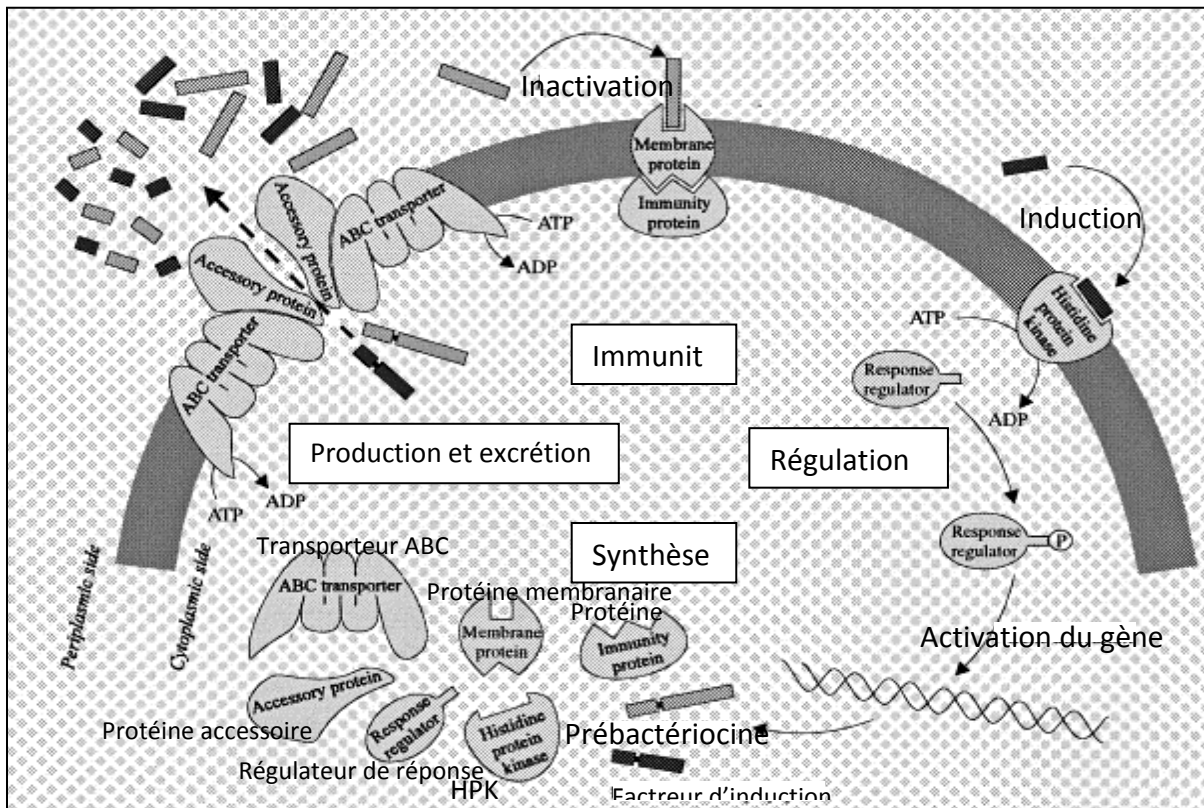
La détection de la localisation des gènes des bactériocines de la classe II peut être chromosomique, comme dans le cas de la carnobactériocine BM1 (Quadri et al., 1994) ou

encore plasmidique comme pour la carnobactériocine Cbn B2 et la mésentéricine Y105 (**Héchar**d *et al.*, 1992).

Les bactériocines sont codées par des gènes spécifiques et sont produites par synthèse protéique sous forme de pré-peptide, contenant uniquement les 20 acides aminés impliqués dans le code génétique (**Schnell et al.**, 1988 ; **Sahl et al.**, 1995). Afin d'obtenir la forme mature, biologiquement active, un certain nombre de modifications post-traductionnelles doivent avoir lieu : modification spécifique d'acides aminés, formation d'intrapeptide thioéther et/ou aminoéther, enlèvement du peptide leader du côté N-terminal et transport du peptide à la matrice extracellulaire. En plus de ces fonctions, et afin de produire des bactériocines, d'autres étapes contrôlées sont nécessaires, comme la régulation de sa biosynthèse et la génération de mécanismes d'immunité, afin d'assurer la protection de la cellule productrice de l'action de sa propre bactériocine (**Figure I.9**).

A la lumière de ces observations, ce n'est pas surprenant qu'après la découverte des premiers gènes spécifiques contenant des gènes de structure de bactériocine (**Schnell et al.**, 1988 ; **Buchman et al.**, 1988 ; **Kaletta et Entian**, 1989), des analyses ultérieures de l'ADN ont révélé la présence d'un nombre d'autres ORFs, qui semblent être impliqués dans la biosynthèse, la régulation génétique et l'immunité nécessaire durant la production de la bactériocine. Les gènes impliqués dans la biosynthèse de bactériocines sont donc typiquement organisés en opérons contenant le gène de structure de bactériocine et des gènes dont les produits font partie de la maturation des bactériocines, la sécrétion, l'immunité et, dans quelques cas, la régulation de l'expression de l'opéron (**Jack et al.**, 1995 ; **Ehrmann et al.**, 2000 ; **Vaughan et al.**, 2004). Ces gènes interviennent dans un rétrocontrôle positif qui est incité suite à la présence du lantibiotique (nisine ou subtiline).

Toutes les bactériocines sont synthétisées par voie ribosomale dans le cytoplasme de la cellule productrice, synthétisées d'une façon constante sous forme de molécule très peu active. Le peptide « leader », présent, permet la sécrétion de la bactériocine dans le milieu extérieur (**Jasniewski**, 2008).



**Figure I.9** Vue d'ensemble des machineries suggérées pour la production de bactériocines classe IIa : système de régulation, synthèse, traitement, excrétion et immunité (Ennahar *et al.*, 2000).

## 6. Mécanisme d'action des bactériocines

En raison de sa découverte antécédente, le mode d'action de la nisine est sans doute le plus étudié et connu. Bien que les bactériocines des bactéries lactiques puissent travailler via différents mécanismes pour exercer un effet antibactérien, l'enveloppe cellulaire est généralement la cible (Deegan *et al.*, 2006).

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

**1<sup>ère</sup> étape :** Consiste en l'adsorption de la bactériocine sur les récepteurs spécifiques ou non spécifiques de la membrane des cellules cibles.

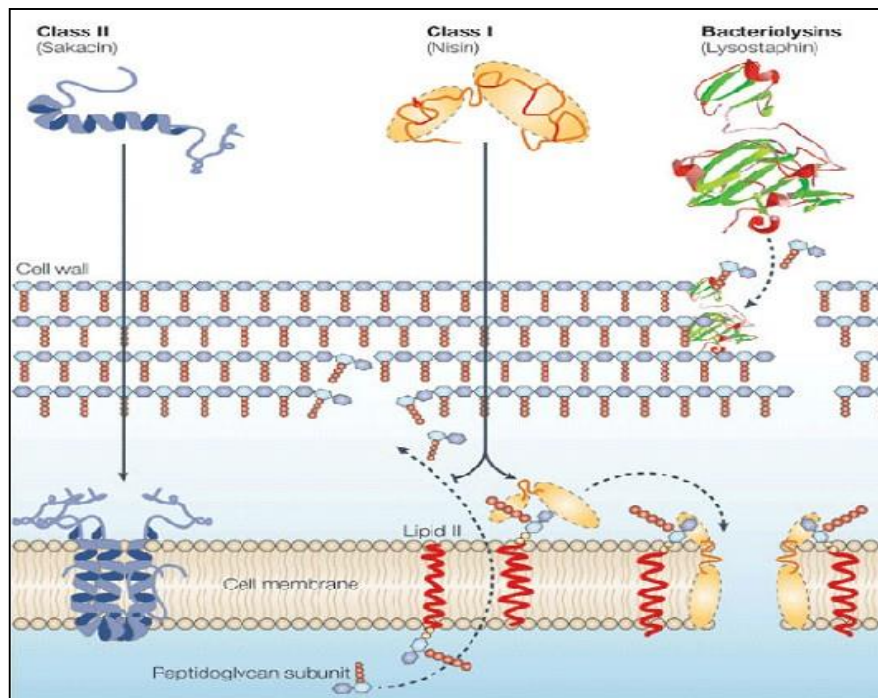
**2<sup>ème</sup> étape :** Phase irréversible impliquant la modification pathologique de la cellule cible.

Chung *et al.* (2000) ont confirmé que l'action des bactériocines se manifeste par la formation des pores au sein de la membrane plasmique des cellules cibles, et par conséquent la perte des constituants cellulaires (ATP, K<sup>+</sup>) qui ont un rôle dans le maintien de l'équilibre des réserves énergétiques et du pH intracellulaire. Cette perte de l'intégrité induit la baisse de la synthèse macromoléculaire (ADN, ARN, protéines) (Figure I.10).

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

- Effet bactériostatique : Ralentissement ou arrêt de la croissance.

- Effet bactéricide : Perte de la viabilité et lyse cellulaire telles que la nisine.
- Effet bactéricide sans aucune lyse cellulaire.



**Figure I.10** : Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques (Cotter et al., 2005).

## 7. La résistance aux bactériocines

L'étude des souches résistantes permet de mieux appréhender et anticiper le mécanisme d'action de ces peptides. C'est pour cette raison qu'elles ont été particulièrement étudiées par un nombre importants d'auteurs.

De plus, il a été constaté l'apparition de résistance chez des souches initialement sensibles lorsqu'elles sont cultivées au contact de ces peptides. L'importance capitale que revêt l'acquisition de cette résistance, comme dans le cas pour des antibiotiques, a conduit à étudier les causes de ces résistances dites induites ou acquises (Jasniewski, 2008).

Le terme de résistance est délicat à définir. De nombreux paramètres y sont inclus, ne dépendant ni de la bactériocine, ni de la souche cible, tels que la nature du milieu de culture (liquide ou solide), sa composition (Blom *et al.*, 1997; Galvin *et al.*, 1999), la température ainsi que l'état physiologique de la souche.

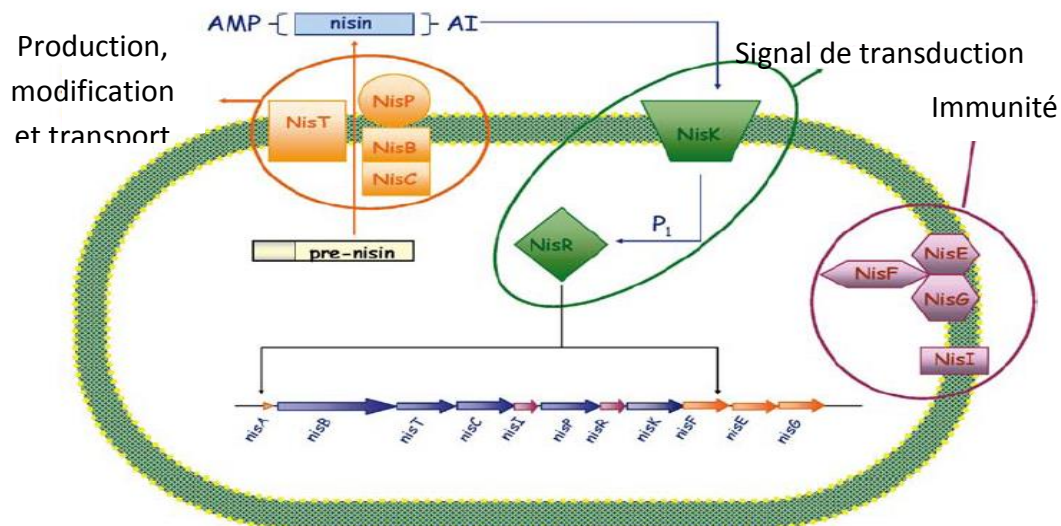
Ainsi, les auteurs précisent la résistance en définissant un seuil de sensibilité à partir duquel la souche est considérée comme résistante ou sensible. Afin de comparer la sensibilité des différentes souches vis-à-vis d'une même bactériocine, le recours à la connaissance de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est la technique la plus

employée (Jasniewski, 2008).

### 8. Régulation de l'expression des gènes codant les bactériocines

Le mécanisme de régulation de la production des bactériocines chez les bactéries Gram-positif est un système d'autorégulation basé sur le *Quorum Sensing*, il se fait généralement par l'intervention de plusieurs gènes (**Figure I.11**).

Ces gènes impliqués dans la régulation peuvent être de nature chromosomique, localisés sur un plasmide ou comme dans le cas de la nisine, sur un transposon (**Jack et al., 1995**). A titre d'exemple, la production de la nisine requiert onze gènes répartis sur un transposon, ayant un grand nombre de copie dans le génome de *L. lactis* (**Dodd et al., 1990**). Le propeptide étant codé par le gène *nisA*, alors que les produits des gènes *nisB* et *nisC* sont également nécessaires aux modifications post-traductionnelles. Par ailleurs, une protéase clivant le peptide signal est codée par le gène *nisP*, la sécrétion a pour intermédiaire le produit du gène *nisT* et l'immunité de la souche productrice à l'action de la nisine résulte des gènes *nisI* et *nisFEG*. Finalement, la régulation de l'expression est sous le contrôle des gènes *nisR* et *nisK* (**Riley et Wertz, 2002**).



**Figure I.11** : Mécanisme de régulation “quorum-sensing” des bactériocines de la classe I des bactéries lactiques (**Gobbetti et al., 2007**). *NisABTCIPRKFEG*, cluster de gènes codant la nisine ; NisB et NisC, protéines impliquées dans les réactions de modification intracellulaires post-traductionnelles ; NisT, protéine du transporteur ABC ; NisP, protéase extracellulaire pour enlever le peptide du leader ; AI, autoinducteur ; NisK, capteur de signal transmembranaire associé ; NisR, régulateur de réponse ; NisF, NisE et NisG, système de

transport ABC qui produit l'immunité par extrusion par la cellule active ; et NisI, la lipoprotéine qui contribue à l'immunité du producteur.

## 9. Conditions et Facteurs de production des bactériocines

La production des bactériocines est essentiellement influencée par les conditions de culture, notamment la composition des milieux de croissance, le pH, la température, le temps d'incubation (**Messens *et al.*, 2003 ; Zamfir *et al.*, 2000 ; Callewaert et De Vuyst, 2000 ; Aymerich *et al.*, 2000 ; Leal-Sánchez *et al.*, 2002**), la taille de l'inoculum, la densité cellulaire ainsi que d'autres facteurs environnementaux (**Eijsink *et al.*, 2002 ; Strompfová et Lauková, 2007**).

**Callewaert et De Vuyst., 2000** ont montré que la production de la nisine est limitée par la source de carbone dans le milieu ainsi que par la biomasse. Tout comme la nisine, la production de la pédiocine est influencé par la source de carbone dans le milieu (**Yang et Ray, 1994**).

Toutefois, le pH est un facteur limitant pour la production des bactériocines, l'optimum en production et en activité est obtenu à des pH acides. Ainsi, l'activité de la nisine Z à pH 5 est deux fois supérieure à celle obtenue, dans les mêmes conditions de fermentation à pH 6 (**Amiali *et al.*, 1998 ; Matsusaki *et al.*, 1996**). De même pour la pédiocine, il a été démontré par **Biswas *et al.* (1991)** ont démontré qu'une fermentation à pH non contrôlé favorise mieux la production. Cependant, une incubation pendant 6 heures à une température de 30°C ou 16 à 22 heures à 37°C assure une meilleure production de la nisine Z et de la pédiocine, respectivement (**Ray et Hoover, 1993 ; Matsusaki *et al.*, 1996**). La production est limitée aussi par le temps d'incubation, du fait qu'elle est favorisée en phase exponentielle (**De Vuyst et Vandamme, 1994**). L'optimisation des conditions de production favorise fortement l'obtention d'un rendement important en bactériocines actives, et ce en agissant sur les différents facteurs influençant cette production :

- **Température et pH**

La température et le pH sont deux facteurs importants, à prendre en considération quant à la production de bactériocine. Celle-ci est généralement optimale à des températures et des pH inférieurs à ceux optimaux pour la croissance (**Héquet *et al.*, 2007 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Sharma *et al.*, 2010**).

L'effet de ces deux paramètres a fait l'objet de plusieurs études. Ainsi, la production de bactériocine par *Leuconostoc lactis* était optimale à 30°C et à pH variant de 6.5 – 7 ; néanmoins, elle est diminuée d'une façon considérable à 37°C et à pH 5.5 et 8.0 (**Dhakur et Roy, 2009**). La

production de pédiocine LB-B1 par *Lactobacillus plantarum* LB-B1 était optimale à 37°C et à un pH égal à 6 (Xie et al. 2011).

Quant à *Enterococcus faecium* PC4.1 atteint son maximum de production à une température de 30°C et à un pH de 6 (Hadjji- Sfaxi et al. 2011). La production de l'acidocine 8912 par *Lactobacillus acidophilus* était maximisée à 30°C (Ahmed et al. 2010).

- **Composition du milieu de culture**

La composition du milieu de culture, et d'une façon particulière la source et la teneur de carbone et d'azote influence considérablement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques requièrent plusieurs composants nutritionnelles tels que : les facteurs de croissance, les peptones, l'extrait de levure, les hydrolysats de protéines et l'extrait de viande. Ces composants ont un impact positif sur le rendement en bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

De nombreux milieux de culture complexes ont été utilisés, afin d'isoler des bactéries lactiques bactériocinogènes , entre autre le MRS (Elmoualdi et al., 2008 ; Khalil et al., 2009 ; Moraes et al., 2010 ; Xie et al., 2011 et Castro et al., 2011), le BHI (Ammor et al., 2006 ; Ghrairi et al., 2008), et le M17 (Hadjji-Sfaxi et al., 2011).

Par ailleurs, il a été recommandé que la production des bactériocines peut être maximisée en fortifiant le milieu de culture, et ce par l'addition de l'extrait de levure (Benkerroum et al., 2000; Labiouiet al., 2005 ; Elmoualdi et al., 2008 ; Sarika et al., 2010).

Todorv et Dicks (2005) ont démontré que le taux de production des bactériocines ST461BZ et ST462BZ produites par *Lactobacillus rhamnosus* a significativement augmenté en ajoutant au milieu le K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et le KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> respectivement.

- **Temps d'incubation**

La synthèse des bactériocines a lieu à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Au delà de cette période une diminution considérable du taux de bactériocines a été observée, ceci est dû suite à la digestion de ces dernières par des enzymes dits protéolytiques, libérées par la cellule productrice. De ce fait, plusieurs études ont été réalisées afin d'optimiser la période d'incubation. Gong et al., (2010) ont démontré que la production de la plantaricine MG par *Lactobacillus plantarum* atteint sa valeur maximale après 28H d'incubation. La production maximale de bacALP7 par *P. pentosaceus* est quant à elle observée après 16H d'incubation et diminue de près de la moitié après 21H (Pinto et al., 2009).

## **10. Purification et caractérisation des bactériocines**

Vu le rendement relativement faible des bactériocines dans les cultures de bactéries lactiques, il est nécessaire d'utiliser de grands volumes de milieu de culture quand à leur purification (Tagg et al., 1976).

Le processus de purification des bactériocines reste toute fois coûteux, vu la complexité de la composition des milieux de culture. Il est à noter qu'au cours de cette production le maintien de la stabilité et de l'activité inhibitrice de la protéine est primordiale (maintien du pH et de la température) (**Tagg et al., 1976**).

Etant des protéines, les méthodes de purification des bactériocines sont donc les mêmes que pour les protéines. Beaucoup de protocoles de purification consistent en une série de chromatographies à différents principes, se basant sur les différentes propriétés des protéines (charge, hydrophobie, taille, etc.). Cependant, d'importantes pertes de l'activité est perdue au fur et à mesure des étapes de purification (**Tagg et al., 1976 ; Hainque et al., 2008**).

La finalité du produit purifié, conduit à l'élaboration et la mise au point du protocole à utilisé, c'est à dire qu'il est en étroite relation avec le degré de pureté désiré. Cependant, s'il est destiné à des essais d'application en conservation alimentaire, le rendement de purification sera privilégié face au degré de pureté (**De Vuyst et Leroy, 2005; De Vuyst et Leroy, 2007**).

En revanche, si l'objectif est tout autre, notamment l'étude structurale de la molécule, le produit final devra présenter un haut degré de pureté, qui consiste dans la plupart des cas un rendement de purification faible. La purification des bactériocines de bactéries lactiques est une tâche particulièrement délicate et difficile (**De Vuyst et Leroy, 2005; De Vuyst et Leroy, 2007**).

Dans la majorité des cas, la purification des bactériocines se déroule en deux étapes. L'une consiste en une pré-purification par précipitation des protéines, par le biais du sulfate d'ammonium, par acidification ou encore par partition différentielle en utilisant des solvants organiques (**Van den Berghe et al., 2006**).

Tandis que lors de la deuxième étape, les protéines précipitées sont solubilisées et purifiées par un enchaînement de techniques plus fines incluant des chromatographies d'exclusion de taille, d'échanges d'ions, d'interactions hydrophobes ainsi que des liquides hautes performances en phase inverse (RP-HPLC) (**Parente et al., 1999**).

Il est par ailleurs recommandé, l'utilisation des chromatographies d'échanges de cations ou d'interactions hydrophobes, qui sont souvent plus efficaces et ce de par la nature cationique et hydrophobe des bactériocines (**De Vuyst et Leroy, 2007**).

Cependant, les techniques de purification utilisées sont nombreuses et variées. Un protocole commun a cependant pu être élaboré, ayant également été utilisé pour la

purification de nombreuses bactériocines (**Tichaczek et al., 1994; Jimenez-Diaz et al., 1995; Benoit et al., 1997; Parada et al., 2007**).

Ce protocole, est composé de quatre étapes : une précipitation au sulfate d'ammonium, une chromatographie échangeuse de cations, une chromatographie d'interactions hydrophobes et une chromatographie en phase inverse utilisant le méthanol ou l'acétonitrile comme solvant d'élution (**Tichaczek et al., 1994; Jimenez-Diaz et al., 1995; Benoit et al., 1997; Parada et al., 2007**).

Une méthode rapide et spécifique de purification partielle de peptides antibactériens, fondée sur les phénomènes d'adsorption/désorption des bactériocines sur les membranes des cellules productrices en réajustant les valeurs du pH, a également été mise au point (**De Vuyst et Leroy, 2007**).

Cette technique a notamment permis l'obtention des préparations concentrées de bactériocines partiellement purifiées contenant peu de protéines contaminantes, et ce malgré des rendements assez faibles. Ces préparations, soumises à une chromatographie liquide haute performance, permettent d'obtenir des bactériocines avec un degré de purification élevé (**De Vuyst et Leroy, 2007**).

Une autre méthode de purification, en deux étapes seulement a été développée pour une bactériocine de la sous-classe IIa produite par *Cr. divergens* (**Metivier et al., 2000**). La première étape consiste en une partition de solvant (Triton X-114) et la deuxième en une chromatographie échangeuse de cations. Toute fois les rendements de cette méthode restent faibles, de l'ordre de 10 mg par litre de culture.

Une méthode de purification en trois étapes a été mise au point, afin de purifier les bactériocines de la sous-classe IIa avec un bien meilleur rendement (environ 60 %) (**Guyonnet et al., 2000**). Dans ce protocole, la première étape de précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium est remplacée par une étape d'autoclavage (12 min, 110°C) ainsi qu'une chromatographie échangeuse de cations.

Toutes ces méthodes permettent d'obtenir des bactériocines actives, certes avec un haut degré de pureté, le seul bémole reste les rendements relativement faibles (**Dortu et Thonart, 2009; Smaoui, 2010**).

Il s'en suit également, une caractérisation de ces bactériocines, qui sont considérés comme étant des biomolécules, la détermination de la structure chimique, et ce par le biais de techniques spectroscopiques tel que la détermination du spectre ultra violet (UV), spectroscopie infrarouge à transformé de fourier (FTIR), une électrophorèse en gel polyacrylamide (SDS-PAGE) afin de connaître le poids moléculaire (**Smaoui, 2010**).

## 11. Application des bactériocines

### 11.1. Dans le secteur alimentaire

L'utilisation des bactériocines dans les produits alimentaires a connu une forte progression. Du fait que ces substances sont naturelles, non toxiques pour les cellules eucaryotes, facilement digestibles dans le tractus intestinal, tolérantes aux traitements thermiques et aux variations du pH et agissant à des faibles concentrations, facilitant ainsi la prolongation de la durée de conservation des produits alimentaires (**Gautam et Sharma, 2009**).

Ces molécules bioactives sont incorporées dans les aliments soit directement sous forme purifiée ou semi-purifiée (nisine) ou sous forme de concentré (pédiocine) Actuellement, seule la nisine est acceptée comme additif (**Ghalfi et al., 2006 ; Dortu et Thonart, 2009**).

**Benkerroum et al., (2000)** ont démontré l'apptitude des bactériocines produites par *Lactococcus lactis* à diminuer le nombre de *Listeria monocytogenes* ajoutée expérimentalement au Jben Marocain. Après contamination du Jben avec  $10^7$  et  $10^4$  UFC.ml<sup>-1</sup>, il a été constaté que la bactériocine est doté d'un pouvoir antibactérien, du fait qu'elle entraîne une réduction du nombre de contaminants de 2.7 log après 30H dans le premier cas et l'a complètement éliminé après 24H dans le deuxième.

### 11.2. Dans le secteur sanitaire

L'usage des bactériocines n'est pas restreint au domaine alimentaire uniquement. Celles-ci servent aussi comme agents de thérapie naturelle alternatifs aux antibiotiques (**Smaoui, 2010**). Suite à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance manifesté par plusieurs bactéries pathogènes (parmi lesquelles certaines sont résistantes à plusieurs antibiotiques à la fois) qui menace la santé publique, les études sont actuellement orientées vers la recherche de nouvelles substances antibiotiques naturelles pouvant pallier à ce problème (**Mkrtchyan et al., 2010**).

Une attention particulière est accordée aux bactériocines de la classe Iia, ce groupe présente des peptides antimicrobiens pouvant être utilisés en médecine avec les antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses ou comme agents antiviraux. Ces molécules sont dotées d'une activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif pathogènes comme *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (**Dridier et al., 2006**).

Une étude récente rapportée par **Xie et al., (2011)** démontre que le Koumiss (produit chinois à base de lait fermenté) est efficace dans le traitement de la tuberculose ainsi que les maladies cardiovasculaires et contribue à l'amélioration de l'immunité, ces propriétés sont

attribuées aux bactériocines produites par les bactéries lactiques indigènes. **Dembélé et al., (1998)** ont démontré quelques années auparavant, que les bactériocines produites par le genre *Lactobacillus* contribuent à la protection du vagin contre différentes bactéries pathogènes telles : *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*.

# *Chapitre II*

---

*MATÉRIEL & MÉTHODES*

# **I. Bactéries Lactiques**

## **1. Prélèvement des échantillons**

Les échantillons de lait cru ont été prélevés à partir de biotopes différents : Lait de chèvre et lait de vache (vaches laitières) provenant de fermes de la région de Mostaganem (Mazagran et Sidi Lakhdar), et de la région d'Oran (Es-Senia) dans des conditions aseptiques amenés le jour même au laboratoire. Un total de 06 échantillons a été collecté.

Le prélèvement de lait a été fait le matin au moment de la traite manuelle. Après lavage à l'eau savonneuse, rinçage à l'eau javellisée et séchage du pis, les 2 premiers jets sont éliminés et le lait est recueilli dans des flacons stériles de 250 ml (100 ml/flacon). L'enrichissement est réalisé en incubant les échantillons à 30°C pendant 24h (**Mami et al., 2014**).

Pour ce qui est bifidobactéries, l'échantillonnage a été effectué à partir des selles fraîches des nourrissons, âgés de moins de 5 mois, prélevé stérilement d'une couche jetable. Les échantillons de selles ont été émis dans des récipients stériles (**Mahmoudi et al., 2014**).

## **2. Milieux et Conditions de cultures**

Afin d'isoler les bactéries lactiques, différents milieux de cultures sélectifs ont été utilisés afin de proliférer les germes désirés (**Annexes**) :

- Le milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe) avec un  $\text{pH}=6.4 \pm 0.2$  ayant été utilisé pour l'isolement des Lactobacilles (**De man et al., 1960**).
- Le milieu M17 avec un  $\text{pH} = 6.9 \pm 0.2$  ayant été utilisé pour l'isolement des Lactocoques (**Terzaghi et Sandine, 1975**).
- Le milieu MRS cystéiné c.à.d. milieu MRS additionné de 0.05% cystéine chloridrique avec un  $\text{pH} = 6.4 \pm 0.2$  ayant été utilisé pour l'isolement des Bifidobactéries (**Scardovi, 1986, Hadadji et al., 2006**).

## **3. Technique d'isolement et purification des bactéries lactiques**

Après coagulation des échantillons de laits, 1 ml de la solution mère a été additionné à 9 ml d'eau physiologique (NaCl à raison de 0.9%), une série de dilutions décimales a été préparé ( $10^{-1}$  à  $10^{-9}$ ) et homogénéisé (**Mami et al., 2014**).

1 ml de chaque dilution est ensuiteensemencé en profondeur des milieux de cultures spécifiques à savoir MRS ou M17. Après solidification des boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant 48h en aérobie (pour les Lactocoques) et anaérobie (pour les Lactobacilles) (**Mami et al., 2014, Nehal et al., 2007**).

Pour ce qui est de l'isolement des bifidobactéries, 1g d'échantillon de selle a été suspendu dans 9 ml d'eau physiologique (NaCl à raison de 0.9%) et 0.2% de cystéine-HCl, une série de dilutions décimales a été préparé ( $10^{-1}$  à  $10^{-9}$ ) et homogénéisé (**Mahmoudi et al., 2014**).

1 ml de chaque dilution est ensemencé en masse du milieu MRSc puis incubées dans une jarre d'anaérobiose avec une bougie à une température de 37°C pendant 72h (**Beerns, 1990 ; Frank et al., 1993**).

#### **4. Conservation des souches**

##### **a. Conservation à court terme**

Les isolats purifiés ont été ensemencé sur gélose inclinée (MRS, M17 et MRSc), incubé pendant 18 h à 30°C (Lactocoques) et 37°C (Lactobacilles et Bifidobactéries) et conservé à 4°. Le renouvellement des cultures se fait toutes les quatre semaines (**Saidi et al., 2002**).

##### **b. Conservation à long terme**

A partir des cultures jeunes de 18h, préalablement purifiées sur milieu liquide, une centrifugation à 4000 tours/min pendant 10 min a été réalisée. Une fois le surnageant éliminé et les cellules récupérées, le milieu de culture de conservation est additionné au culot. Le milieu de conservation contient 2 ml de lait écrémé, 0.2% d'extrait de levure et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dans des micro tubes à -20°C (**Saidi et al., 2002**).

#### **5. Testes d'orientation de l'identification des bactéries lactiques**

L'orientation de l'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques, phénotypique et biochimiques (**Lamouliatte et al., 1992**).

##### **5.1. Caractérisation phénotypique des isolats**

Après croissance, et à partir des boites de dénombrement, 10 colonies typiques de chaque boite présentant l'aspect macroscopique des bactéries lactiques (forme, taille, pigmentation, viscosité) ont été prélevées. Afin de purifier les isolats, chaque colonie est ensemencée dans les bouillons appropriés puis étalée sur les milieux correspondants (MRS, M17 ou MRSc) par la méthode des quadrants et incubé pendant 48h à 30°C (Lactocoques) et 37°C (Lactobacilles et Bifidobactéries).

Les isolats suspectés ont été soumis au test de la catalase, oxydase, suivi d'une observation microscopique à l'état frais et une coloration différentielle de Gram (**Balows et al., 1992, Curk et al., 1996 et Heleni et al., 2006**).

## 5.2. Identification biochimique des souches

L'identification biochimique des isolats lactiques a été réalisée selon des tests clés ayant été effectués et cités par **Guiraud (1998)**. La majorité de ces tests ont été élaborés en milieux liquides, ceci consiste en la présence d'un trouble, reflétant ainsi une croissance bactérienne.

- **Détermination du Type fermentaire**

Afin de déterminer le type fermentaire, les isolats sont repiqués sur MRS, M17 et MRSc liquides contenant une cloche de Durham, nous permettant ainsi de détecter la production de gaz ou pas. L'incubation s'effectue à 30°C (Lactocoques) et 37°C (Lactobacilles et Bifides) pendant 24 heures (**Carr et al., 2002**).

- **Test de croissance à 15°C et à 45°C et thermorésistance**

La capacité des souches à croître à 15°C et à 45°C a été évaluée en ensemençant deux tubes de MRS, M17 et MRSc à partir de chaque culture purifiée. Le tube à 45°C est examiné au bout d'un délai de 24 à 48 heures et celui à 10°C après 7 jours (**Carr et al., 2002**). Pour ce qui est de la thermorésistance, à partir des pré-cultures de chaque isolat, un ensemencement a été effectué sur MRS, M17 et MRSc. Ces tubes sont chauffés dans un bain-marie à 60°C pendant 30 minutes. Ils sont ensuite refroidis sous un jet d'eau froide, puis incubés à 30°C et 37°C pendant 24 heures (**Carr et al., 2002**).

- **Croissance en présence de diverses concentrations de NaCl**

La croissance est testée en ensemençant chaque isolat dans trois tubes de MRS, M17 et MRSc à des concentrations de 4% et 6,5% (P/V) de NaCl. Les tubes sont incubés à 30 et 37°C pendant 24 heures (**Carr et al., 2002**).

- **Fermentation des sucres**

L'identification des espèces de bactéries lactiques est basée essentiellement sur la fermentation des sucres. Un total de 14 sucres a été utilisé pour l'ensemble des isolats, afin d'établir leur profil fermentaire, et qui sont les suivants : Galactose, Mannose, Raffinose, Lactose, Fructose, Rhamnose, Arabinose, Glucose, Xylose, Ribose, Trehalose, Melibiose, Melezitose et Cellobiose.

Pour ce test, des microplaques ont été utilisées. Les isolats sont cultivés sur les différents milieux et incubés aux températures comme cité précédemment, pendant 24h.

Les cultures sont par la suite centrifugés (5000rpm / 5 min) et lavés deux fois en utilisant de l'eau peptonné saline. Seulement le culot est retenu et resuspendu dans 1ml d'eau peptonné saline (**Guessas et al., 2012**).

Chaque microplaque reçoit 10 µl à partir de suspensions cellulaires bactériennes obtenues à 0.1 ml de milieu MRS, M17 et MRSc contenant l'indicateur coloré: le pourpre de bromocrésol (BCP) additionnée des solutions sucrées précédemment cités, à raison de 2%.

Une fois les cultures prêtes, elles sont recouvertes d'une couche d'huile de paraffine stérile afin d'assurer l'anaérobiose. Les cultures sont incubées à 30 et 37°C de 24h à 48h. La révélation se fait par virage de couleur du violet au jaune de l'indicateur coloré (BCP) (**Guessas et al., 2012**).

- **Croissance sur pH 9,6**

Les isolats sont mises en culture sur bouillons MRS, M17 et MRSc ajusté à pH 9.6, puis incubées à 30 et 37°C pendant 24h (**Mathara et al., 2004**).

## **II. Infections Urinaires**

### **1. Prélèvement des échantillons**

Le recueil des échantillons d'urines a été réalisé au niveau de deux services différents ainsi qu'un laboratoire d'analyses biologiques dans divers hôpitaux à savoir : Le service de Néphrologie de l'E.H.U. d'Oran (1<sup>er</sup> novembre 1954), le service d'Urologie du C.H.U de Sidi Bel Abbes (Abdelkader Hassani) et le Laboratoire d'analyses biologiques de l'hôpital de Mostaganem (Che Guevara). Les échantillons proviennent de patients en consultation externe (Communautaires). Au total 100 patients ont fait l'objet de notre étude, de tout âge confondu et des deux sexes (**Al-Jeboury, 2010**).

Le prélèvement des urines est effectué sur les premières urines matinales dans des tubes stériles, remis au patient au moment du recueil (**Toutou Sissoko, 2006**). Les échantillons recueillis sont par la suite acheminées dans une glacière vers le laboratoire pour analyse. Une fiche de renseignement accompagne chaque prélèvement, comportant le sexe, l'âge et la nature de la pathologie (**Annexe**).

### **2. Analyse des urines**

Chaque échantillon d'urine a fait l'objet d'un ECBU (étude cyto bactériologiques des urines) dont le résultat dépendra de la qualité du prélèvement. Il doit être pratiqué avant le passage à l'antibiothérapie (**Masrar et al., 2000**).

- **Un examen direct (macroscopique) :** Cet examen permet d'observer la couleur et l'aspect de l'urine ainsi que son pH. Aussi une goutte d'urine non centrifugée après homogénéisation sera observée à l'état frais sous microscope (**Moukrad et al., 2012**).

- **Dénombrement de germe (Bactériurie):** Celui-ci est réalisée en déposant simultanément 0,5 mL d'urine qu'on étale à l'aide d'un râteau à la surface d'un milieu gélosé non sélectif (gélose nutritif). Le dénombrement se fait après incubation à 37° pendant 24 à 48h (**Botto, 2003**). Une croissance importante est considérée si le nombre de colonies est  $>10^5$  unité formant colonies (ufc) / ml (**Moue et al., 2015**).
- **Bandelettes urinaires:** L'utilisation des bandelettes urinaires permet d'étudier quelques facteurs tels que la glycémie, la leucocyturie et le pH (**Annexe**).

### 3. Milieux et conditions de culture

Les entérobactéries sont des bactéries non exigeantes. Pour cela les souches pathogènes ont donc été isolées et cultivées sur différents milieux, à savoir le milieu Mac Conkey, EMB (Eosine bleu de méthylène), Chapman et Sabouraud-chloramphénicol (**Annexe**) à 37°C pendant 18 à 24 h en aérobiose (**Benyagoub et al., 2013**).

Le milieu Muller Hinton (MH) est utilisé pour l'antibiogramme (**Benyagoub et al., 2013**).

### 4. Isolement des Uropathogènes

Après ensemencement des échantillons d'urines sur les milieux cités précédemment, une croissance est observée après une incubation à 37°C / 24h. Des purifications successives sont effectuées par la suite, et ce afin d'obtenir des colonies bien isolées et distinctes (**Al-Jeboury, 2010**).

### 5. Orientation de l'identification des Uropathogènes

Après obtention de cultures pures, il s'en suit une pré-identification des isolats. Une caractérisation morphologique (forme, taille, couleur et aspect), microscopique (Coloration de Gram. Les isolats sélectionnés ont été soumis au test de la catalase et oxydase (**Meziani, 2012**),

#### a. Testes biochimiques

Après la pré-identification des isolats, une série de test biochimiques a été effectués : (**Meziani, 2012**).

- **Mannitol-mobilité**

Le milieu utilisé est le Mannitol-mobilité, nous permettant d'étudier deux paramètres à la fois, à savoir la dégradation du sucre et la mobilité. L'ensemencement du milieu se fait par piqûre centrale avec la souche à tester. Incubation à 37 C° durant 18 heures.

- **Utilisation du citrate**

Le citrate comme seule source de carbone. La pente du milieu de culture est ensemencée en strie. Incubation à 37°C, pendant 18 heures.

- **Test de l'indole**

Dans ce test, l'eau peptonnée exempte d'indole est utilisée ensemencée préalablement avec les isolats à étudier suivie d'une incubation à 37°C pendant une durée de 18 heures. La lecture se fait avec l'addition du réactif Kovacs.

## **6. Conservation des isolats**

Les isolats purifiés ont été ensemencés sur gélose inclinée (gélose nutritive), incubé pendant 18 h à 37°C et conservé à 4°. Le renouvellement des cultures se fait périodiquement.

## **7. Antibiogramme**

L'étude de la résistance ou sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la technique de diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques sur milieu Mueller-Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Une panoplie d'antibiotiques a été testée : Céfoxitine, Ampicilline, Gentamycine, Augmentin (Amoxicilline + Acide Clavulanique), Cotrimoxazole, Acide Nalidixique, Ciprofloxacine, Kanamycine, Céfotaxime, Amoxicilline (**Toutou Sissoko, 2006**).

- **Mode opératoire**

L'inoculum est préparé à partir d'une souche bactérienne de 18 heures. Puis ajusté à 0,5 Mac Farland (0.08 - 0.1 à 625nm). L'ensemencement s'est fait par inondation de la surface entière de la gélose Muller Hinton avec quelques gouttes de la suspension bactérienne répartie sur toute la boîte. Par la suite les boîtes de Pétri sont laissées à température ambiante pour séchage. Après cette étape de séchage, les disques d'antibiotiques sont déposés sur la gélose à l'aide d'une pince flambée, en appuyant doucement afin d'assurer un contact uniforme avec le milieu. Les boîtes sont ensuite laissées à la température ambiante pendant 30 minutes permettant la diffusion de l'antibiotique dans la gélose. L'incubation s'est faite à 37°C pendant 18 à 24 heures.

La lecture se fait par la mesure des diamètres d'inhibition autour des disques puis comparés aux diamètres critiques conformément aux normes CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie). Le résultat est interprété sensible, intermédiaire ou résistant (**Meziani, 2012**).

## **8. Galerie API 20E**

C'est une galerie d'identification qui permet la recherche de 20 caractères biochimiques (microcupules) par des réactions enzymatiques. Ces microcupules contiennent

des substrats sous forme déshydratés qui sont par la suite inoculées par la suspension bactérienne afin de reconstituer les milieux. La galerie est mise à l'étuve à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, des réactions sont produites se traduisant par des virages colorés spontanés ou révélés par addition de réactifs. La révélation des résultats se fait via l'API web (catalogue d'identification des entérobactéries) (Toutou Sissoko, 2006).

### III. Bactériocines

#### 1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et sélection des isolats

La recherche d'une éventuelle production de substances inhibitrices secrétées par les bactéries isolées est réalisée selon l'effet antagoniste de ces isolats lactiques afin de mettre en évidence cette activité antibactérienne par la méthode des puits. Le milieu MH (Mueller Hinton) avec un pH = 7.1 a été utilisé pour les interactions entre les isolats lactiques et les uropathogènes (Mami *et al.*, 2014).

- **Méthode de Tagg et Mc Given (1971) - Méthode des puits AWDA -**

Cette méthode permet de tester l'effet inhibiteur de la culture lactique par contact direct vis-à-vis des uropathogènes.

Les cultures inhibitrices sont cultivées en milieu MRS, M17 ou MRSc liquides, tandis que la souche indicatrice est cultivée dans le bouillon nutritif, puis incubées pendant 18h à 37°C.

Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce sur la surface du milieu Muller Hinton inoculé préalablement par écouvillonnage avec la culture indicatrice (pathogènes) et remplis avec 100 µl de culture lactique. Les boîtes prêtes sont par la suite incubées à une température de +4 C° pendant 4h afin de permettre une bonne diffusion de la substance (Doumandji *et al.*, 2010).

Ensuite, Les cultures sont portées à incubation à 37 C° pendant 24h, un résultat positif se traduit par la présence de zones d'inhibition formées autour des puits (Hwanhlem *et al.*, 2011).

#### 2. Screening des isolats bactériocinogènes

Afin de rechercher et détecter l'agent inhibiteur responsable, les cultures lactiques ayant précédemment montré d'importantes zones d'inhibitions ont été retenues pour un éventuel screening, de façon à réunir les conditions excluant toute inhibition éventuelle qui pourrait être due à l'acidité, à la production de peroxyde d'hydrogène, la présence de phages ou de bactériocines (Jack *et al.*, 1995; Lash *et al.*, 2005).

La méthode utilisée dans ce cas, était l'antagonisme différé (**Sabia et al., 2014**). Après la préparation de la préculture lactique, cette dernière est centrifugée à 6000 rpm / 20 min afin d'obtenir le surnageant qui est par la suite filtré à l'aide de filtre millipore d'un diamètre de 0.45 µm. Des puits sont creusés à la surface de la gélose Muller Hinton, puis remplis de 100 µl de surnageant, Les boîtes sont par la suite incubées à une température de +4 C° pendant 4h afin de permettre une bonne diffusion de la substance.

Les uropathogènes sont quant à eux inoculés en milieu Muller Hinton semi solide (Après ajustement de la densité optique), la couche est versée sur la surface des puits remplis après diffusion à 4°C. Après solidification, les boîtes sont portées à incubation à 37°C / 18 h. Un résultat positif se traduit par la formation de zones d'inhibition autour des puits (**Sabia et al., 2014**). Cette technique est utilisée pour la suite du screening des agents inhibiteurs

#### **Inhibition due à la production d'acides organiques**

L'étude de l'effet de la diminution du pH surnageant sur l'inhibition des Uropathogènes indicateurs est réalisée en milieux MRS, M17, MRSc tamponné à pH 7 (Annexe). Après incubation la lecture des résultats se fait par comparaison au milieu témoin non tamponné (**Castro et al., 2011**).

#### **Inhibition due au peroxyde d'hydrogène**

La production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est entraînée par la croissance de certaines cultures lactiques. Cette substance est considérée comme un inhibiteur de la croissance bactérienne (**Cogan et al, 1981 et Julliard et al, 1987**). Il peut être dégradé par une enzyme « la catalase » présente chez certaines bactéries.

Afin de détecter la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, des cultures de surnageants sont préparées en présence de catalase à raison de 1 mg/ml de milieu. Après incubation la lecture des résultats se fait par comparaison au témoin ne contenant pas de catalase (**Herrerros et al., 2005**).

#### **Inhibition due à une substance protéique**

Le pouvoir des enzymes protéolytiques sur l'activité inhibitrice des isolats sélectionnés a été réalisé en utilisant différents enzymes, à savoir pepsine, trypsine et α-chymotrypsine à raison de 1 mg / ml (p/v), mélangés dans des solutions tampons (**Annexe**) (**Yanagida et al., 2005**). Une fois les solutions d'enzymes prêtes, elles ont été portées à incubation à 30°C pendant 2 heures, plus un chauffage de 5 minutes au bain-marie afin d'inactiver ces enzymes **Bizani et Brandelli, (2002)**.

Une quantité (v/v) de solution enzymatique et surnageant sont mélangés, et testés vis-à-vis des uropathogènes par la méthode d'antagonisme différé. Le résultat se traduit par la présence ou non de zones d'inhibition (Yanagida *et al.*, 2005).

### 3. Galerie API 20 Strep

Les isolats lactiques ayant été sélectionnés à la suite du screening, ont été identifiés et en établissant leurs profils fermentaires à l'aide du kit Api 20 Strep (Biomérieux, France). Ce dernier est un système standardisé regroupant 20 tests biochimiques, permettant de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques et entérocoques.

La galerie Api 20 Strep, comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, qui nécessitent d'être inoculés avec une suspension bactérienne.

Les réactions produites lors de l'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Biomérieux, France).

### 4. Mesure du pH et dosage de l'acidité Dornic

La mesure du pH ainsi que l'évaluation de l'acide lactique produit par les isolats retenus sont réalisés respectivement par pH métrie et titrimétrie. Cette dernière a pour but de déterminer (comme son nom l'indique) par titrage la concentration molaire en ions  $H_3O^+$  dans un échantillon de lait. La concentration est exprimée en «Degrés dornic (°D)». La mesure du pH est effectuée en parallèle (Bourgeois *et al.*, 1996).

1 ml de lait est prélevé à l'aide d'une pipette est transféré dans une fiole conique de 100 ml. 5 gouttes de solution de phénophtaléine y sont ajoutées et titrés jusqu'à apparition d'une couleur rose persistante. Le volume de la solution utilisée est par la suite noté (Figure II.1) (Bourgeois *et al.*, 1996).

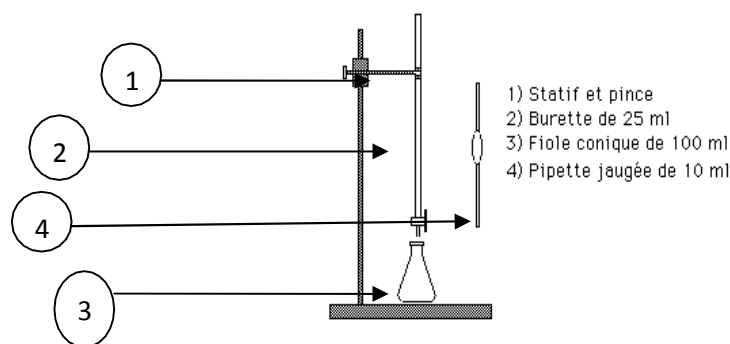


Figure II.1: Montage pour la mesure de l'acidité dornic (titrage) (Mami *et al.*, 2014)

Les résultats sont exprimés selon la relation:

$$\text{Acidité} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

$V_{\text{NaOH}}$ : volume de la soude coulé pour neutraliser l'acidité.

$1^{\circ}\text{D} = 0,1\text{g/l}$  d'acide lactique (**Bourgeois *et al.*, 1996**).

## 5. Cinétique de croissance et production de bactériocines

L'élaboration de la cinétique des isolats lactiques, nous permet de tracer la courbe de croissance, et par conséquent nous renseigner sur le moment de sécrétion de bactériocines (**Kouakou et Thonart, 2011**).

Un volume de 5% (v/v) A partir d'une préculture lactique réalisée sur milieux MRS, M17 et MRSc à 30, 37°C pendant 18h, un volume de 5% a été prélevé puis cultivé dans 100 ml de milieu précédemment cités (à partir d'une  $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 0,1$ )

Le suivi de la croissance et production de bactériocines par la culture lactique productrice est réalisé par la mesure de la Do, et ce par prélèvements réguliers chaque deux heures (**Karmen et Bogovič, 2003**).

## 6. Estimation de la quantité de bactériocine produite

L'estimation de la quantité de bactériocine produite, a été réalisée selon la méthode décrite par **Pucci *et al.*, 1988** qui est basée sur le principe des dilutions critiques « Critical Dilution Assay » selon **Yanagida *et al.* (2005)**.

La quantification est déterminée en nombre d'unités arbitraires du surnageant, pour cela nous avons réalisé une cascade de dilutions au 1 : 2 dont le volume final est 100  $\mu\text{l}$ .

L'activité est définie comme étant le réciproque de la plus grande dilution montrant une zone d'inhibition de la souche indicatrice (pathogène), en utilisant encore une fois la méthode de l'antagonisme différé. Après diffusion et incubation, la quantité produite de bactériocine est exprimée en unités arbitraires par millilitre (UA/ml) selon l'équation :

$\text{AU/ml} = (1000/d) \times D$  (**Castro *et al.*, 2011**) où **d** est le volume mis dans les puits, **D** étant le facteur de dilution.

## 7. Optimisation des conditions de production de bactériocines

**Leroy et DeVuyst (2003)**, **Todorov (2008)** et bien d'autres auteurs, ont contribué à l'étude de l'effet de chaque constituant du milieu MRS sur la production éventuelle de bactériocines, démontrant ainsi les importantes différences engendrées, que ce soit par rapport aux ingrédients que par leurs concentrations.

La biosynthèse et l'activité de ces peptides antibactériens, dépendent essentiellement de la maîtrise des facteurs y contribuant, parmi eux : la composition du milieu de culture, la température d'incubation, le pH du milieu...

C'est à partir de là que notre étude s'est basée, afin de déterminer l'optimum de ces quelques paramètres intervenant dans la production des bactériocines produits par nos isolats lactiques.

### **7.1. Effet de la composition du milieu de culture**

Notre intérêt s'est porté sur l'étude des sources d'azote, carbone et potassium, et ce suite aux travaux de **Todorov et Dicks, 2004; Todorov, 2008**. L'évaluation de l'effet est réalisée selon la méthode d'antagonisme différé pour chaque surnageant de nos isolats, le résultat est par conséquent déterminé par la mesure de la zone d'inhibition (**Sabia, 2014**).

- **Effet de la source d'azote**

Les combinaisons possibles entre la modification de la source d'azote et la production de bactériocine ont été évaluées selon la méthode conçue par **Ogunbanwo et al., (2003b)** avec de légers changements.

La préculture de l'isolat bactériocinogène estensemencée dans le milieu de culture dont la source d'azote est : l'extrait de levure, l'extrait de viande et la tryptone.

Les milieux utilisés ont été comme suite :

1. M17 (Lactocoques) remplacé par le MRS (**Penna et al., 2004**).
2. contient 2% (p/v) extrait de viande.
3. contient 2% (p/v) tryptone
4. L'addition de 2,5% d'extrait de levure.

- **Effet de la source de carbone**

La source d'azote, ayant permis l'obtention d'un meilleur effet inhibiteur par rapport au milieu non modifié, a été fixée et maintenue pour la suite. Le milieu MRS a également été retenu pour la culture des Lactocoques qui a montré un meilleur effet.

100 ml de milieu MRS modifié, sontensemencés avec 5% de préculture préalablement préparé puis centrifugé à 6000 rpm / 20 min. Dans ce cas le glucose du MRS modifié est remplacé par les sucres suivants à raison de 2% chacun: maltose, lactose, saccharose (**Todorov et al., 2007**).

- **Effet de la source de potassium**

Le  $K_2HPO_4$ , un sel dont l'effet est important pour la croissance des bactéries lactiques, figurant parmi les constituants du milieu MRS à raison de 0.2% c'est à dire 2 g/l.

Selon **Mollendorff et al., 2009**, plusieurs combinaisons sont possibles afin d'étudier

son effet, mais également celui du  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sur la production de bactériocines.

Nous avons pour cela, procéder comme suite :

- 0,2% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  sont remplacés par 1% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ +1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Jusqu'ici, un milieu de culture approprié pour l'obtention d'une bonne production de bactériocine, optimale aux isolats sélectionnés, est constitué.

- **Effet de la température d'incubation**

La production de bactériocine est également influencée par la température d'incubation (**Krier *et al.*, 1998**). Le milieu optimisé ayant été constitué est utilisé pour l'étude de ce paramètre.

100 ml du milieu MRS optimisé, sontensemencés avec 5% de préculture préalablement préparé, puis centrifugés à 6000 rpm / 20 min, ensuite incubés à 25°C, 30°C, 37°C et 40°C (**Todorov *et al.*, 2007**).

- **Effet du pH sur la diffusion de la bactériocine**

Un autre paramètre tout autant important pour la production de bactériocines, il s'agit du pH du milieu de culture, surtout lors de la période de diffusion de l'agent inhibiteur à 4°C (**Blom *et al.*, 1997**).

Comme pour la diffusion des substances antibiotiques, qui semblerai bien meilleur à pH neutre (pH = 7), nous avons tenté d'utiliser le milieu Muller Hinton tamponnée à pH = 7 (**Benmouna *et al.*, 2008**).

L'effet inhibiteur a été testé comme pour le reste des paramètres étudiés précédemment, c'est-à-dire par antagonisme différé du surnageant des isolats lactiques (**Sabia *et al.*, 2014**).

## **8. Propriétés physico-chimique des bactériocines**

L'étude de certaines propriétés physico-chimiques des bactériocines, nous renseigne sur leurs classifications. Il s'agit spécialement de la thermorésistance, en effet, les bactériocines de classe III sont thermosensibles, alors que les thermorésistantes sont de la classe I ou II (**Dortu et Thonart, 2009**).

Les surnageants des cultures des isolats bactériocinogènes ont subi divers traitements, afin de permettre l'étude de l'effet des différents paramètres physico-chimiques sur l'activité des bactériocines.

Pour tous les tests qui suivent dans cette partie, la méthode de l'antagonisme différé a été utilisée vu son efficacité pour la détection de l'activité antibactérienne (**Sabia et al., 2014**).

- **Effet de la température**

L'étude de la stabilité thermique des bactériocines a été évaluée en traitant les surnageants à différentes températures 60, 80, 100 °C pendant 30 min et à 120°C pendant 20 min (**Hammami et al., 2012**).

La lecture des résultats se fait par comparaison, entre ceux obtenus avec les surnageants traités et le surnageant non traité à la chaleur

- **Effet du pH**

La sensibilité du pH sur l'activité des bactériocines a été évaluée en ajustant les surnageants des cultures lactiques à un intervalle de pH acides ou basique se situant de 2 à 12 (augmentation de 2 unités de pH) en utilisant du NaOH 1N ou HCl 1N puis tester leur activité antibactérienne (**Albano et al., 2007**).

La lecture des résultats se fait par comparaison, de l'effet inhibiteur des surnageants traités et non traités.

- **Effet des différents surfactants et sels inorganiques**

Des volumes équivalents de surnageants sont additionnés à 1% de différent surfactants à savoir: SDS, tween20, tritonX100, NaCl, KCl et 0,1 mM d'EDTA.

Chacun de ces volumes et un surnageant non traité (témoin) sont testés par la méthode d'antagonisme différé.

En parallèle, et aussi comme témoins, des volumes d'eau distillée stérile contenant les mêmes concentrations en détergents ont été testés, afin de déterminer l'effet du détergent seul sur la bactérie indicatrice (**Albano et al., 2007**).

## **9. Caractérisation des bactériocines**

### **9.1. Extraction des bactériocines**

Deux techniques différentes ont été utilisées pour extraire les bactériocines, et ce afin de déterminer la plus efficace permettant d'avoir un meilleur extrait vu le rendement assez faible, une consiste à utiliser des solvants organiques et l'autre se fait par adsorption-désorption.

#### **a. Extraction par solvants**

L'extraction par solvants est élaborée suivant le protocole de **Burianek et Youcef., 2000**. A partir d'un volume de 100 ml de culture d'une nuit de chaque isolat, une centrifugation est réalisée à 6000 rpm / 20 min, une fois le surnageant obtenu, une quantité de

chloroforme (v/v) y est additionnée avec une agitation vigoureuse pendant 20 minutes, puis transférée dans un entonnoir de séparation. La couche d'interface formée entre les phases aqueuse et organique, contenant la bactériocine, a été récoltée et le chloroforme résiduel a été quant à lui éliminé.

L'activité bactériocinogène a ensuite été mesurée dans les phases aqueuse et organique (**Mezaini et al., 2009**).

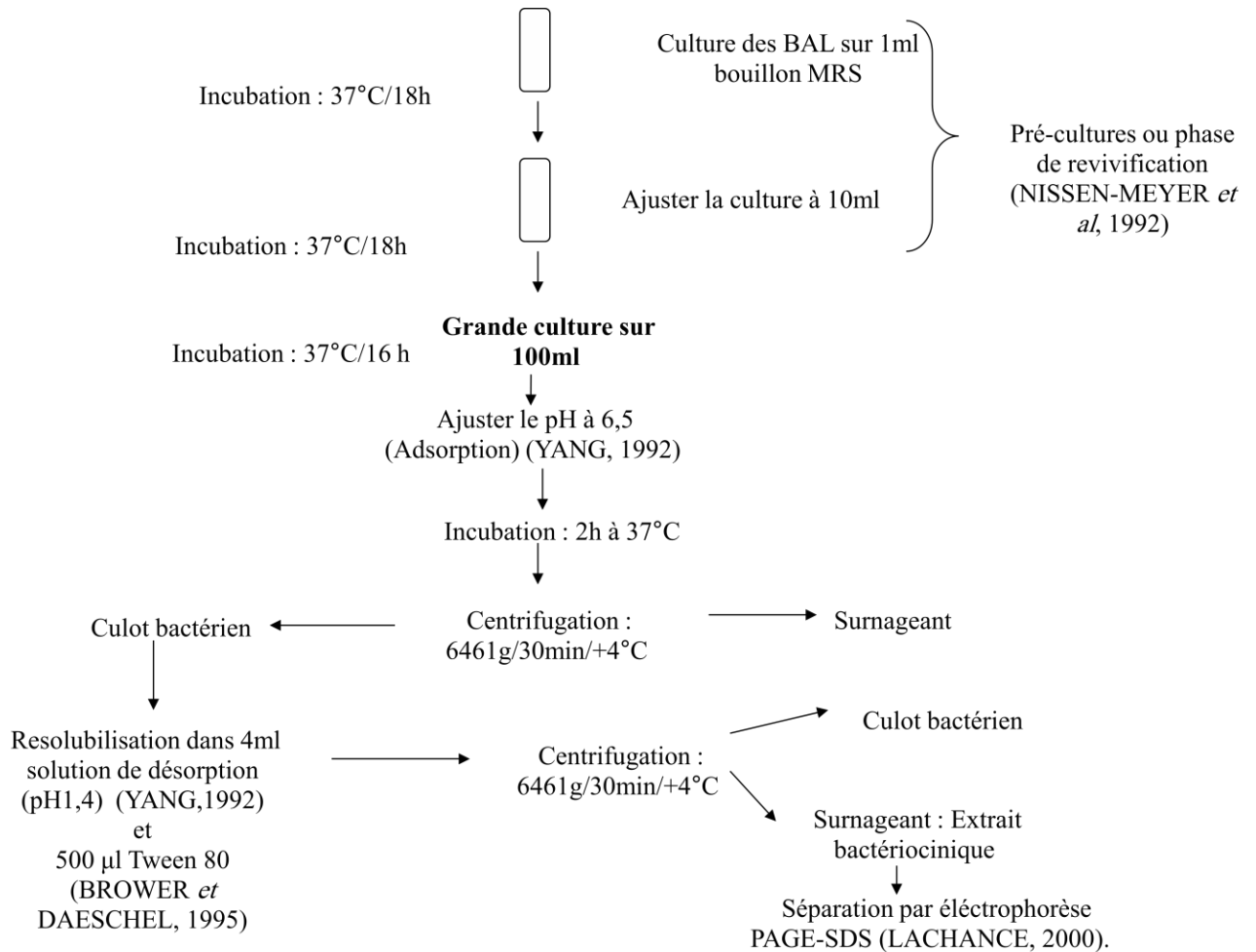
#### **b. Adsorption-désorption**

Cette méthode de purification a été rapportée par **Yang et al. (1992)** basée sur la propriété d'adsorption des bactériocines au niveau de la paroi des cellules productrices.

Le degré de cette adsorption dépend du pH. Ainsi, près de 93 à 100% des bactériocines sont adsorbées à des pH voisins de 6.0. Dans la présente étude, nous sommes basés sur le protocole de **Tulini et al., 2010**, le principe reste le même, une amélioration a été apportée au fait que l'extraction se fait en 2 temps à partir de la même culture.

100 ml de culture lactique préparée à partir de 5 % de préculture préalablement réalisée depuis les isolats lactiques, suivant leurs conditions optimum de culture. Le pH de la culture a par la suite été ajusté à 6,0 et celle-ci réincubée. Le culot obtenu par centrifugation à 6000 rpm / 20 min est conservé et a été lavé deux fois avec un tampon phosphate à 5 mM pH 6,0, puis remis en suspension dans 50 ml d'une solution à pH 1,4 additionné d'un volume de 500 µl de surfactant le tween 80 (**Figure II.2**).

La suspension cellulaire a été centrifugée une seconde fois à 6000 rpm / 20 min, le surnageant est cette fois ci collecté. Le culot cellulaire restant a encore été ajouté au surnageant initial du bouillon de culture et l'extraction a une fois de plus été répétée de la même manière. Les surnageants obtenus après les extractions ont été combinés (**Tulini et al., 2010**).



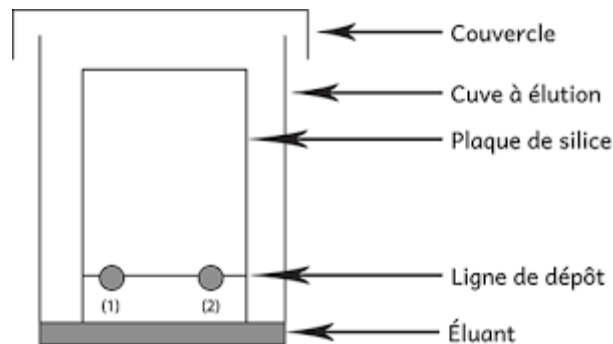
**Figure II.2:** Protocole d'extraction des bactériocines par la techniques d'adsorption - desorption (Yang *et al.*, 1992)

## 9.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les plaques à base d'alumine en gel de silice (4 cm x 8 cm), ont été utilisées en technique ascendante. Les extraits obtenus ont été déposés en points sur la ligne du bord de la plaque (Figure II.3), d'autres dépôts ont été effectués, s'agissant des acides aminés brutes considérés comme témoins afin de détecter la nature de nos extraits (Dodamani *et al.*, 2014).

Les plaques sont par la suite déposées dans une cuve contenant un éluant, l'éthanol. La migration a eu lieu dans un atmosphère fermé (recouvrir la cuve) pendant une durée de 30 min environ. Une fois le temps écoulé, les plaques ont été retirées puis séchées par évaporation complète du solvant.

Par ailleurs, la révélation a été faite par la méthode qualitative colorimétrique : le test de Ninhydrine (**Dodamani et al., 2014**).



**Figure II.3 :** Chromatographie sur couche mince (CCM)

### 9.3. Révélation par test de Ninhydrine

Les plaques ont été pulvérisées avec la solution de ninhydrine, préparée à raison de 0,1% (p / v) dans du chloroforme. La détermination du composé a été faite par observation de tache colorée pourpre, après séchage. Le rapport de la distance déplacée par le composé à celui déplacé par le solvant est connu sous le nom de valeurs R<sub>f</sub>. La visualisation avec la ninhydrine a des limites de détection qui peuvent varier de 0,01 à 0,5 µg / mL, selon le produit ainsi que la méthode de séparation employée (**Dodamani et al., 2014**).

### 9.4. Analyse spectroscopique UV-VIS-NIR des bactériocines

Les produits extraits précédemment ont été sujet d'analyse spectrométrique, afin d'évaluer le spectre des bactériocines de nos isolats. Une absorption UV-VIS-NIR (Ultraviolet et visible) a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre de type JENWAY 7315, à une longueur d'onde se situant dans un intervalle allant de 200 à 400 nm. Les extraits ont par conséquent été élué dans le même solvant utilisé lors de la chromatographie sur couche mince (CCM), entre autre l'éthanol (**Copeland, 1994**).

### 9.5. Analyse spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

Les produits extraits à partir des surnageants des isolats lactiques, ont été sujet d'analyse qualitative du composé actif et ce par la méthode Fourier Transform Infra Red (FTIR) décrite par **Kemp, 1991**. Avec une absorbance entre 4000 et 400 cm<sup>-1</sup>

### 9.6. Dosage des protéines solubles

La concentration des protéines des bactériocines dans l'extrait a été déterminée par la méthode de **Lowry et al., 1951**, utilisant comme standard le sérum bovine albumine (BSA).

Cette méthode est basée sur deux réactions chimiques. La première consiste en la réduction des ions de cuivre sous conditions alcalines, formant un complexe avec les peptides (réaction du Biuret). La seconde est quant à elle, la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu par le complexe cuivre-peptide qui, par la suite, induit un changement de couleur de la solution en bleu avec une absorbance à 750 nm avec un spectrophotomètre.

La quantité de peptides dans les échantillons est estimée en se référant à une gamme étalon d'une protéine standard choisie la BSA.

### **9.7. Electrophorèse sur gel polyacrylamide (SDS-PAGE)**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS tricine (SDS-PAGE), est une technique permettant la séparation des peptides et protéines, et ce au dépend de leur masse moléculaire. L'estimation du poids moléculaire de la bactériocine extraite, a été réalisée sur gels préparés à raison de 4% : gel de concentration, 10% : gel de séparation et le gel d'acrylamide à 20% (**Laemelli, 1970; Schagger et von Jagow, 1987; Smaoui, 2010**).

Un kit protéique et un kit peptidique ont été utilisés comme marqueur : Bovine serum albumin (90 kDa), ovalbumin (chicken egg 49 kDa), carbonicanhydrase (bovine erythrocytes 35 kDa), B- lactoglobulin (bovine milk 26 kDa), et lysozyme (chicken egg white 19 kDa), myoglobin 16.950 kDa,  $\alpha$ -lactalbumin 14.437 kDa, aprotinin 6.512 kDa, insulin drain oxidized 3.496 kDa (Bio-RAD, Germany).

La migration a été réalisée à 200 volts pendant 1 h dans un tampon anode (Tris 0.2 M, pH 8.9) et un tampon cathode (Tris 0.1 M, tricine 0.1 M, SDS 0.1% (p/v), pH 8.25).

Après migration, le gel a été lavée avec une solution à 10 mmol/l de tampon phosphate pendant 4 h, puis traité par une solution de bleu brillant Coomassie R-250 (Biorad) à 0,25%, afin de détecter et visualiser les bandes existantes (**Smaoui et al., 2010**).

### **9.8. Détermination de la CMI**

La détermination de la concentration minimale inhibitrice a été effectuée par utilisation de microplaques polystyrènes (96 wells microtest, USA) (**Verheul et al., 1997**).

Un volume de 200  $\mu$ l de chaque extrait a été déposé dans les puits. 25  $\mu$ l de préculture de la souche indicatrice Uropathogènes ont été additionné à chaque puits. Les microplaques sont par la suite incubées à 37°C pendant 24h. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'ondes de 600 nm. Le blanc était le milieu seul incubé dans les mêmes conditions (**Simova et al., 2009**).

La CMI ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a été calculée à partir de la dilution la plus élevée montrant l'inhibition complète de la souche cible (**Simova et al., 2009**).

## 10. Identification moléculaire des isolats bactériocinogènes

L'identification moléculaire des isolats bactériocinogènes, repose essentiellement sur leurs puretés. Afin de s'y assurer, un contrôle de purification à été nécessaire, et ce sur deux milieux différents à savoir : le milieu HHD (**Annexe**) permettant de différencier entre les bactéries lactiques homo et hétérofermentaires (**Mac Donald et al., 1987**), et le milieu KAA (**Annexe**) (Kanamycin Esculin Azide agar) pour la détection des Entérocoques (**Mac Donald et al., 1987**). Suivie d'un dénombrement sur pétrifilm, afin de connaître le nombre de colonies présentes dans nos cultures.

### 10.1. Extraction et purification de l'ADN

Les échantillons d'ADN bactériens des isolats lactiques producteurs de bactériocines ont été extraits selon la méthode d'Anderson et McKay (1983), puis purifiés sur des colonnes de silice grâce au kit « Microlysis ».

Cette purification est basée sur l'interaction de l'ADN avec la silice constituant les colonnes en présence de sels chaotropiques.

Les échantillons d'ADN des isolats bactériocinogènes ont donc été extraits à partir d'une culture bactérienne ensemencée la veille, c'est-à-dire une culture d'une nuit. La culture a par la suite été centrifugée à 6000 rpm pendant 15 min. Le culot a été lavé avec 500 µl du tampon solution saline

Une seconde centrifugation a été réalisée à 6000 rpm, pendant 1 min et le culot est repris dans 300 µl de solution 1 contenant le lysozyme à raison de 1 mg/ml.

Après incubation à 37°C pendant 30 minutes, on ajoute du SDS (concentration finale : 2 %), on agite au vortex, puis deux centrifugations à 6000 rpm pendant 1 min sont réalisées.

Une solution de NaCl à concentration finale : 1 M est additionnée, suivie d'une légère agitation au vortex puis une nouvelle centrifugation est réalisée pendant 5 min à 6000 rpm.

Le surnageant est récupéré et l'ADN est précipité avec l'éthanol pur (V/2V). Suite à une centrifugation d'une minute à 6000 rpm, un séchage est effectué afin d'évaporer l'éthanol à 65 °C pendant 2 heures.

Le culot est ensuite dissout dans une solution de TE 1X, agiter au vortex puis centrifuger 2 fois à 6000 rpm pendant 5 min, puis le surnageant contenant l'ADN est récupéré.

Une étape de purification de l'ADN est ensuite envisagée, le produit préalablement extrait est centrifugé à 6000 rpm pendant 1 min dans des tubes contenant des colonnes munies de membrane (Promega) nécessaires à cette étape, afin de permettre à l'ADN uniquement de se positionner sur ces membranes.

700 µl d'éthanol sont additionnées pour un éventuel rinçage, centrifugé à 6000 rpm pendant 1 min. Cette opération est répétée une seconde fois en additionnant 500 µl d'éthanol puis centrifuger à 6000 rpm pendant 5 min. Les tubes sont portés à température ambiante afin de permettre l'évaporation de l'éthanol.

50 µl de Nuclease free water sont transvasés aux colonnes à membranes, centrifugé à 6000 rpm pendant une min.

Arrivé à cette étape, le produit est considéré comme purifié. Il sera par la suite conservé à - 18°C

## **10.2. Analyse par RAPD-PCR (Randomly amplified polymorphic DNA analysis)**

L'analyse par RAPD-PCR des profils, a été utilisée afin d'effectuer une différenciation de première déformation ainsi que pour explorer la diversité génétique des isolats lactiques sélectionnés.

Les réactions RAPD-PCR ont été réalisées avec les amorces M13, D11344 et D8635 (**Tableau III**), les conditions d'amplification, ont été rapporté selon **De Pitcher *et al.* (1989)** :

- M13: 5 «GAGGGTGGCGGTTCT 3» (**Huey *et al.*, 1989**), 35 cycles de : 94 ° C pendant 1 min, 40 ° C pendant 20 s, rampe à 72 ° C à 0 ± 6 ° C, 72 ° C pendant 2 min.
- D11344: 5 «TCACGCTGCA 3» (**Barbier *et al.*, 1996**). Une étape initiale de 94 ° C pendant 2 min suivi de 45 cycles de: 94 ° C pendant 30 s, 35 ° C pendant 1 min, 72 ° C pendant 2 min; Une dernière étape à 72 ° C pendant 5 min.
- D8635: 5 «GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC » (**Akopyanz *et al.*, 1992**). Deux réactions d'amplification différentes ont été appliquées: (i) une étape initiale de 94 ° C pendant 2 minutes suivie de 35 cycles de: 94 ° C pendant 1 min, 42 ° C pendant 1 min, 72 ° C pendant 1 min. Une étape finale à 72 ° C pendant 10 min et (ii) un cycle pré-PCR De 94 ° C pendant 5 min, 40 ° C pendant 5 min et 72 ° C pendant 5 min suivie de 35 cycles De: 94 ° C pendant 1 min, 52 ° C pendant 1 min, 72 ° C pendant 2 min. Une dernière étape à 72 ° C pendant 10 min.
- Le regroupement des profils RAPD-PCR a été obtenu avec le Logiciel BioNumeric 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgique) et ce en utilisant la méthode du groupe de paires non pondéré par l'analyse de grappe arithmétique des moyennes.

La valeur concernant la répétition du dosage RAPD-PCR, l'extraction de l'ADN et conditions de fonctionnement, ayant été évaluées par analyse d'extraits d'ADN répétés du type souches, était de 90%.

### 10.3. Rep- PCR typing

Rep-PCR typing a été choisie comme deuxième méthode. Pour l'analyse par PCR, l'ADN génomique a été extrait à partir de 1,8 ml de chaque culture à l'aide du kit UltraClean Microbial DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, États-Unis).

L'ADN a été quantifié en utilisant le kit d'analyse de haute sensibilité dsDNA Quant-iT et le fluoromètre Qubit, puis a été normalisé à environ 25-50 ng /  $\mu$ l. Deux microlitres d'Aliquots ont été amplifiés en utilisant le kit DiversiLab de fabrication d'ADN (Bacterial Barcodes, Inc., Athens, GA, USA). Les paramètres de cyclage thermique étaient les suivants: dénaturation initiale à 94 ° C pendant 2 min; 35 cycles de dénaturation à 94 ° C pendant 30 s, recuit à 45 ° C pendant 30 s, et extension à 70 ° C pendant 90 s; Et une extension finale à 70 ° C pendant 3 min (**Jensen et al., 2009**).

Le produit amplifié a été stocké à -20 ° C jusqu'à détection. L'analyse des produits rep-PCR a été mise en œuvre à l'aide du système d'électrophorèse miniaturisé "DNA 7500 Lab-Chip" (Agilent Technologies, USA). Ce système sépare les morceaux d'ADN selon leur taille, ce qui donne lieu à un graphique des pics correspondants (électrophérogramme), peut être évalué et traduit en un pseudo-gel par un logiciel particulier (Agilent Technologies).

Concernant les résultats de rep-PCR, deux modèles ont été considérés comme différents si deux pics et plus de l'électrophérogramme différaient en taille (**Jensen et al., 2009**).

### 10.4. PCR et séquençage de l'ADN (Polymerase chain reaction)

La PCR est une technique d'amplification spécifique d'une séquence d'ADN et ce à l'emploi de deux oligonucléotides de synthèse, s'hybridant avec des séquences qui leurs sont complémentaires. La PCR à été utilisée dans notre cas pour amplifier le gène ARN 16S de nos isolats sélectionnés.

Les séquences d'ADN (5'-3') pour ce qui est des amorces utilisées dans cette étude, ainsi que leurs spécificités figurent dans le **Tableau II.1**.

Les amorces de PCR utilisées, ont été ceux pour identifier *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus casei*.

Les isolats ont été conçus en utilisant le programme Primer3. Ils ont été choisis sur la base de températures de fusion similaires. Les amorces étaient Synthétisé par Invitrogen (Minneapolis, MN, USA) et remis en suspension à une concentration finale de 100 mmol. $\mu$ L-1 dans de l'eau stérile distillée.

Pour chaque ADN l'amplification a été effectuée dans des microtubes de 200 µL en utilisant un mélange réactionnel de 25 µL. Contenant 50-100 ng de modèle d'ADN, Quick Load Taq 2X Master Mix (Taq DNA polymeras, DNTPs) (Nouveau Angleterre Biolabs, Ipswich, MA, USA), micromole par litre de la paire d'amorces et Eau double-distillée, à un volume final de 25 µL. Toutes les amplifications ont été portées dans un Master cycler (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) avec une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min suivie de 30 cycles à 94 °C pendant 1 min, recuit de l'amorce à 56 °C pendant 1 min et extension à 72 °C pendant 1 min, suivie d'une extension finale à 72 °C pendant 7 min.

Les produits de PCR amplifiés ont été visualisés par électrophorèse sur gel standard dans 1% d'agarose Gel coloré avec du SYBR. Les gels ont été photographiés sous la lumière ultraviolette en utilisant un Transilluminateur UV.

Les marqueurs utilisés sont de taille moléculaire (échelle d'ADN de 100 pb) et ont été inclus dans chaque gel d'agarose.

Les isolats qui ne peuvent être identifiés en utilisant la PCR spécifique à une espèce ont été soumis à un séquençage partiel d'ARNr 16S en utilisant l'ensemble d'amorces universelles p8FPL et p806R (**Tableau II.1**) (**Hosseini et al., 2009**).

Le séquençage de l'ADN a été effectué par MacroGen Inc. (Seoul, Corée du Sud) en utilisant BigDye (Applied Biosystems, Foster City, CA, États-Unis) sur un analyseur d'ADN de 3730xl (Applied Biosystems).

Les séquences ont été soigneusement examinées à l'aide du logiciel Chromas (Griffith Université, QLD, Australie). L'alignement de séquence a été effectué à l'aide du logiciel ClustalW.

L'algorithme BLAST a été utilisé pour déterminer la séquence la plus proche liée du centre national de biotechnologie nucléotide d'information Base de données de séquence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### **10.5. Sensibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques**

Les isolats de bactéries lactiques ont été inoculés dans du MRS bouillon et incubés pendant 24 h. Les cultures lactiques ont été ajustées à 10<sup>6</sup> UFC/ml,ensemencé en profondeur puis le milieu Muller Hinton a été coulé par dessus.

Les disques d'antibiotiques ont été placés en surface après solidification du milieu gélosé, puis incubés à 37°C pendant 24 h (**Sip et al., 2012**).

La résistance a été définie comme l'absence de la zone d'inhibition de croissance autour des disques (**Klare et al., 2005**).

Les antibiotiques utilisés sont les suivants : Chloramphenicol 30 µg, Cefepime 30 µg, Rifampicin 30 µg, Erythromycin 15 µg, Nitrofurantoin 300 µg, Mupirocin 200 µg, Gentamicin 100 µg, Ciprofloxacine 5 µg, Tétracycline 30 µg, Vancomycine 30 µg, Tobramycine 10 µg, Penicilline G 10 µg, Ampicilline 10 µg, Colistin Sulfate 10 µg, Levofloxacine 5 µg, Oxacilline 1 µg, Quinupristin / Dalfopristin 15 µg, Amikacine 30 µg, Imipenem 10 µg, Ceftazidime 30 µg, Streptomycine 10 µg, Piperacilline 100 µg.

#### **10.6. Détection des gènes codants pour bactériocines, résistance aux antibiotiques et facteurs de virulence par PCR**

L'ADN extrait précédemment a été utilisé pour cette partie. Chaque amplification d'ADN a été effectuée dans 200 µl de microtubes, utilisant un mélange réactionnel 25 µl contenant 50-100 ng de matrice d'ADN, PCR Master Mix 2 x (Fermentas, Canada), 10 µM de la paire d'amorces et double - Eau distillée, à un volume final de 25 µl.

Les produits de PCR amplifiés ont été visualisés par électrophorèse sur gel standard dans 1,5% de gel d'agarose coloré avec SYBR Safe (Invitrogen, Minneapolis, MN, USA). La présence de gènes codant pour la bactériocine a été étudiée par amplification par PCR avec des amorces spécifiques des bactériocines entérococciques suivantes: bactériocine 31 (bac31), entérocoque 1071A-B (ent1071A-B), entérocoque A (entA), entérocoque AS-48 (entas48), Enterocin B (entB), Enterocin CRL35 (entCRL35), Enterocin L50A-B (entL50A-B), Enterocin P (entP), Enterocine Q (entQ) et Mundticin KS (munKS) (**Tableau II.2**).

**Tableau II.1.** Liste des primers utilisés lors de la PCR (Polymeras chain reaction)

Target	Primer	Séquence 5'-3'	Target gene	Référence
<i>Enterococcus faecalis</i>	FAE-fw	CGCTAGGCTCCATTGATAGC	16S rRNA	(VanHoorde et al.2008a)
	FAE-rev	CGGTTGGGTCTTGATCACTT		
<i>Enterococcus faecium</i>	FUM-fw	CGGAGACTACACAATTTGTTTTT	16S rRNA	(VanHoorde et al.2008a)
	FUM-rev	CGGTTGGGTTTTGATCCTT		
<i>Enterococcus durans</i>	DUR-fw	ATTTAGATCGGGGCCTTAGC	16S rRNA	(VanHoorde et al.2008a)
	DUR-rev	GCGGTGTTCTCGGTTTGTAT		
<i>Lactococcus lactis subsp.lactis</i>	LAC-fw	TCTTGATTGTGGGGCCTTAG	16S rRNA	(VanHoorde et al.2008a)
	LAC-rev	TCACAGGTTTTGGTTTATTTATCG		
<i>Lactococcus garvieae</i>	LGA-fw	CCTTAGCTCAGCTGGGAGAG	16S rRNA	(VanHoorde et al.2008a)
	LGA-rev	TTCGCAGCTTTACAGAAATGTT		
<i>Lactobacillus delbruecki</i>	DelI	ACGGATGGATGGAGAGCAGGCAG	16S-23S Spacer	(VanHoorde et al.2008a)
	DelII	GCAAGTTTGTCTTTTCGAACTCAACTC		
<i>Lactobacillus casei</i>	PrI	CAGACTGAAAGTCTGACGG	16S-23S Spacer	(Walteretal.2000)
	CasII	GCGATGCGAATTTCTTTTTTC		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lfpr	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT	16S-23S Spacer	(Walteretal.2000)
	PlanII	TTACCTAACGGTAAATGCGA		
<b>RAPD-PCR</b>	M13	GAGGGTGGCGGTTCT		(Andrighetto et al.2002)
<b>RAPD-PCR</b>	D11344	AGTGAATTCGCGGTCAGATGCCA		(Andrighetto et al.2002)
<b>RAPD-PCR</b>	D8635	GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC		(Andrighetto et al.2002)
<b>Sequencing</b>	p8FPL p806R	AGTTTGATCCTGGCTCAG GGACTACCAGGGTATCTAAT	16S rRNA	(Hosseini et al.2009)

**Tableau II.2.** Liste des primer utilisés lors de la PCR pour la détection des gènes codant pour des bactériocines, résistance aux antibiotiques et facteurs de virulence des isolats lactiques.

Target	Primer Sequence (5'-3')	Taille amplifié (bp)	Reference
<i>bac31</i>	TATTACGGAAATGGTTTATATTGT TCTAGGAGCCCAAGGGCC	130	Du Toit et al. (2000)
<i>ent1071A-</i>	CCTATTGGGGGAGAGTCGGT ATACATTCTTCCACTTATTTTT	400	Ben Omar et al. (2004)
<i>entA</i>	AAATATTATGGAAATGGAGTGAT GCACTTCCCTGGAATTGCTC	126	Du Toit et al. (2000)
<i>entAS-48</i>	GAGGAGTTTCATGATTTAAAGA CATATTGTAAATTACCAAGCAA	350	Ben Omar et al. (2004)
<i>entB</i>	GAAAATGATCACAGACCTA GTTGCARRRAGAGTATACATTG	159	Du Toit et al. (2000)
<i>entCRL45</i>	GCAAACCGATAAGAATGTGGGAT TATACATTGTCCCCACAACC	490	Saavedra et al. (2004)
<i>entL50A-B</i>	GATTGGAGGAGTTATATTATGGG CAAATTATAAAGAAATAATTACCTATCATTA	556	Cintas et al. (2000)
<i>entP</i>	AC GCTACGCGTTCATATGGTAATGGTG ATGTCCCATACCTGCCAAACCAGAAGC	132	Cintas et al. (2000)
<i>entQ</i>	GGAATAAGAGTAGTAGTGAATACTGATATG AAAGACTGCTCTCCGAGCAGCC	653	Cintas et al. (2000)
<i>munKS</i>	TTTTGCGGCCGCTAAGACTATAGGATAGACA	3128	Kawamoto et al. (2002)

### 1.1. Analyse statistique des résultats

Tous les résultats concernant la détermination de la production de bactériocines correspondent à la moyenne des valeurs des résultats de trois cultures différentes ont été analysés statistiquement par le logiciel Minitab (version 15) en utilisant les tests de Duncan et de Tukey réalisés après l'analyse des variances (ANOVA).

# Chapitre III

---

## RÉSULTATS & DISCUSSION

Dans un premier temps, le travail a porté sur l'isolement et identification des bactéries lactiques, ainsi qu'un screening dont l'intérêt de mettre en évidence l'effet antibactérien vis-à-vis des pathogènes responsables d'infections urinaires et les propriétés des bactériocines produites d'une part, et d'autre part de les caractériser. Ce qui fera évidemment l'objet d'investigations plus approfondies dans la suite du travail.

## **I. Bactéries lactiques**

Concernant notre étude, les caractéristiques morphologiques et phénotypiques des colonies obtenues à partir des échantillons ont été réalisées sur la base du Bergey's Manual of systematic bacteriology (**Sneath et al., 1986**).

### **1. Caractérisation phénotypique des isolats**

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

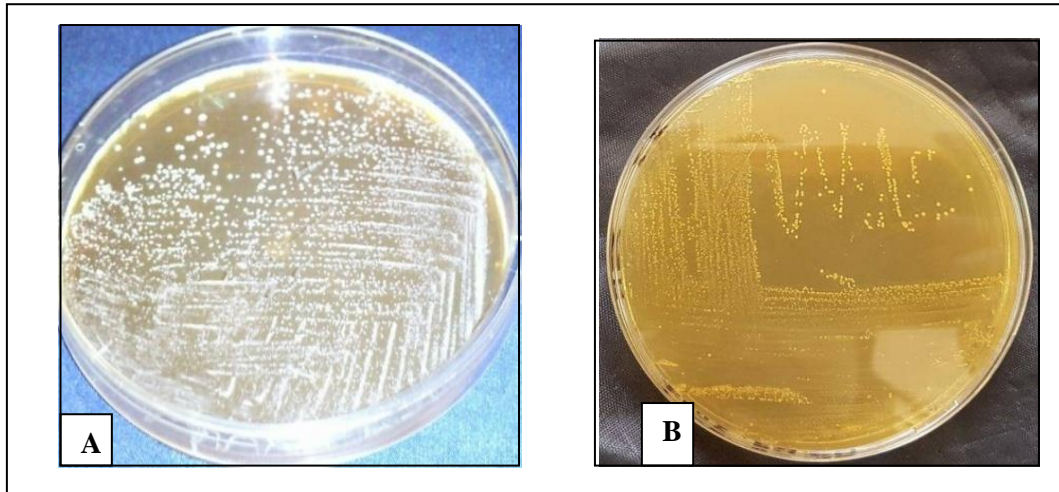
Dans le but de sélectionner uniquement les bactéries lactiques, nous avons procédé à la vérification des différents aspects :

- **Aspect macroscopique**

L'aspect macroscopique, permet de décrire les colonies obtenues sur milieu solide après incubation, les comparant ainsi aux critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (contour, taille, pigmentation, aspect...) (**Ana Belen Florez et al ., 2006**).

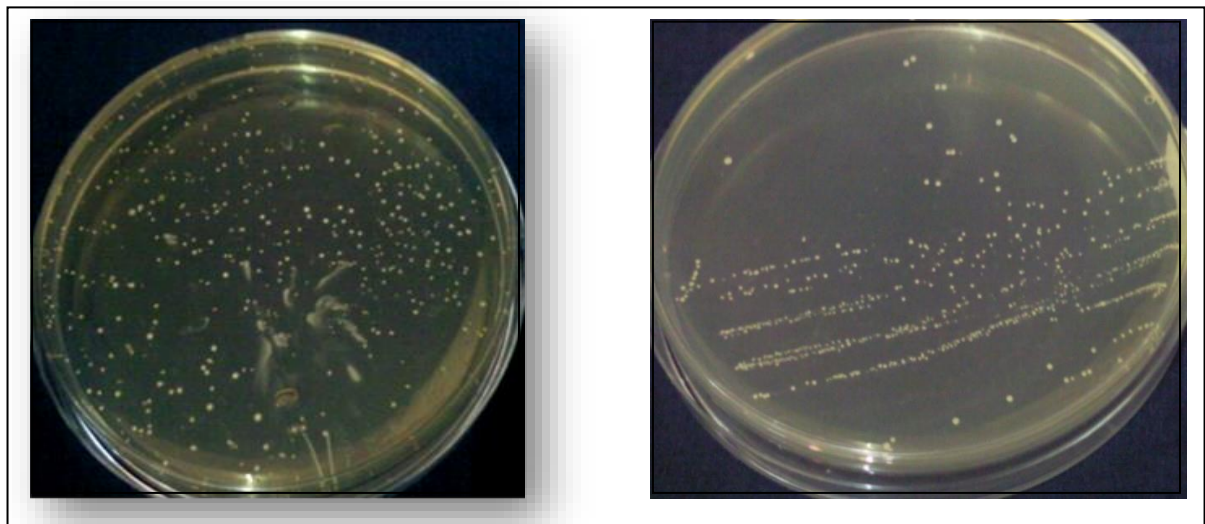
Concernant nos isolats testés, nous avons constaté sur milieu solide des colonies de petite taille d'environ 1 à 2 mm de diamètre, de forme circulaire, et de couleur blanchâtre (**Figure III.1**).

Par contre, l'observation macroscopique en milieu liquide nous a permis d'observer un trouble assez dense comparativement au témoin, ce qui indique une croissance bactérienne au fond du tube.



**Figure III.1** : Aspect macroscopique des isolats sur milieu MRS (A) et M17 (B)

Concernant les bifidobactéries, après une série de purifications sur milieu solide (MRS-Cys), les colonies développées ont montré un aspect punctiforme, bombées, luisantes, de couleur blanchâtres, de contour régulier avec un diamètre variable. Cet aspect macroscopique est fréquemment rencontré chez les Bifidobactéries (**Figure III.2**).

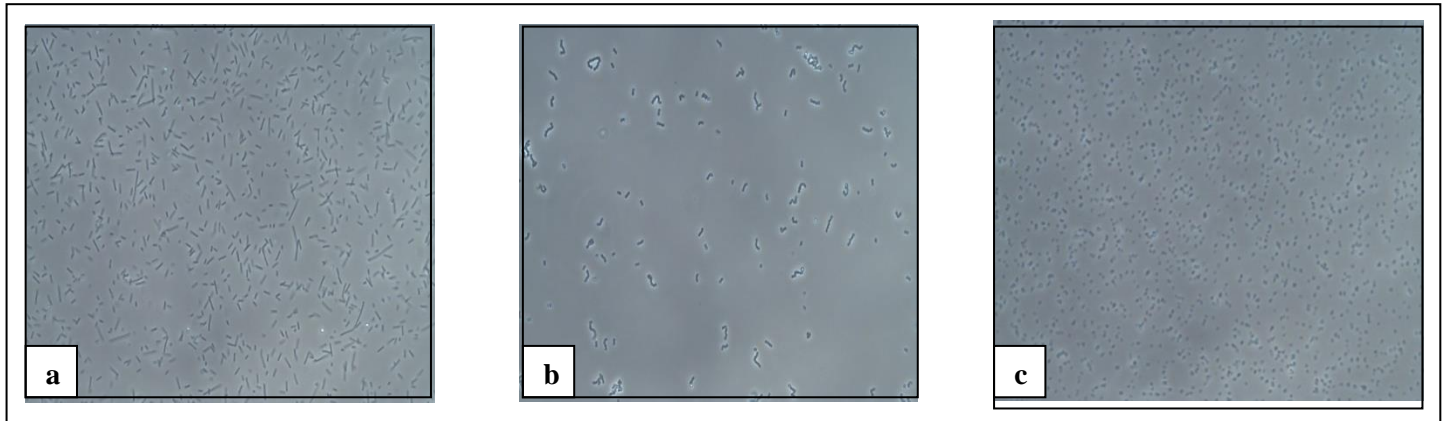


**Figure III.2** : Observation macroscopiques des colonies lactiques sur MRSc

Le test de production de la catalase est effectué par addition du  $H_2O_2$  aux colonies bactériennes. Tous les isolats ayant montré une réaction négative ont été retenus comme étant catalase négative (-)

- **Observation microscopique à l'état frais**

Au cours de la réalisation du test, la technique d'observation microscopique à l'état frais avait montré son importance comme étant une technique rapide dans la détermination de la forme morphologique de nos isolats lactiques (**Figure III.3**).



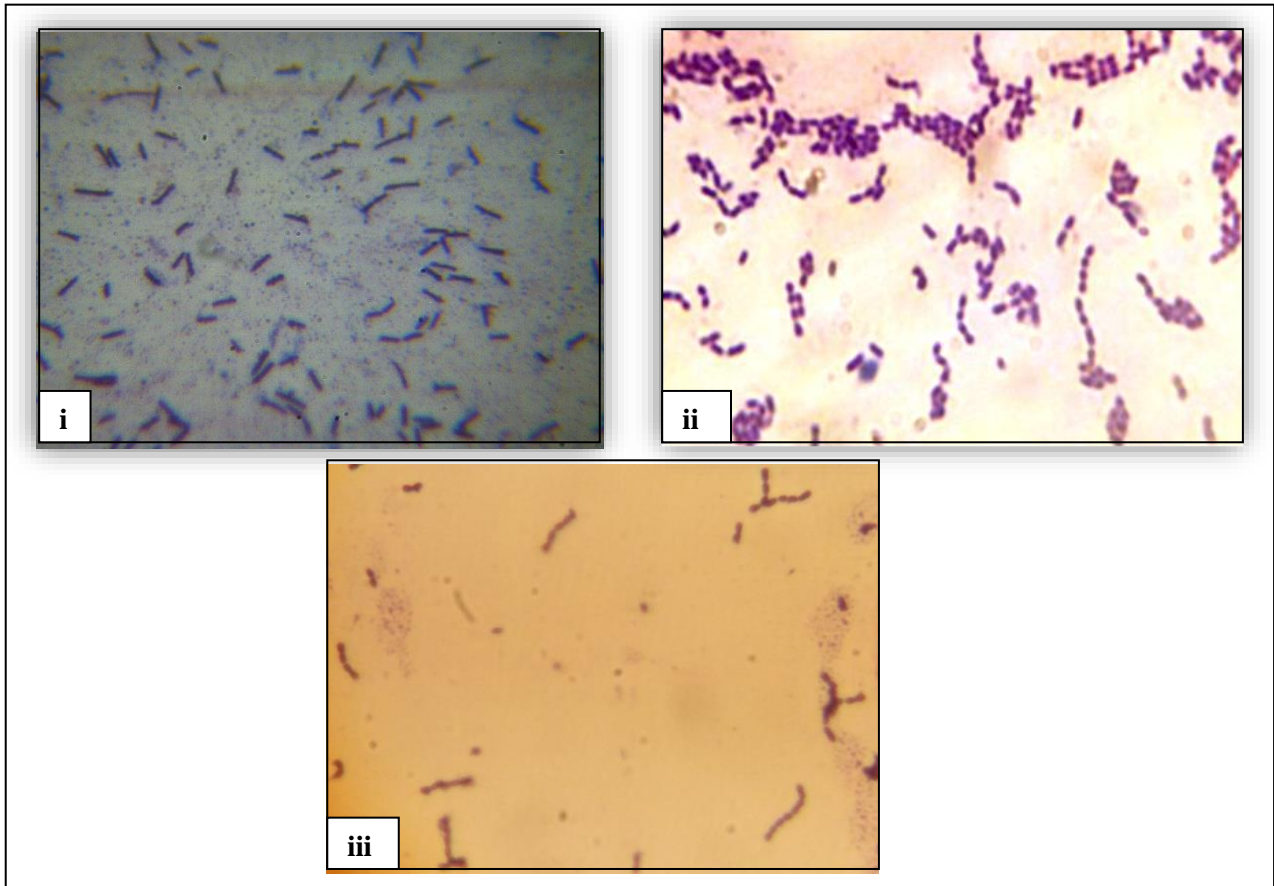
**Figure III.3** : Observation microscopique des isolats lactiques à l'état frais **(a)** : bacilles  
**(b)** ovoides **(c)** Coques

- **Observation microscopique coloration de Gram**

La technique de coloration de Gram a été appliquée, uniquement pour confirmer les observations effectuées au préalable à l'état frais et déterminer par conséquent le Gram. Seulement les isolats à Gram positif ont été retenus (**Figure III.4**).

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

Concernant les Bifides, l'observation microscopique après coloration de Gram a révélé la présence de bacilles à Gram positif de forme (Y, V), courts bâtonnets à extrémité arrondis et souvent de forme spatulés parfois même sous forme de petits bacilles réguliers ou coccoides (**Figure III.4**).



**Figure III.4 :** Observation microscopiques (Objectif X100) des isolats lactiques avec coloration de Gram ((i) Lactobacilles, (ii) Enterocoques, (iii) Bifidobactéries).

L'identification de l'espèce repose sur la comparaison des divers caractères phénotypiques de la souche à étudier vis-à-vis de ceux d'une souche de référence (**Vanden Berg et al., 1993; Carr et al., 2002; Parada et al., 2007**).

## 2. Caractérisation biochimique des isolats

Les résultats des tests effectués pour l'identification biochimique des isolats lactiques pré-identifiés sont rassemblés dans le **tableau III.1**.

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

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

- La croissance à différentes températures (15°C, 37°C et 45°C);
- L'aptitude à croître en présence de 4% et 6,5% de NaCl;
- L'aptitude à croître à pH 9.6;
- La production de gaz;
- La fermentation des carbohydrates.

Pour les lactocoques, nous avons retenu uniquement les bactéries qui ne possèdent pas la capacité de pousser en présence de 6.5% de NaCl et à pH 9.6 (Mayo *et al.*, 1990; Carr *et al.*, 2002).

- **Recherche du type fermentaire**

L'utilisation de cloches de Durham dans un milieu liquide contenant du glucose est une méthode pour la détection de la formation de gaz, et déduire ainsi le type fermentaire (Harrigan et Mc Cance, 1976; Garvie, 1984; Schillinger et Lücke, 1989; Badis *et al.*, 2004).

Ce test nous a permis de différencier les isolats homofermentaires des isolats hétérofermentaires (Figure III.5). La présence de gaz dans la cloche de Durham indique un métabolisme hétérofermentaire (Kihal *et al.*, 1996).



**Figure III.5 :** Résultat du type fermentaire pour les isolats purs

- **Croissance en présence de diverses concentrations de NaCl**

Tous les isolats étudiés se développent sur milieu MRS, M17 et MRSc additionné de 4% et 6.5 % de NaCl, le même résultat a été constaté pour le pH 9.6 (Tableau III.1).

Les 152 isolats retenus (Tableau III.1) ont été attribués à 03 genres distincts en plus des bifidobactéries, présentés par ordre de dominance comme suit: *Enterococcus* (110 isolats) *Lactobacillus* (25 isolats), *Lactococcus* (15 isolats) et Bifidobactéries (02 isolats).

Les bactéries du genre *Enterococcus* ont la même morphologie que les lactocoques. La différenciation entre ces deux genres repose sur l'habilité de croître aux températures 10°C et à 45°C, ainsi que la croissance en milieu liquide contenant 6.5% et 9.6% NaCl qui est caractéristiques des entérocoques (Schleifer *et al.*, 1985; Hardie et Whiley, 1995; Badis *et al.*, 2004). Nous avons enregistré 110 souches qui ont donné, simultanément, des résultats positifs à ces différents tests: la thermorésistance, croissance à 10°C et à 45°C, en présence de 6.5% et 9.6% NaCl. Toutes ces propriétés correspondent aux paramètres attribués aux entérocoques.

**Tableau III.1:** Caractéristiques physiologiques et biochimiques des BL isolées

Isolat	Cat	Ox	TF	45°C	10°C	37°C	6.5% NaCl	9.6% NaCl	Pré- identification
LVM02	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM03	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM04	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM05	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM06	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM07	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM08	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM09	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM10	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM11	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM12	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM13	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM14	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM16	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM17	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM18	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM19	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM20	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM21	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM22	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus sp</i>
LVM23	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM24	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM25	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM26	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM27	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM28	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM29	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM30	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM31	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM32	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM33	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM34	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM35	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM36	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM37	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM38	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM40	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM41	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM42	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LVM43	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MGM02	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MGM85	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVO95	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM17	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM24	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM25	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM26	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM27	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	

LCM28	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM29	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM31	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM32	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM36	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM37	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM41	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM42	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM43	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM44	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM45	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM46	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM51	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM53	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM54	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM65	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM70	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM71	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM72	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM73	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM74	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM75	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM76	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM77	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM78	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM80	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM81	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus sp</i>
LCM82	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM83	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM84	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM85	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM90	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM91	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM92	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM93	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM95	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM96	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM97	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM103	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM15	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM17	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM19	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM20	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM21	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM22	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM23	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM24	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM25	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM26	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM27	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM28	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	

MVM	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus sp</i>
MVM3	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM3	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM3	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM3	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM3	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM3	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
MVM3	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM0	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM0	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM0	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM0	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM0	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM0	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM0	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM0	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM1	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM1	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	+	
LCM1	-ve	-ve	Ho	+	nd	+	nd	nd	
LCM1	-ve	-ve	Ho	+	nd	+	nd	nd	
LCM2	-ve	-ve	Ho	+	nd	+	nd	nd	
LCM2	-ve	-ve	Ho	+	nd	+	nd	nd	
LCM3	-ve	-ve	Ho	+	nd	+	nd	nd	
LCM3	-ve	-ve	Ho	+	nd	+	nd	nd	
LCM3	-ve	-ve	Ho	+	nd	+	nd	nd	
LCM3	-ve	-ve	Ho	+	nd	+	nd	nd	
LCM3	-ve	-ve	Ho	+	nd	+	nd	nd	
LCM4	-ve	-ve	Ho	+	nd	+	nd	nd	
LVOM	-ve	-ve	Ho	+	+	+	+	nd	
LVOM	-ve	-ve	Ho	+	nd	-	nd	nd	
LVOM	-ve	-ve	Ho	+	nd	-	nd	nd	
LVOM	-ve	-ve	Ho	+	nd	+	nd	nd	
LVOM	-ve	-ve	Ho	+	nd	+	nd	nd	
LVOM	-ve	-ve	Ho	+	nd	+	nd	nd	
LVOM	-ve	-ve	Ho	+	nd	+	nd	-	
MGM0	-ve	-ve	Ho	-	nd	-	nd	-	
MGM0	-ve	-ve	Ho	-	nd	+	nd	-	
MGM1	-ve	-ve	Ho	-	nd	+	nd	-	
MGM1	-ve	-ve	Ho	-	nd	+	nd	-	
MGM1	-ve	-ve	Ho	-	nd	+	nd	-	
MGM1	-ve	-ve	Ho	-	nd	+	nd	-	
MGM2	-ve	-ve	Ho	-	nd	+	nd	-	
MGM2	-ve	-ve	Ho	-	nd	+	nd	-	
MGM2	-ve	-ve	Ho	-	nd	-	nd	-	
MGM2	-ve	-ve	Ho	-	nd	+	nd	-	
MGM3	-ve	-ve	Ho	-	nd	+	nd	-	
MGM3	-ve	-ve	Ho	-	nd	+	nd	-	
MGM3	-ve	-ve	Ho	-	nd	+	nd	-	
MGM3	-ve	-ve	Ho	-	nd	+	nd	-	
MGM3	-ve	-ve	Ho	-	nd	+	nd	-	
MGM4	-ve	-	Ho	-	nd	+	nd	-	
BSN02	-ve	-	Ho	-	nd	+	nd	-	
BSN05	-ve	-	Ho	-	nd	+	nd	-	

*Lactobacillus sp*

*Lactococcus sp*

- **Fermentation des sucres**

L'identification biochimique des différents isolats est basée principalement sur la réponse aux différents tests microbiologiques effectués. La pré-identification est suivie par l'étude des propriétés fermentaires des sucres par les isolats.

Quatorze sucres ont été utilisés au cours de ce travail, en combinant le test d'ADH les trois groupes d'isolats ont été caractérisés selon les critères biochimiques et physiologiques selon la littérature (**Sharpe, 1979; Kandler et Weiss, 1986; Schillinger et Lücke, 1989; Montel et al., 1991; Samelis et al., 1994; Stiles et Holzapfel, 1997; Carr et al., 2002; Badis et al., 2004; Guessas et al., 2005; Guessas et al., 2007**), entre autre le profil fermentaire des sucres qui a concerné uniquement les Lactobacilles (**Figure III.6**).

L'identification est faite en comparant les profils obtenus avec ceux des souches de référence trouvés dans la bibliographie et dans le Bergey's manual of systematic bacteriology (**Lopez et Mayo, 1994; Mathara et al., 2004; Lee et al., 2006**).

**Genre *Enterococcus* sp**

110 isolats possèdent les caractères suivants: ADH+, homofermentaires, et croissance en présence de 6.5% de NaCl, à 45°C et à pH 9.6. Ce sont les propriétés typiques du genre *Enterococcus* (**Devriese et al., 1993; Devriese et Pot, 1995**).

**Genre *Lactococcus* sp**

15 isolats de *lactococcus* ont été obtenus. Elles forment des colonies lisses, arrondies, cendrées ou claires sur milieu M17, Arginine + ne pouvant se développer à 45°C (**Carr et al., 2002**).

**Genre *Lactobacillus* sp**

La forme bâtonnet observé au microscope, le type de coloration Gram+, la forme asporulante des bacilles, nous ont orientés pour classer 25 isolats dans la catégorie *Lactobacillus*.

Sur la base des différentes températures de croissance, de l'hydrolyse de l'arginine et du type fermentaire selon le substrat employé (glucose ou gluconate), le genre *Lactobacillus* est subdivisé en trois groupes (**Collins et al., 1987; Charteris et al., 2001; Hammes et Hertel, 2003**).

La différenciation entre les différentes espèces du genre *Lactobacillus* repose essentiellement sur leur difficulté de fermenter les sucres (**Kandler et Weiss, 1986, Stiles et Holzapfel, 1997; Carr et al., 2002**).

Les 25 souches obtenues sont des lactobacilles hétérofermentaires, alors les isolats de ce groupe fermentent généralement les hexoses en lactate, en acétate et/ou en éthanol et CO<sub>2</sub>.

*Lb. buchneri* fermente le mélézitose et le melibiose (Sharpe, 1962; Kandler et Weiss, 1986). *Lb. acidophilus* fermente l'amygdaline et le cellobiose, et hydrolyse l'esculine (Rogosa et al., 1953; Sharpe, 1962; Johnson et al., 1980). Tandis que *Lb. delbrueckii* fermente le saccharose mais pas le tréhalose ou le cellobiose.

*Lb. delbrueckii* quant à elle ne fermente pas le lactose ou le galactose (Sharpe, 1962; Topley, 1982). Ce groupe inclut *Lb. reuteri*, et *Lb. fermentum*.

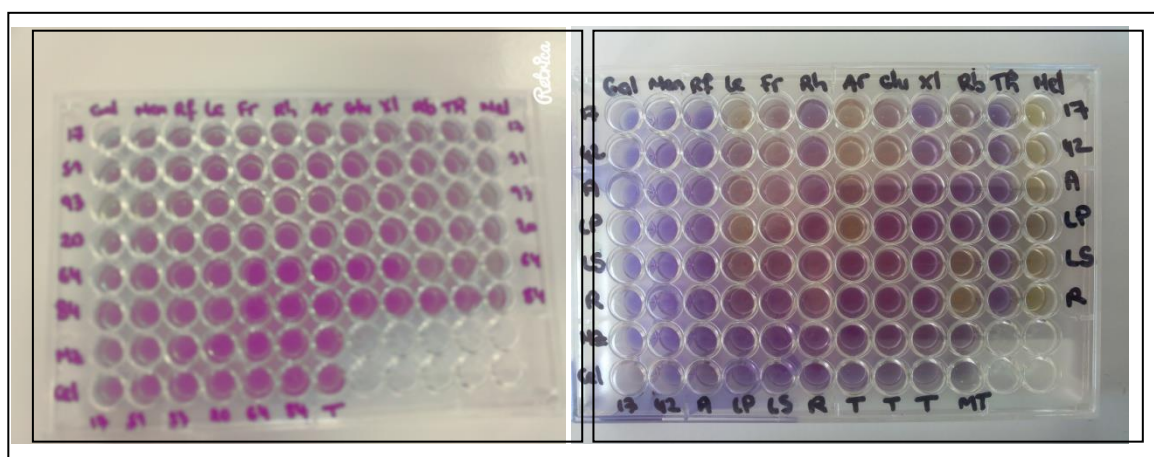


Figure III.6 : Fermentation des sucres par les isolats lactiques

Pour le cas de notre étude, l'identification des isolats a été faite sur la base du schéma de différenciation des bactéries lactiques selon Carr et al., 2002 (Figures III.7).

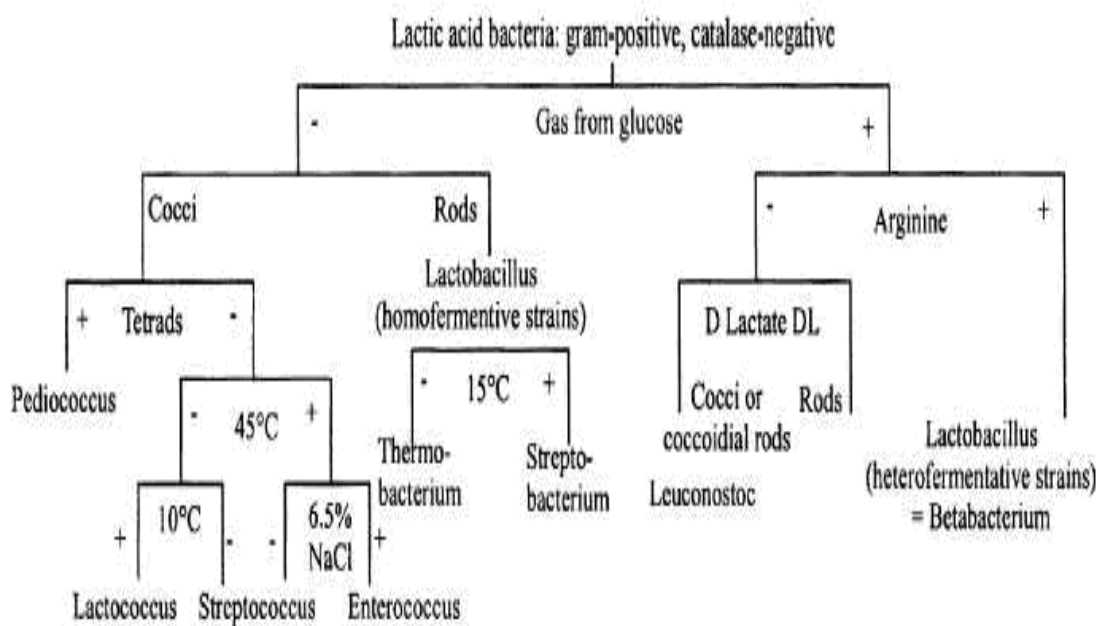


Figure III.7 : Schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques (Carr et al., 2002).

## II. Infections urinaires

### 1. Prélèvement des échantillons

Un total de 100 échantillons d'urine a été obtenu pour les deux sexes, une culture positive importante a été enregistrée chez 70% des patients, alors que pour les 30% restants nous n'avons noté aucune croissance.

L'infection des voies urinaires a été confirmée par l'isolement de la culture pure de l'examen cytologique d'urine de microorganismes pathogènes avec une teneur supérieure à  $10^5$  UFC/ml.

### 2. Analyse des urines

Une série de caractéristiques biologiques a été étudiée, les urines normales sont de couleur jaune ou jaune d'or, limpide et transparente. Les urines pathologiques peuvent avoir un aspect trouble jaune pâle jusqu'à orange, d'origine bactérienne et/ou leucocytaire.

Par ailleurs, l'aspect trouble de l'urine n'est pas toujours pathologique, il peut s'agir d'un dépôt de cristaux ou de pertes vaginales, l'aspect hématurique de l'urine est dû à une hématurie (menstrues).

La moyenne du pH urinaire était comprise entre 6 et 7 atteignant chez quelques patients une valeur de 8. Suite aux bandelettes urinaires réalisées pour l'ensemble des consultants, la glycosurie était positive chez 8,8 % et une leucocyturie a été détectée chez 70% des patients. Un nombre élevé de cristaux a été également constaté.

Cependant, tous les patients avaient un ECBU positif le jour du prélèvement avec un dénombrement et une bactériurie largement supérieur à  $10^5$  UFC/mL pouvant atteindre les  $10^8$  UFC/mL.

L'utilisation des bandelettes urinaires réalisées pour tous les patients, nous a permis de détecter que la glycosurie était positive chez 5 % et une leucocyturie était détectée chez 65 % des patients. Un nombre élevé de cristaux a été également constaté chez l'ensemble des patients infectés ce qui est probablement dû à la stase des urines dans la vessie. Par ailleurs, tous les patients ont exprimé un ECBU positif le jour du prélèvement.

La prévalence chez les hommes était de 41,4%, mais chez les femmes, la prévalence était de 58,6%, variait entre 15 ans et 55 ans **Tableau III.2**. Nos résultats sont en accord avec **Rhazi Filali et al., 2012** qui a rapporté une fréquence de 37% du sexe masculin et 63% du sexe féminin.

Notre étude confirme donc une approche classique, les infections urinaires sont plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes.

**Tableau III.2** : Répartition de l'échantillonnage selon l'âge et le sexe

Age	Hommes	Pourcentage (%)	Moyenne±SD	Femmes	Pourcentage (%)	Moyenne ±SD	P value
[15,25]	05	17.24%	8.3±4.9	15	36.59%	6.8±4.8	0.033
[25,35]	11	37.93%	7.0±4.8	11	26.83%	10.5±4.9	0.057
[35,45]	08	27.59%	12.8±4.9	07	17.07%	9.2±4.9	0.047
[45,55]	03	10.34%	6.0±3.8	05	12.19%	6.2±4.8	0.022
55 <	02	6.90%	5.8±4.9	03	7.32%	5.1±4.8	0.030
<b>Totale</b>	<b>29</b>	<b>100%</b>		<b>41</b>	<b>100%</b>		

P>0.005 (non significatif)

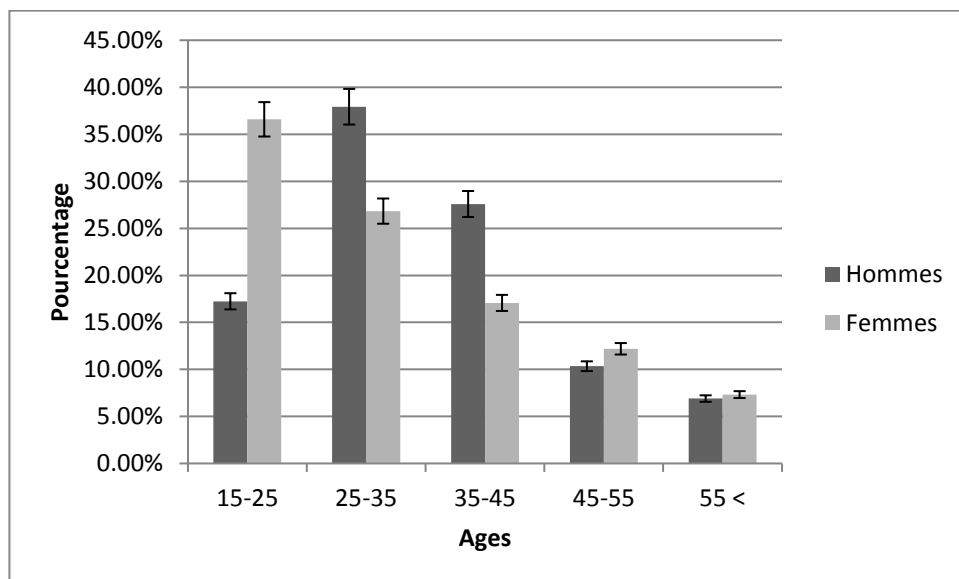
P<0.005 (Hautement significatif)

SD= Standard

Deviation.

Chez les patients du sexe masculin, la culture positive était principalement caractérisée dans une tranche d'âge comprise entre 25 et 45 ans, avec un pourcentage de 37,93% et 27,59%. Cependant, la positivité est moindre à l'âge de 55 ans avec un pourcentage de 6,90%.

D'autre part, la culture positive des patientes du sexe féminin a été constatée dans l'intervalle d'âge compris entre 15 et 35 ans, un pourcentage de 36,59% et 26,83%, tandis qu'à moins de 55 ans chez les patients masculins, un pourcentage de 7,32% a été enregistré. La répartition selon l'âge des échantillons positifs est illustrée dans la **Figure III.8**.



**Figure III.8** : Répartition des échantillons positifs selon l'âge et le sexe.

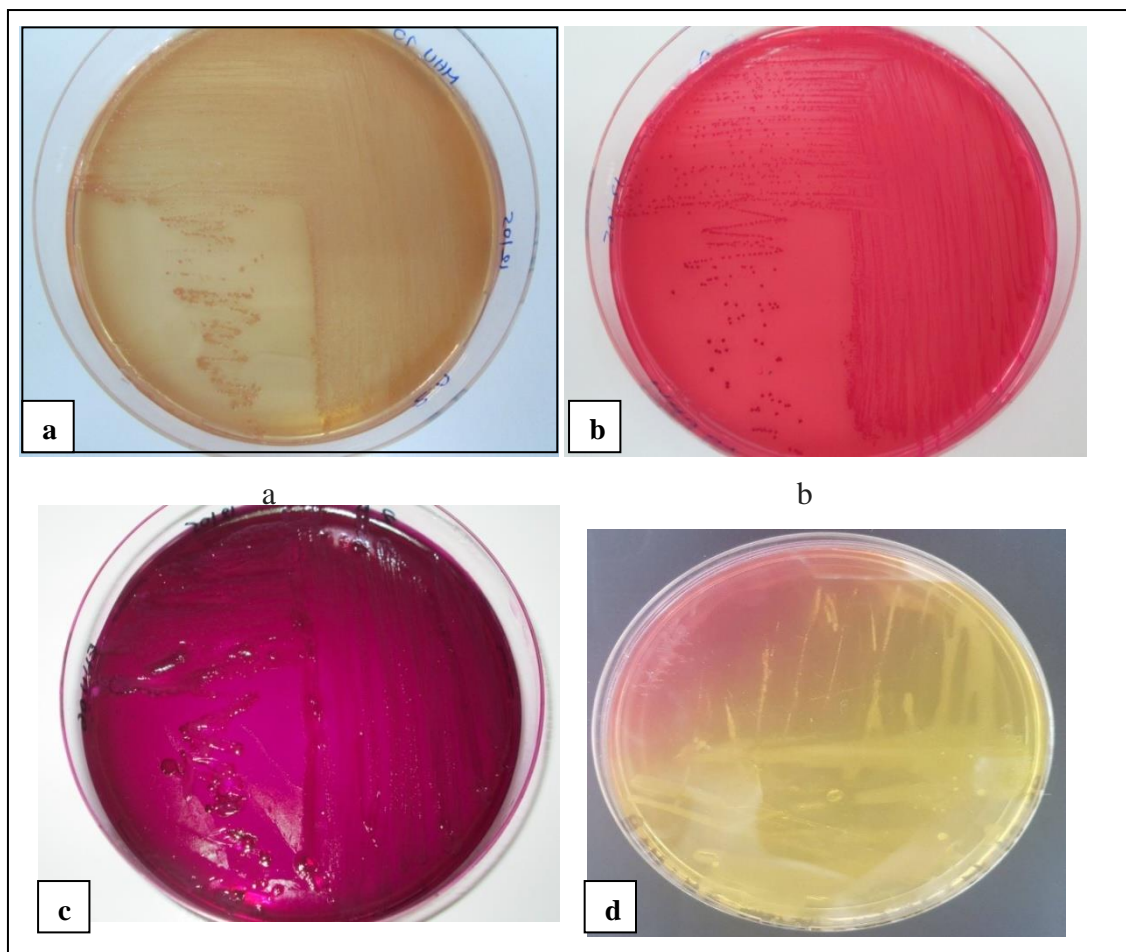
### 3. Isolement et pré-identification des uropathogènes

L'isolement et la pré-identification des isolats issus des échantillons d'urine positifs, ont permis de déterminer les genres bactériens impliqués dans ces infections, après culture sur différents milieux.

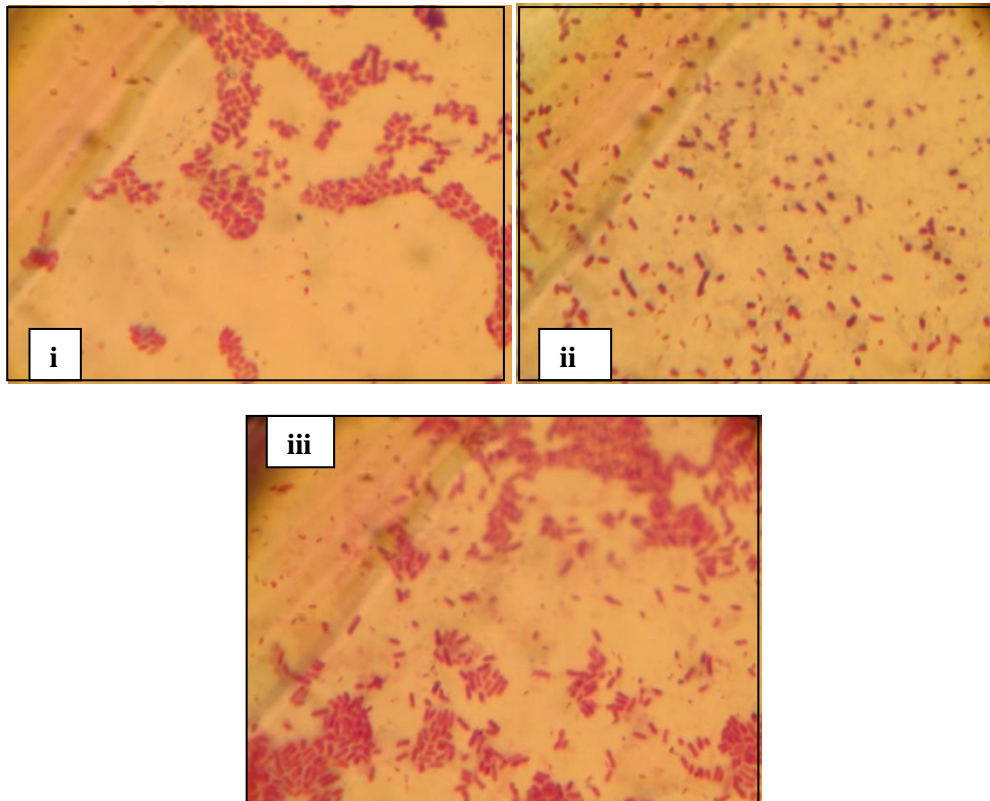
Les uropathogènes cultivés sur milieux Mac Conkey et EMB agar avaient un aspect arrondi, à contour régulier, catalase positive, Gram négatif en forme de tige, d'un diamètre variant entre 1 et 2 mm.

Toute fois, les colonies des isolats cultivés sur le milieu Chapman apparaissent souvent pigmentées et entourées d'un halo jaune suite à la fermentation du mannitol. Les colonies sont arrondies à bords réguliers de 1 à 2 mm de diamètre et Gram positive.

Par contre, aucune croissance n'a été observée sur le milieu Sabouraud-chloramphenicol **Figure III.9.a et b**



**Figure III.9.a** Aspect macroscopique des uropathogènes sur différents milieux de culture (a, b) MacConkey, (c) EMB, (d) Chapman



**Figure III.9.b** : Observation microscopique (Objectif X100) des isolats **(i)** BFN 02, **(ii)** CHN 01 et **(iii)** EHN 08

Tous les isolats ont démontré une réaction catalasique positive (présence de bulles au contact du  $H_2O_2$ ), et une oxydase négative.

- **Mannitol-Mobilité**

Ce milieu de culture permet d'étudier simultanément la fermentation du mannitol ainsi que la mobilité des germes. Tout les isolats ont pu fermenter le mannitol dont la fermentation de ce dernier a été constaté par un virage du milieu vers le jaune.

Concernant la mobilité, les isolats à caractère mobile ont diffusé à partir de la ligne d'ensemencement créant ainsi un trouble, on suspecterait *Escherichia coli* et *Proteus sp.* Alors que les bactéries immobiles se sont développées uniquement le long de la strie d'ensemencement.

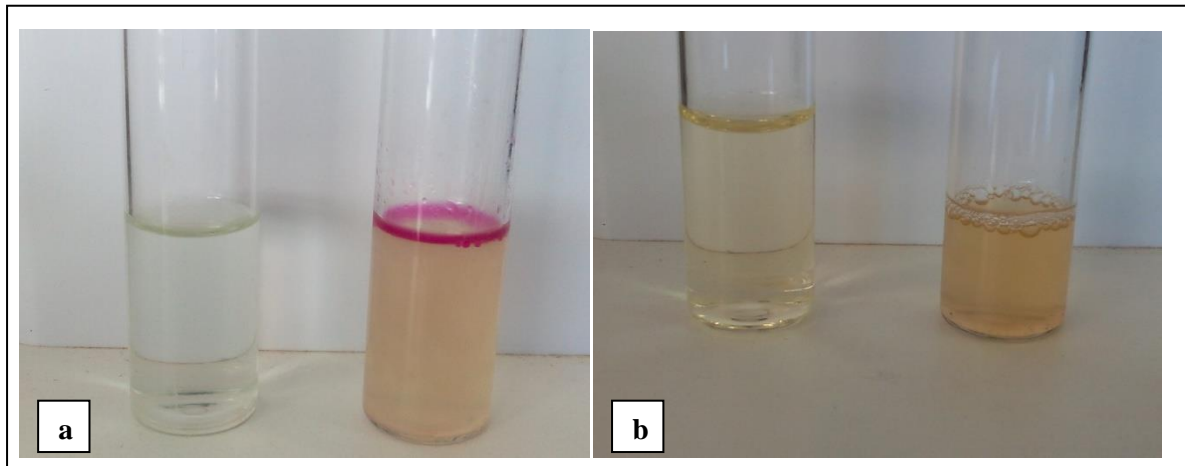
- **Utilisation du citrate**

35 isolats n'ont pas utilisé le citrate comme seule source de carbone, par contre le reste des isolats l'ont utilisé, se traduisant par l'entraînent d'une alcalinisation du milieu, d'où le virage de couleur du vert au bleu.

- **Production d'indole**

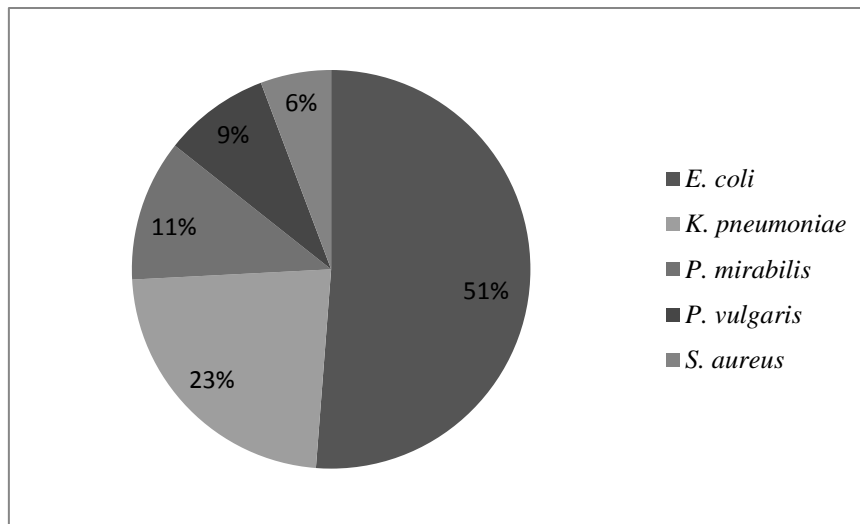
La présence d'indole se traduit par la formation d'un anneau rouge, après addition du réactif Kovacs (**Figure III.10**).

35 isolats ont dégradé le tryptophane en indole, elles sont donc indole positif. Alors que les autres isolats ont démontré un résultat négatif (indole négatif).



**Figure III.10** : Résultats du test d'indole (a) résultat positif (b) résultat négatif

Après différenciation sur les milieux de culture cités précédemment, ainsi que la série de tests biochimiques effectué, une première hypothèse a été suggérée en ce qui concerne l'identité des agents nuisibles, selon ce qui a été rapporté par la littérature **Bouyagoub et al., 2013, Rhazi Filali et al., 2012** Il a été constaté que *Escherichia coli* était l'agent causal de premier ordre avec un pourcentage de 51%, il s'agit du pathogène urinaire le plus souvent isolé, suivi de *Klebsiella pneumoniae* avec un pourcentage de 23%, *Proteus mirabilis* avec 11%, *Proteus vulgaris* avec 9%. Un autre agent infectieux impliqué dans cette pathologie, entre autre *Staphylococcus aureus* avec un pourcentage de 6% (**Figure III.11**).



**Figure III.11** : Répartition des uropathogènes isolés

#### 4. Antibiogramme

Une gamme d'antibiotiques a été choisie, Le profil de résistance des isolats testés contre ces antibiotiques a été effectué, ce qui est important dans notre étude est la recherche d'une éventuelle résistance, afin d'en retenir uniquement ceux exprimant ce caractère (résistance).

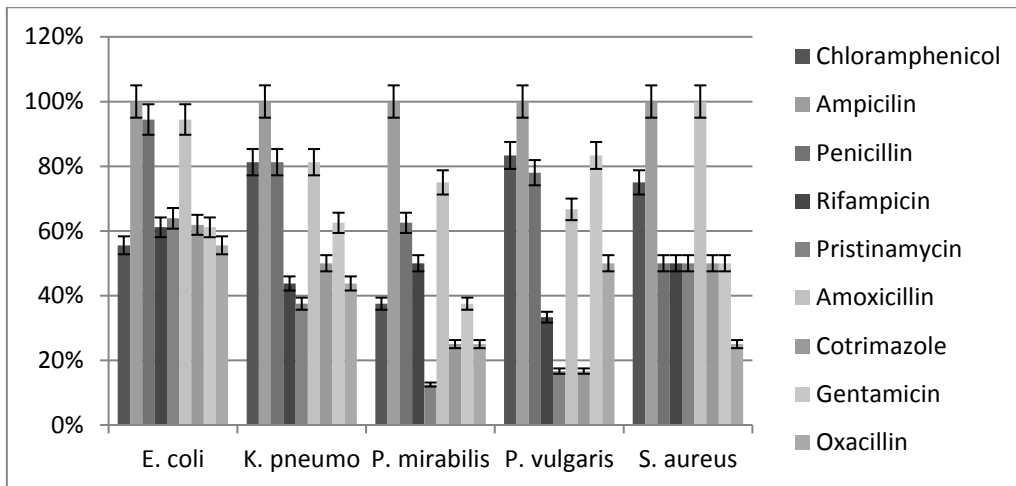
L'interprétation de cette antibiorésistance est faite selon le tableau de référence établi par le comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie.

Les résultats de l'antibiogramme des uropathogènes ont montré une forte résistance vis-à-vis de l'ampicilline (100%), cependant une résistance variée a été observée par rapport aux autres antibiotiques testés (**Figure III.12**).

Tous les isolats Gram négatif présentaient une forte résistance à la pénicilline (63% à 94%), l'amoxicilline (66,66% à 94%) Le chloramphenicol (38% - 83%) et la gentamicine (37,50% à 83,33%), mais ont été moins résistants vis-à-vis de l'oxacilline (25% à 55,55%) et la pristinaïmycine (12,50% à 63,88%). Cependant, *Staphylococcus aureus* a montré une forte résistance à l'amoxicilline (100%), au chloramphenicol (75%) et moins résistant à la pénicilline, à la raïfampicine, au cotrimazole, à la gentamicine (50%) et à l'oxacilline (25%).

D'une manière générale, en prenant le cas de l'amoxicilline et l'ampicilline qui ont montré une forte résistance, nous remarquons que nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Davis et al., 2011 ; Ferjani et al., 2010 ; Kumar Das et al., 2015**.

De même, pour les autres isolats d'entérobactéries que nous avons testées. Leur comportement à l'encontre des antibiotiques diffère, les isolats analysés présentent quelques fois des sensibilités ou des résistances qui sont en parfait accord avec les résultats rapportés par d'autres auteurs, et d'autres fois elles présentent une discordance.



**Figure III.12 :** Résultats de l'antibiorésistance des isolats uropathogènes.

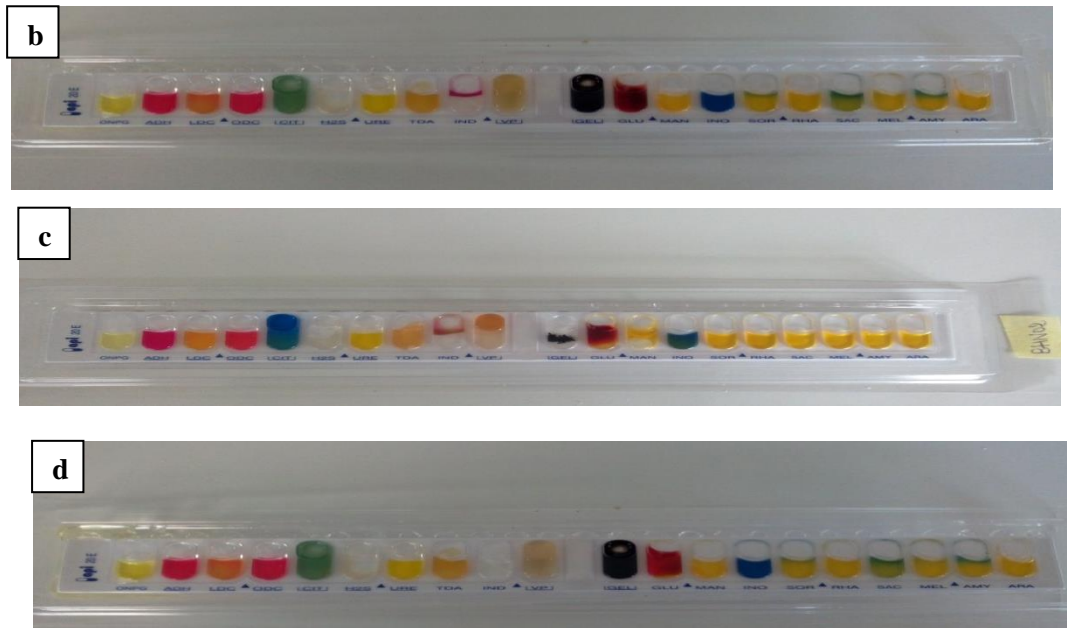
Suite au profil de la résistance aux antibiotiques, seulement 05 isolats ont été retenus BFN 01, MHU 03, EFU 03, MFU 05 et CFN 01. Ces isolats ont montré une résistance plus importante vis-à-vis des antibiotiques utilisés.

- **Galerie API 20 E**

L'identification des espèces ci-dessus a été effectuée et confirmée par le système du kit API 20<sup>E</sup> (**Figure III.13.a**) tel recommandé par le manuel de Bergy. On citera les résultats clés, nous avons identifié BFN 01 comme *E. coli* l'isolat qui est incapable d'utiliser le citrate comme source de carbone et ne peut pas produire d'uréase (**Figure III.13.b**), EFU 03 identifié comme *K. pneumoniae* et est VP positive (**Figure III.13.c**). Concernant *P. mirabilis* (MHU 03), il est incapable de produire de l'indole (**Figure III.13.d**), alors que *P. vulgaris* (MFU 05) qui a les mêmes caractéristiques que *P. mirabilis*, sauf le test d'indole, qui quant à lui est positif.

Ce sont les propriétés principales qui distinguent chaque germe par rapport aux autres espèces. Cependant, pour ce qui est de *Staphylococcus aureus* (CFN 01), nous avons utilisé le kit API Staph, qui a pour résultat clé le Mannitol qui est positif dans ce cas, démontrant ainsi l'espèce *aureus* (**Figure III.14**).





**Figure III.13 :** Résultats API 20<sup>E</sup> (a) Galerie témoin (b) BFN 01 (c) Résultats EFU 03  
(d) Résultats MHU 03



**Figure III.14 :** Résultats API Staph CFN 01

### III. Bactériocines

#### 1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne, screening et sélection des isolats

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

Tous les isolats lactiques ont été testés contre les 05 pathogènes sélectionnés précédemment.

La lecture des résultats a consisté en la mesure du rayon de la zone d'inhibition suite à la méthode des puits (AWDA, 1971) qui varie entre  $(13 \pm 0.00 \text{ mm})$  et  $(27 \pm 0.5 \text{ mm})$ .

Nous remarquons que les entérocoques et lactobacilles possèdent un spectre d'action élevé ; par contre, celui des Lactocoques est modéré alors que les Bifidobactéries ont un effet assez réduit.

Selon la littérature, les bactériocines des bactéries lactiques exercent une activité létale majoritairement sur les bactéries à Gram positif, en provoquant ou non leur lyse cellulaire. Le spectre d'activité est généralement plus large contre les pathogènes comme *Listeria*, *S. aureus*, *Clostridium sp* et *Bacillus sp* (Vignolo, 2000; Duquesne et al., 2007; Jasniewski, 2008).

Krishnendra et al. (2013) ont obtenus des résultats similaires, par contre Naderi et al. (2014), n'ont trouvé aucune activité antagoniste contre *K. pneumoniae*. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Selvamohan et al. (2010) à propos de l'activité de *Lactobacillus* contre *E. coli* ayant montré des zones d'inhibitions assez importantes. Les travaux de Kumar et al., (2013) et de Tambekar et al. (2009) sont également en accord avec les nôtres.

Nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par Zheng et al., 2015 concernant *Enterococcus* dont nos diamètres d'inhibitions étaient supérieurs à 15 mm contre les Gram + et -, comparativement aux travaux de Zheng et al., 2015 qui ne dépassent pas les 10 mm.

Pour ce qui est des Bifidobactéries, nous avons remarqué des zones d'inhibitions assez réduits de 10 mm voir même aucune inhibition, ce qui est en accord avec les travaux de Georgieva et al., 2015 dont les diamètres d'inhibitions des Bifidobactéries vis-à-vis d'*E. coli*.

Quant aux Lactocoques un effet modéré a été constaté, avec des zones d'inhibition variant entre 10 et 17 mm, ce qui est en accord avec les travaux de Enan et al., 2013. Cela dit Nehal et al., 2007 ont obtenu des diamètres bien plus important atteignant 27 mm contre *S. aureus*.

Après l'effet antagoniste des isolats lactiques, un antagonisme différé a été sujet de notre étude en utilisant cette fois ci le surnageant des isolats, afin de nous permettre de sélectionner uniquement les plus performants, ceux producteurs de bactériocines. Nous avons enregistré des diamètres de zones variant entre ( $10 \pm 0.00\text{mm}$  et  $25 \pm 0.5\text{mm}$ ), les isolats ayant montré une importante zone d'inhibition lors de l'antagonisme étaient les mêmes ayant démontré un effet inhibiteur en utilisant leurs surnageants.

Ramasamy et al., 2015, ont obtenu des résultats similaires aux nôtres, en ayant des Lactobacilles comme isolats lactiques performants, contres différentes souches uropathogènes.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Zheng et al., 2015, concernant les Enterocoques

Les études de **Makras et al., (2006)** ont montré une activité inhibitrice de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* par des bactéries lactiques, ceci a également été démontré par **Nigatu et al., (2015)**.

L'ensemble des interactions mises en évidence sont rassemblés dans le **Tableau III.3**.

**Tableau III.3:** Mise en évidence de l'activité antibactérienne

<i>Isolat</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>S.aureus</i>
LVM01	+	+	+	+	+
LVM02	+	-	+	+	+
LVM03	-	-	-	-	-
LVM04	-	-	-	-	-
LVM05	-	-	-	-	-
LVM06	-	-	-	-	-
LVM07	-	-	-	-	-
LVM08	-	-	-	-	-
LVM09	-	-	-	-	-
LVM10	-	-	-	-	-
LVM11	-	-	-	-	-
LVM12	-	-	-	-	-
LVM13	-	-	-	-	-
LVM14	-	-	-	-	-
LVM16	-	-	-	-	-
LVM17	-	-	-	-	-
LVM18	-	-	-	-	-
LVM19	++	+	++	++	++
LVM20	++	+	++	++	++
LVM21	++	+	++	++	++
LVM22	++	++	++	++	+++
LVM23	++	++	++	++	+++
LVM24	++	++	++	++	+++
LVM25	+	+	+	+	++
LVM26	+	+	+	+	++
LVM27	++	+	+	+	++
LVM28	++	++	+	+	++
LVM29	++	++	++	++	++
LVM30	+	+	++	++	++
LVM31	++	+	+	+	+
LVM32	+	+	+	+	+
LVM33	-	-	-	-	-
LVM34	-	-	-	-	-
LVM35	-	-	-	-	-
LVM36	-	-	-	-	-
LVM37	+	-	+	+	+
LVM38	+	-	+	+	++
LVM40	++	+	+	+	++
LVM41	++	+	+	+	++
LVM42	+	-	+	+	++
LVM43	+	+	+	+	++
MGM02	+++	+++	+++	+++	+++
MGM85	+++	++	+++	+++	+++
MVO95	+++	++	+++	+++	+++
LCM17	+++	+++	+++	+++	+++
LCM24	+++	+++	+++	+++	+++
LCM25	++	+	++	++	++
LCM26	++	+	+	+	++
LCM27	++	+	+	+	++

LCM28	++	++	++	++	++
LCM29	++	-	+	+	+++
LCM31	++	-	-	-	++
LCM32	-	-	-	-	-
LCM36	-	-	-	-	-
LCM37	-	-	-	-	-
LCM41	-	-	-	-	-
LCM42	-	-	-	-	-
LCM43	-	-	-	-	-
LCM44	-	-	-	-	-
LCM45	-	-	-	-	-
LCM46	-	-	-	-	-
LCM51	-	-	-	-	-
LCM53	-	-	-	-	-
LCM54	-	-	-	-	-
LCM65	-	-	-	-	-
LCM70	-	-	-	-	-
LCM71	-	-	-	-	-
LCM72	-	-	-	-	+
LCM73	+++	++	++	++	+++
LCM74	+++	++	++	++	+++
LCM75	++	+	+	+	++
LCM76	++	+	+	+	++
LCM77	++	+	+	+	++
LCM78	+	-	+	+	++
LCM80	++	-	+	+	+
LCM81	-	-	-	-	-
LCM82	-	-	-	-	-
LCM83	-	-	-	-	-
LCM84	-	-	-	-	-
LCM85	++	+	++	++	++
LCM90	-	-	-	-	-
LCM91	-	-	-	-	-
LCM92	-	-	-	-	-
LCM93	-	-	-	-	-
LCM95	-	-	-	-	-
LCM96	-	-	-	-	-
LCM97	-	-	-	-	-
LCM103	+++	++	++	++	+++
MVM15	+++	+++	++	++	+++
MVM17	+++	++	+++	+++	+++
MVM19	+++	+	++	++	+++
MVM20	+++	++	++	++	+++
MVM21	+	-	+	+	++
MVM22	-	-	-	-	-
MVM23	-	-	-	-	-
MVM24	-	-	-	-	-
MVM25	-	-	-	-	-
MVM26	-	-	-	-	-
MVM27	-	-	-	-	-
MVM28	-	-	-	-	-

MVM 29	-	-	-	-	-
MVM30	-	-	-	-	-
MVM31	-	-	-	-	-
MVM32	-	-	-	-	-
MVM33	-	-	-	-	-
MVM34	-	-	-	-	-
MVM35	-	-	-	-	-
MVM36	-	-	-	-	-
LCM01	+	+	+	+	++
LCM02	+++	+++	+++	+++	+++
LCM04	+++	++	++	++	+++
LCM05	+	+	+	+	++
LCM06	-	-	-	-	-
LCM07	-	-	-	-	-
LCM09	-	-	-	-	-
LCM11	-	-	-	-	-
LCM13	-	-	-	-	-
LCM16	-	-	-	-	-
LCM18	-	-	-	-	-
LCM21	+	-	+	+	+
LCM22	+++	++	+++	+++	+++
LCM30	-	-	-	-	+
LCM33	-	-	-	-	+
LCM35	-	-	-	-	-
LCM38	-	-	-	-	-
LCM40	-	-	-	-	+
LVOM11	++	++	++	++	+++
LVOM12	++	++	+	+	+++
LVOM19	+	+	++	++	+++
LVOM20	+	+	+	+	++
LVOM28	++	+	+	+	++
LVOM30	++	+	+	++	++
LVOM31	++	+	++	++	+++
MGM03	+++	+++	+++	+++	+++
MGM08	+	+	+	+	++
MGM10	+	+	+	+	++
MGM12	+	+	+	+	++
MGM14	+	-	+	+	+
MGM17	+	+	+	+	+
MGM23	++	+	+	+	++
MGM24	++	++	+	+	+
MGM25	+	+	+	+	++
MGM27	+	+	+	+	++
MGM31	-	-	-	-	+
MGM32	-	-	+	+	+
MGM37	-	-	+	+	+
MGM39	+	+	+	+	++
MGM42	-	-	+	+	+
BSN02	+	+	+	+	++
BSN05	+	-	-	-	+

+++ : >25mm

++ : >20mm

+ : >15mm

- : Aucune zone d'inhibition

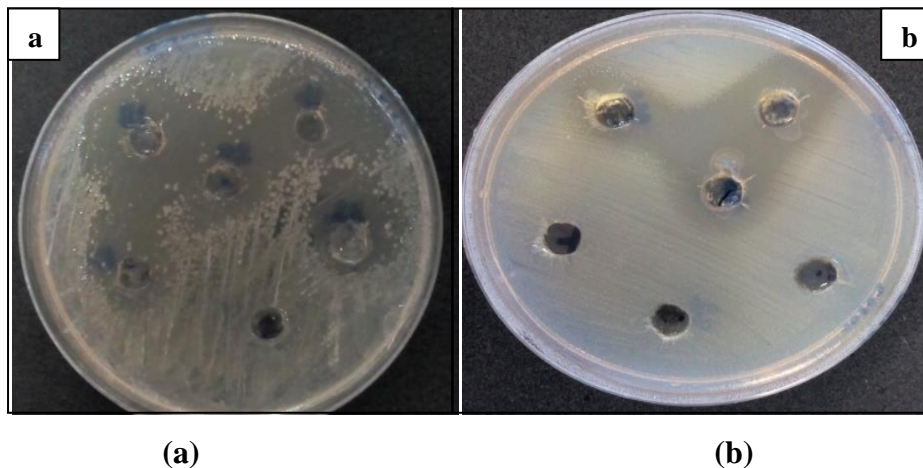
La présence d'une zone d'inhibition n'est pas essentiellement due à la production de bactériocines (**Figure III.15.a**). Cette inhibition peut avoir plusieurs origines parmi lesquelles, la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène, de phages et/ou de bactériocines (**Navarro et al., 2000; Rodriguez et al., 2002; Maldonado et al., 2003; Todorov et Dicks, 2005**).

Cette résistance peut résulter probablement de modification de la composition de la membrane bactérienne, la destruction moyenne de la bactériocine par les protéases ou les récepteurs modifiés (**Martinez et De Martini, 2005**).

Vu que l'objectif de cette thèse s'inscrit dans le cadre de la recherche particulière des bactériocines, nous sommes donc amenés à nous assurer de la nature exacte de l'agent inhibiteur, par le biais d'enzymes. Ceci nous permettra d'avoir une certaine orientation et aussi de vérifier si les inhibitions préalablement obtenues sont dues ou non à l'action des peptides antimicrobiens (bactériocines).

Après traitement avec les différentes enzymes protéolytiques, nous pouvons détecter l'agent inhibiteur de nature protéique, et ce après la diffusion en puits du surnageant traité, ce qui ne donnera aucun halo (**De vuyst, 2000; Aslim et al., 2005**).

Seulement à ce moment là nous pourrions dire que les métabolites secrétés responsables de ces inhibitions ne sont autres que les bactériocines (**Figure III.15.b**).



**Figure III.15 :** Effet antibactérien de quelques isolats lactiques performants  
(a) Effet du surnageant sur *E. coli* (b) Effet des enzymes sur la détection des bactériocines



Pour le test de l'ADH, toutes les souches sont ADH positive donc capables d'utiliser l'arginine. Pour la dégradation de l'esculine le résultat est négatif (**Figure III.16**), par contre les isolats sont VP positif.

Concernant le profil fermentaire, 03 isolats sont ribose négative. 03 isolats sont inuline négative, 03 isolats sont raffinose positive, 02 isolat sont sorbitol négative. 02 isolats sont sorbitol positive.

Tous les isolats sont  $\alpha$ -galactosidase négative et 8 d'entres eux sont arabinose positive. Les résultats de la fermentation en utilisant la galerie API 20 Strept, ont permis l'identification des espèces. Les résultats de la **Figure III.16**, indiquent le profil de fermentation des hydrates de carbones. Après comparaison des résultats, avec les travaux de **Carr et al., (2002)**, **Axelsson (2004)** et **Hammes et Hertel (2006)**. Les isolats sont des espèces suivantes : Tous les Enterocoques étaient *Enterococcus faecium* et 04 isolats *Lactococcus lactis*.



**Figure III.16** : Résultats de l'API strept

- **Mesure du pH et l'acidité Dornic**

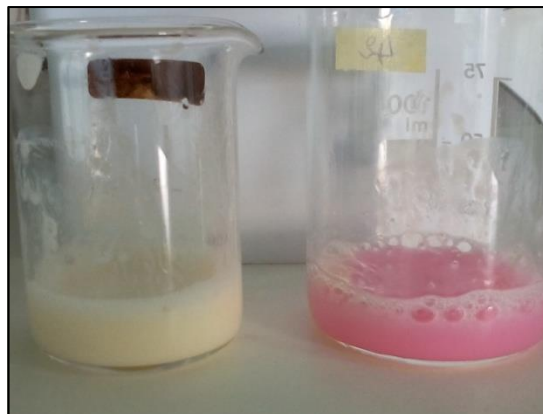
L'évolution du pH et de l'acidité a été étudiée simultanément, lorsque le pH diminue, l'acidité augmente. Les isolats MGM 02, MGM 85, MVO 95, LCM 17, LCM 24, LCM 73, LCM 103, MVM 15, MVM 17 et MVM 19 ont été les plus acidifiés contrairement à LCM 74, avec des valeurs de pH comprises entre 4,50 et 5,08 (**Tableau III.5**).

Nos isolats lactiques ont été considérés comme étant des producteurs d'acide plutôt modérés (**Figure III.17**).

**Mami et al., (2014)** ont obtenu environ des résultats similaires, à l'exception de *Lactobacillus* qui produisaient plus d'acide lactique. **Kivanç et al., (2011)** ont également trouvé des isolats producteurs d'acide modérés du Boza. En outre, les travaux de **Katina et al., (2002)** **Guetouache et al., 2015** ont pu obtenir des souches isolées plus acidifiées allant jusqu'à 100 ° D.

**Tableau III.5** : Evolution du pH et l'acidité dans le temps

Isolats	Initial		Final	
	pH	Acidité °D	pH	Acidité °D
MGM 02	6.5	1.0	4.50	50
MGM 85	6.5	1.0	4.50	50
MVO 95	6.5	1.0	4.50	50
LCM 17	6.5	1.0	4.50	50
LCM 24	6.5	1.0	4.50	50
LCM 73	6.5	1.0	4.50	50
LCM 103	6.5	1.0	4.50	50
MVM 15	6.5	1.0	4.50	50
MVM 17	6.5	1.0	4.50	50
MVM 19	6.5	1.0	4.50	50
LCM 74	6.5	1.0	5.08	19
MVM 20	6.5	1.0	5.07	20
LCM02	6.5	1.0	5.01	28
LCM 04	6.5	1.0	4.75	40
LCM22	6.5	1.0	4.88	46
MGM 03	6.5	1.0	5.06	23



**Figure III.17** : Titrage de l'acidité dornic

- **Cinétique de croissance**

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielles et au début de la phase stationnaire de croissance (**Kouakou et Thonart, 2011**). Vu qu'elles peuvent par la suite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture (**Savijoki et al., 2006**). C'est pourquoi elle nécessite la connaissance de la cinétique de croissance.

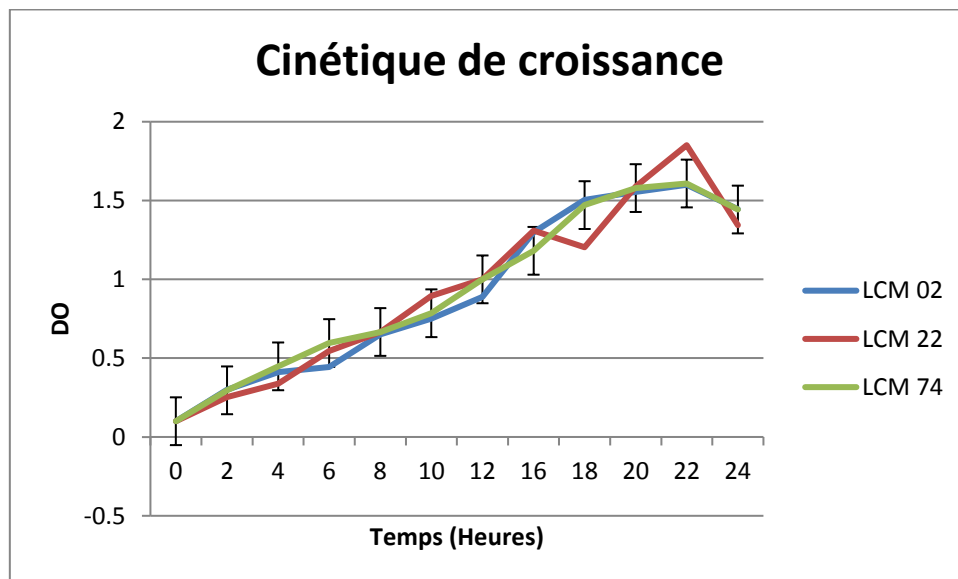
Dans cette étude, nous avons bien évidemment utilisé le milieu MRS comme témoin afin de nous situer par rapport aux modifications ultérieures. **Figure III.18**

Généralement, nous remarquons 3 à 4 phases selon les milieux :

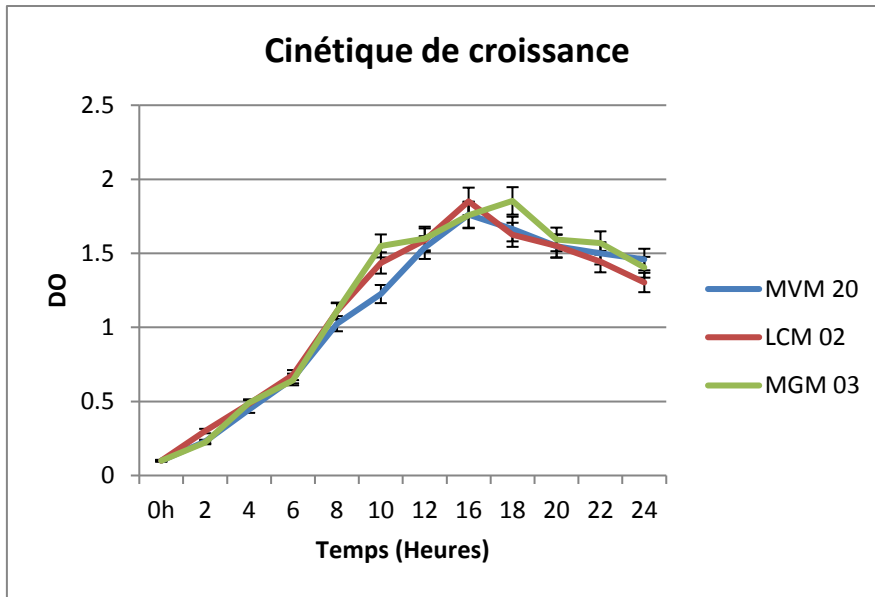
- Phase de latence : de 0 à 10 heures d'incubation, est observé pour toutes les souches lactiques.
- Phase exponentielle : elle est atteinte après 2h d'incubation pour toute les souches et est achevée à 16h pour la souche MVM 22, à 18h pour LCM 03 et MGM 85 et à 20h pour LCM 17.
- Phase stationnaire : cette phase débute à 16h pour la souche MVM 20, à 18h pour LCM 103 et MGM 85 et à 20h pour LCM 17.

Il est à noté que la phase de latence était assez longue en raison de la difficulté d'adaptation en milieu de culture.

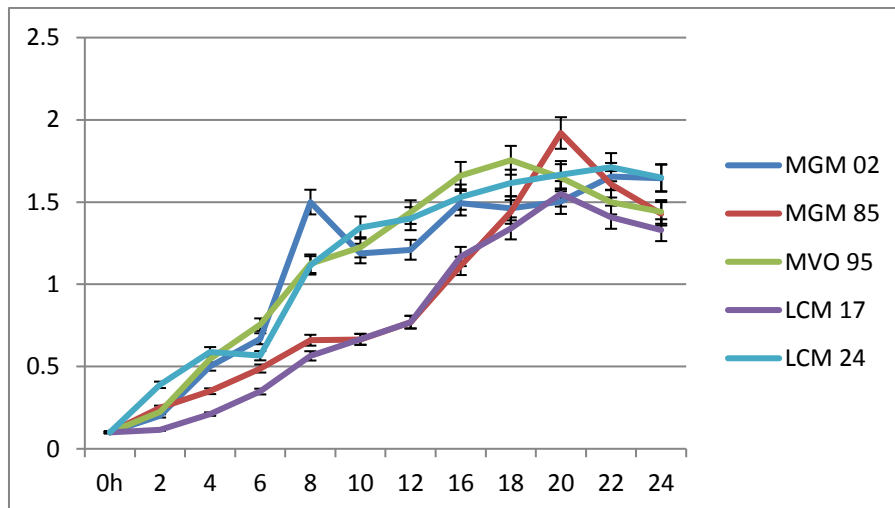
Néanmoins, une excellente croissance a été notée pendant la phase exponentielle avec une  $DO > 1$  (**Figure III.18 a, b et c**), ce qui explique la présence des nutriments nécessaires à la sécrétion et à la production de métabolites antimicrobiens, qui sont les principaux acteurs responsables des inhibitions une fois en interaction avec les uropathogènes (**Bouguetoucha et al., 2011**).



**Figure III.18.a : Cinétique de croissance des Lactocoques**



**Figure III.18.b : Cinétique de croissance des Lactobacilles**



**Figure III.18.c : Cinétique de croissance des Enterocoques**

- **Estimation de la quantité de bactériocines produites**

L'estimation de la quantité de bactériocine produite, permet d'avoir une idée sur sa concentration qui est estimée en unité arbitraire par ml de surnageant de culture de la souche bactériocinogène.

Pour cela, la méthode de dilution critique décrite par **Pucci et al., (1988)** rapporté selon **Yanagida et al. (2005)** a été utilisée.

Selon **Parente et al., (1994)**, le calcul de la quantité de bactériocine produite est donné par la formule suivante :

$$\text{AU/ml} = (1000/d)*D$$

d : est le volume mis dans les puits

D est le facteur de dilution.

La quantité de bactériocine maximale a été produite par l'isolat MGM 85 estimé à 4000 AU/ml de surnageant de culture.

Nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par **Abdelhadi et al., 2016**, où l'isolat producteur maximal de bactériocine a révélé une quantité de 2560 AU/ml.

Pour ce qui est des isolats MGM 02, MVO 95, LCM 17, LCM 24, LCM 73, LCM 103, MVM 15, MVM 17 et MVM 19, la quantité de bactériocine produite a également été importante, variant entre 2500 et 3200 AU/ml.

Par contre, les isolats LCM 02, LCM 22, LCM 74, MVM 20, LCM 02 et MGM 03 ont montré une production de bactériocines modéré estimé entre 1700 et 2100 AU/ml.

Les résultats obtenus par les Lactobacilles (LCM 02, LCM 22et LCM 74) sont supérieurs à ceux obtenus par **Benmouna et al., 2007**, où la bactériocine productrice de bactériocine a été estimé à 1250 AU/ml.

Chaque bactériocine produite est caractérisée par sa propre concentration ayant la capacité de produire dans un milieu défini. Cette quantification dépend également de la sensibilité de l'isolat pathogène, l'utilisation d'une souche plus sensible, comme les Gram positif permettent d'apprécier cette quantité d'une façon considérable. Pour notre part, chaque condition permet de produire une quantité de bactériocine d'une façon variable, sachant que la majorité de nos isolats étaient Gram négatifs, en plus du fait qu'ils ont été isolés à partir d'échantillons cliniques et ayant montré la plus forte résistance vis-à-vis des antibiotiques utilisés.

## 2. Optimisation du milieu de culture

La lecture des résultats consiste comme toujours en la mesure du diamètre de la zone d'inhibition de nos isolats lactiques.

Toutefois, la production de métabolites au cours de sa croissance est fortement influencée par la concentration des sources de carbone et d'azote, en plus des facteurs de croissance qui sont principalement la souche productrice, le temps d'incubation, la température, le pH et la composition du milieu.

- **Effet de la source d'azote**

Certaines sources d'azote agissent seulement sur la croissance de la souche bactérienne alors que d'autres agissent sur la production de bactériocines. Le milieu MRS additionné d'extrait de levure permet une bonne croissance, cependant cette biomasse n'est pas une production maximale de bactériocine.

Afin de tester l'effet de la source d'azote, nous avons changé l'ingrédient de cette source, elle est de 2% dans tous les cas, le milieu MRS contient 2 % de source d'azote. Les résultats obtenus sont montrés dans la **Figure III.19**.

La croissance de l'isolat MGM 85 qui est la souche la plus productrice dans un milieu contenant 2% de tryptone ou 2% d'extrait de viande comme seule source d'azote, a montré une croissance stationnaire ou ordinaire, comme celle observée en milieu MRS utilisé comme contrôle ou témoin avec un halo de 20 mm de diamètre. Par contre, la production de MGM 85 en milieu contenant 2% d'extrait de levure comme seule source d'azote, est assez élevée avec un halo d'inhibition atteignant les 28 mm ainsi qu'une densité optique qui a pu atteindre 2 en phase exponentielle.

Le milieu MRS permet une bonne croissance des souches LCM 103, MGM 02, et LCM 17, avec des halos variant entre 22 et 25 mm, mais cette biomasse ne concorde pas avec une production maximale de bactériocine par rapport au milieu additionnée d'extrait de levure qui a donné une bonne croissance et une inhibition importante des souches pathogènes.

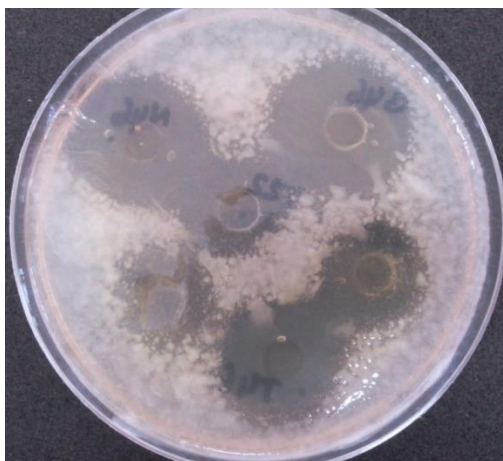
Les isolats MVO 95, LCM 24, LCM 73, MVM 15, MVM 17, MVM 19, LCM 22, LCM 74, MVM 20, LCM 02 et MGM 03 ont également montré une bonne production en présence de 2 % d'extrait de levure, avec des zones d'inhibitions contre les uropathogènes variant entre 15 et 25 mm, ce qui a été confirmé par les travaux de **Biswas et al., (1991)**, qui ont constaté que la production de bactériocine par *Pediococcus acidilactici H*, dans le milieu MRS, est moins importante par rapport aux autres milieux alors que la croissance

est conséquente.

La DO des souches en milieu additionnée de 2.5% d'extrait de levure, est assez élevée ainsi que la production de bactériocine qui est importante (**Figure III.20**). Des résultats similaires ont été observés par plusieurs chercheurs qui ont indiqué que l'extrait de levure permet une bonne croissance et une production maximale de bactériocine. Ce qui a également été observé par **Mollendorff et al., (2009)** dans le cas des souches de *Lactobacillus* JW3BZ, JW6BZ et JW15BZ.

Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs chercheurs qui ont indiqué que l'extrait de levure permet une bonne croissance. Ce dernier résultat a été observé par **De Vuyst et al (1996)**, en cultivant *Lactobacillus amylovorus* dans un milieu MRS contenant 4,4% d'extrait de levure. Ce fut le cas également pour tout le reste des isolats.

Les mêmes observations ont été rapportées par **Mahrous et al., 2013** où les isolats de *Lactobacillus sp* ont montré une importante croissance en présence de 2% d'extrait de levure comme seule source d'azote.



**Figure III.19** : Effet antibactériens des surnageants de MGM 85 cultivé dans différentes sources d'azotes vis-à-vis d'*E. coli*

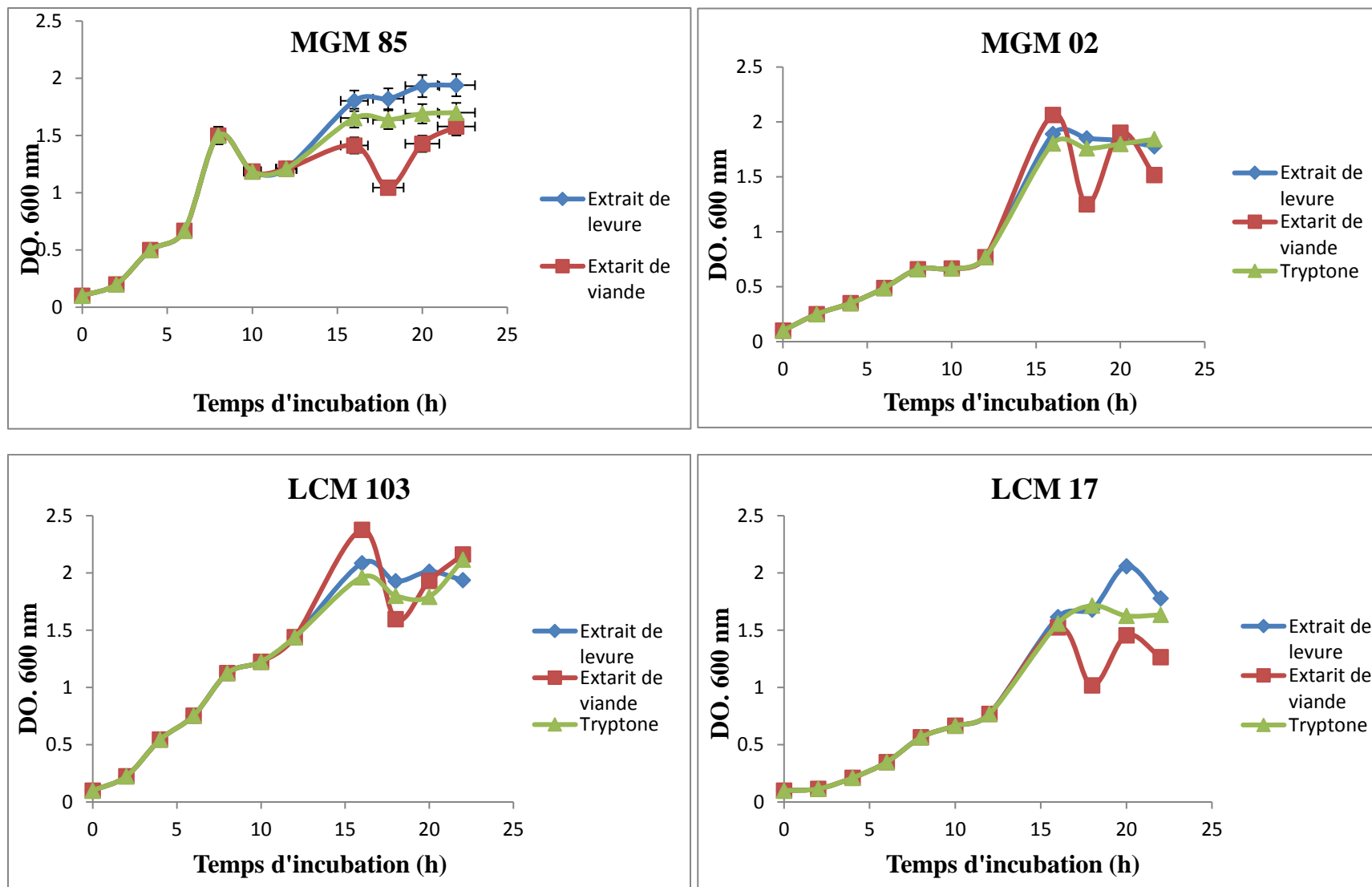


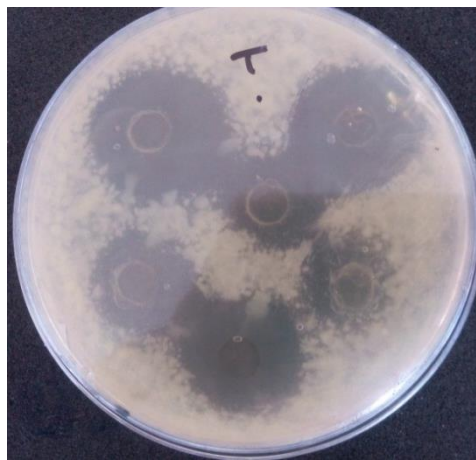
Figure III.20: L'effet de source d'azote sur la croissance des bactéries lactiques.

- **Effet de la source de Carbone**

Le glucose est un constituant du milieu MRS, un sucre simple en sa composition semblerait-il être le plus utilisé par les bactéries lactiques intervenant ainsi en leur croissance.

Afin de vérifier l'effet de la source de carbone, le glucose a été substitué par différents sucres : le maltose, le lactose et le saccharose. Ces sucres sont utilisés avec le MRS modifié de la précédente étape à raison de 2%.

L'effet de la source de carbone sur la croissance de l'isolat le plus performant MGM 85 et sa production de bactériocine sont montrés sur la **Figure III.21**.



**Figure III.21** : Effet antibactériens des surnageants de MGM 85 cultivé dans différentes sources de carbone vis-à-vis d'*E. coli*

La croissance dans les milieux contenant le glucose, lactose et le maltose comme seule source de carbone est optimale contrairement au milieu contenant le saccharose. La production de bactériocine est la plus importante en milieu contenant 2% de glucose; ceci est reflété par le diamètre de la zone d'inhibition qui est de 22 mm. La croissance des souches LCM 103, MGM 85 et LCM 17 dans le milieu contenant le glucose reste la meilleure par rapport aux milieux contenant le maltose, lactose, fructose et saccharose, comme seule source de carbone. La souche MGM 22 a été marquée par l'importante croissance dans le milieu contenant le lactose par rapport aux autres sources de carbone.

En milieu MRS modifié contenant le saccharose comme seule source de carbone, la production de bactériocine par la souche MGM 85 est assez faible, un halo de 15 mm a été

entregistré, c'est aussi le cas des autres isolats lactiques avec un diamètre d'inhibition inférieur à 13 mm.

Quant au lactose, il diminue la production de bactériocine par rapport au glucose dans le milieu (DO de 1), ceci est probablement dû à la forte diminution du pH dans le milieu avec une importante production d'acides en utilisant ce substrat.

Nos résultats sont en accord avec ceux observés par **Todorov et Dicks (2005a)** pour lequel l'emploi de 2% de glucose permet une bonne production de bactériocine de 6400 AU/ml par rapport à l'emploi de 2% de maltose.

Selon **Todorov (2008)**, une production de 12800 AU/ml dans le MRS contenant 2% de glucose (20 g/l), et cette production est doublée en présence de 30 g/l, alors que l'emploi de lactose comme seule source de carbone dans le milieu, réduit de 75% (1600 AU/ml) la production de bactériocine par *Lactobacillus plantarum*.

Par ailleurs, une autre étude où l'emploi de 5 à 10 g/l de saccharose augmente la synthèse de la bactériocine produite par *Enterococcus faecium* ce qui n'est pas le cas de nos isolats, où l'on remarque une diminution de production en vue de l'utilisation du saccharose (**Todorov et Dicks, 2005b**).

Ces résultats sont constatés par plusieurs chercheurs toujours en présence de 20g/l de glucose.

En effet, **Mataragas et al., (2004)** ont observé une production maximale de bactériocines produites par *Leuconostoc mesenteroides* L124 et *Lactobacillus curvatus* L442. Ce même résultat a été observé par **Pal et al., (2010)** dans le cas de *Weissella paramesenteroides* DFR-8.

Les mêmes résultats ont également été rapportés par **Zamfir et al., 2016**, où il a été mis en évidence la présence du glucose comme seule source de carbone additionné au milieu MRS modifié, en réalisant une activité antibactérienne importante suite à la production de bactériocine en quantité élevée.

Nous pouvons donc conclure que le glucose à 2% constitue la meilleure source de carbone pour nos isolats.

- **Effet de la source de potassium**

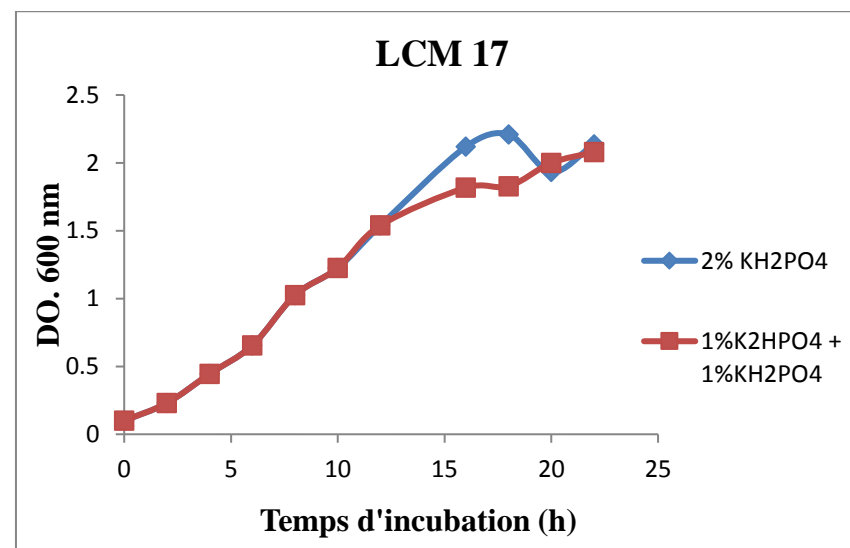
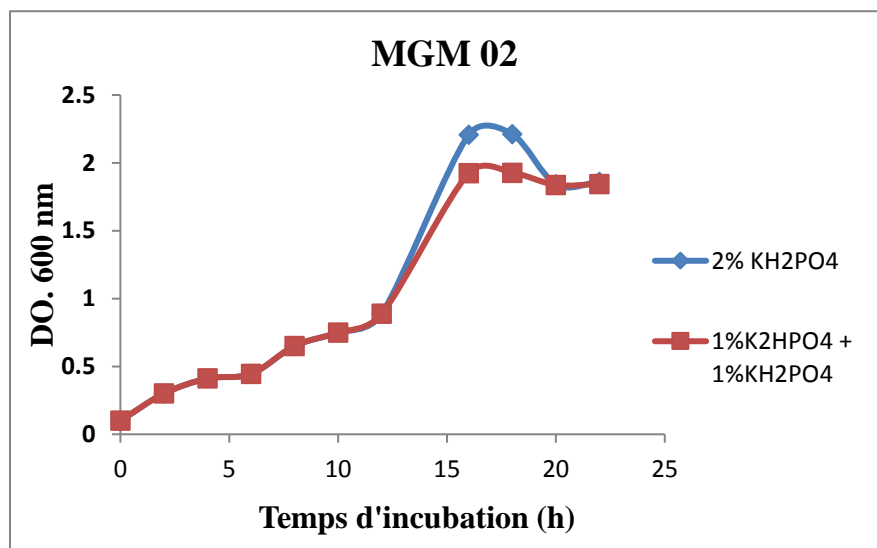
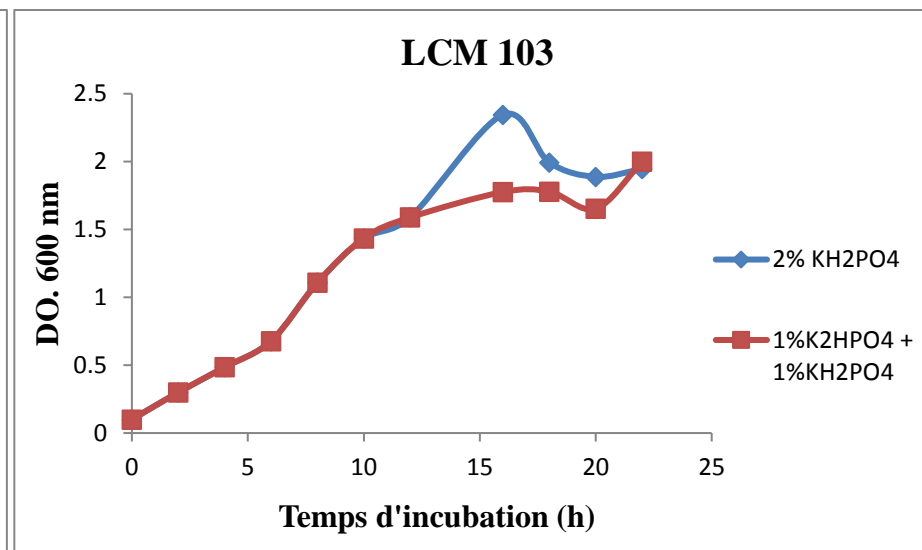
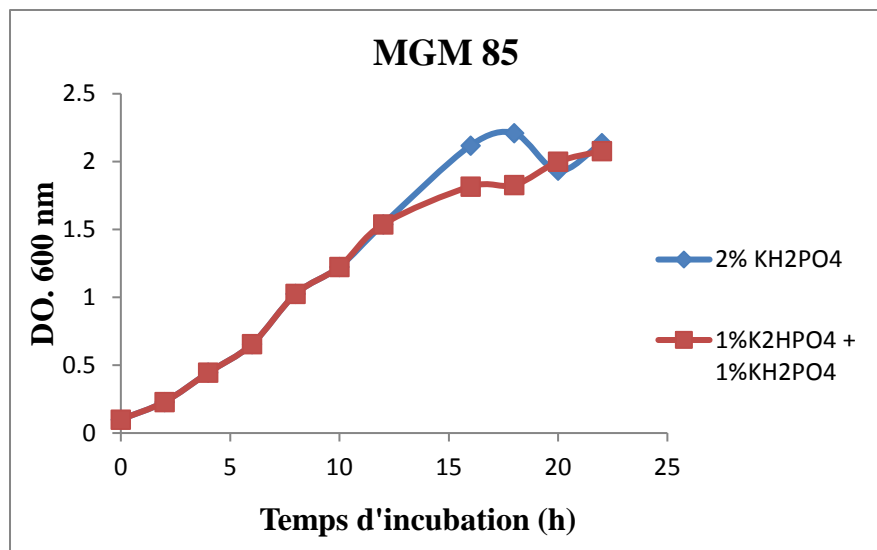
L'effet de la source de potassium sur la production de bactériocine a été rapporté par plusieurs auteurs (**De Vuyst et Vandamme, 1993 ; Todorov et Dicks, 2005 ; Mollendorff et al., 2009 ; Lim, 2010**).

Sur la base de la composition du MRS sachant qu'il contient 2 g/l de  $K_2HPO_4$ , cette concentration indique que les bactéries lactiques ont besoin de cette source pour leur développement. Pour l'étude de l'effet de la source de potassium sur la production de bactériocine, nous avons repris les travaux de **Mollendorff et al., (2009)**.

La croissance de la souche MGM 85 est la plus importante en milieu contenant 2% de  $K_2HPO_4$  (DO de 1,9). Une DO de 1,8 est enregistré dans les milieux contenant 1% de  $K_2HPO_4$  et 1% de  $K_2HPO_4$  + 1% de  $KH_2PO_4$ , alors qu'elle est plus faible en présence de 2% de  $KH_2PO_4$  (0,9). Une DO de 1,7 est obtenue dans le milieu contenant 0,2% de  $K_2HPO_4$  (**Figure III.22**).

La croissance des souches LCM 103 et LCM 17 est importante en milieu contenant 2% de  $K_2HPO_4$  par rapport aux autres milieux utilisés. Par contre pour la souche MGM 02 qui a donné une croissance importante en milieu contenant 1%  $K_2HPO_4$  + 1%  $KH_2PO_4$  par rapport aux autres milieux.

Le milieu contenant 2% de  $K_2HPO_4$  comme source de potassium permet une production maximale de la bactériocine, ceci est reflété par le diamètre de l'halo d'inhibition. **Kim-Hi (2005)** a observé que la production de la micrococcine GO5 par *1Micrococcus* sp GO5 est huit fois plus importante dans un milieu contenant 2 à 2.5 % de  $K_2HPO_4$  que dans un milieu contenant 0.2% de  $K_2HPO_4$ .



**Figure III.22 :** Effet de la source de potassium sur la croissance des isolats lactiques.

- **Effet de la modification de la température d'incubation et pH**

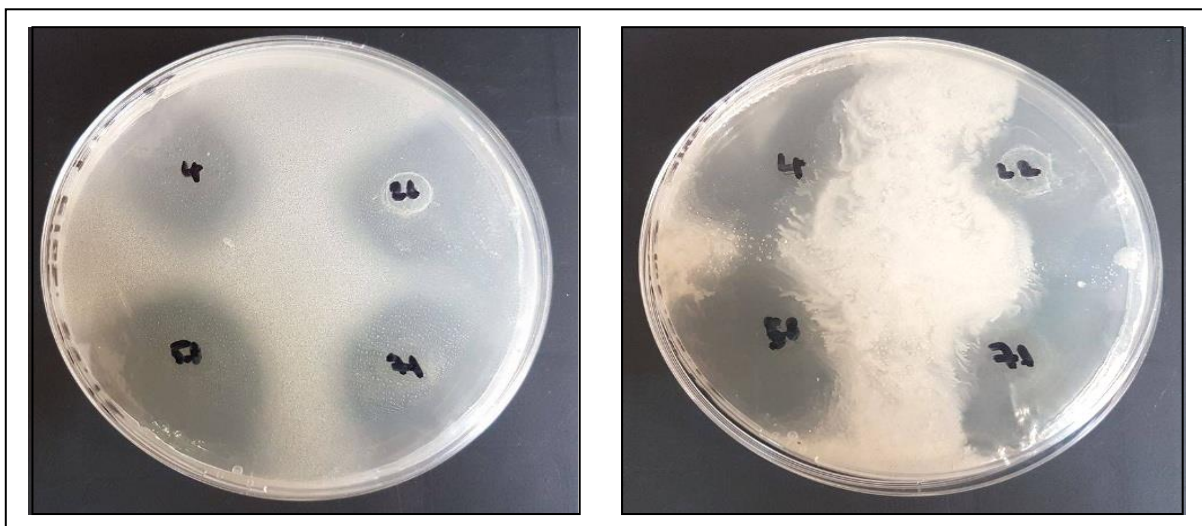
La température d'incubation est un paramètre important qui doit être maîtrisé pour la croissance et la production de la bactériocine. Ce paramètre a fait l'objet de plusieurs études, qui ont montré que la température de production des bactériocines est souvent inférieure à la température optimale de croissance (**Krier et al., 1998**).

Dans notre cas, nous avons testé les températures (25, 30 et 37°C). La production de la bactériocine semble être identique aux températures 25, 30 et 37°C, en effet des zones d'inhibition de 19 à 22 mm sont observées. Cependant, à température 25°C l'effet inhibiteur est plus faible (15 mm) (**Figure III.23**).

Les bactériocines répondent différemment à ces mêmes températures, comme ce fut le cas par celle décrite par **Lim (2010)** et produite par *Lactobacillus plantarum* qui ne montre aucune activité à température 25°C contre *Staphylococcus aureus*, mais qui est très active à 30°C.

La température et la période d'incubation sont d'importants facteurs pour la croissance des bactéries lactiques et affecte de manière significative les quantités de métabolites produites (**Dalie et al., 2010**).

Pour ce qui est du pH, nous avons constaté une meilleure croissance et production à pH 7, ce qui est en accord avec **Blom et al. (1999)** qui ont remarqué une meilleure production dans un milieu de pH 7.



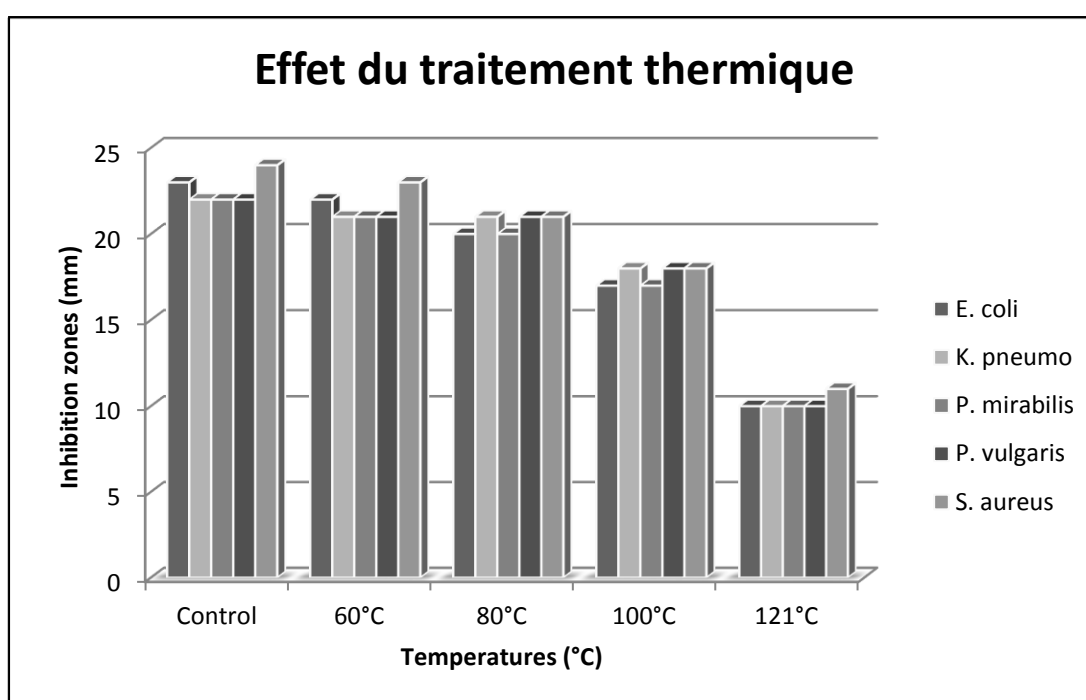
**Figure III.23** : Effet de la température sur les isolats lactiques.

### III.3. Propriétés physico-chimiques des bactériocines

- **Effet de la température et du pH**

Afin de définir les propriétés physico-chimiques des bactériocines, nous avons étudié leur stabilité thermique en traitant le surnageant aux différentes températures allant de 0°C à 121°C pendant 15 minutes avant d'être examiné pour leur activité antimicrobienne.

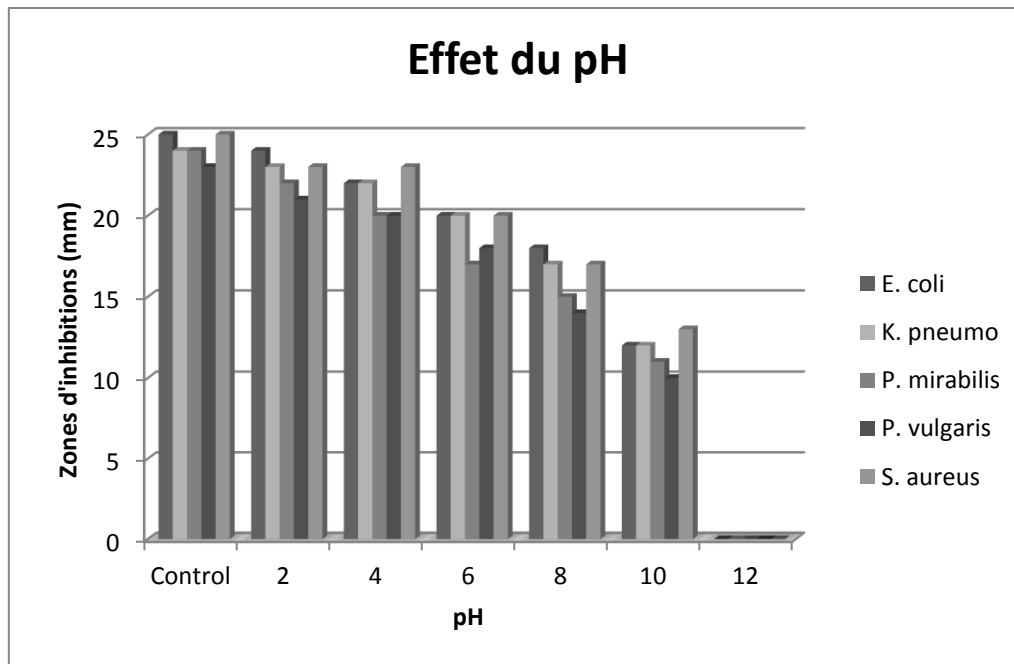
L'effet de la température sur l'activité de bactériocine a été déterminé par diffusion en puits vis-à-vis des uropathogènes. Le composé inhibiteur produit par les isolats lactiques a été considéré comme thermostable. L'activité demeure constante après chauffage à 121°C pendant 15 minutes (**Figure III.24**).



**Figure III.24** : Effet du traitement thermique des bactériocines

L'effet du pH sur l'activité des bactériocines a également été étudié en ajustant les valeurs du pH de 2 à 12 et les surnageants ont été testé pour l'activité antimicrobienne en mesurant les zones d'inhibitions.

Les bactériocines produites par nos isolats lactiques étaient stable à pH 2 à 12 après incubation, ceci dit la production a été meilleur acide plus particulièrement pH = 2 (**Figure III.25**).



**Figure III.25** : Effet du pH sur les bactériocines

Selon les travaux de **Klaenhammer, 1988**, les bactériocines sont des peptides antibactériens qui doivent avoir un optimum de stabilité, de solubilité et d'activité à pH acide, ce qui a été vérifié et prouvé par nos résultats.

Elles sont généralement inactivées par les protéases, thermostables, thermorésistantes et supportent différentes variations de pH de 2 à 10 (**Parada et al., 2007**).

Les bactériocines ne sont généralement actives que contre les bactéries à Gram positif, et ce en raison de leur action sur la membrane cellulaire. Cependant, en situation de stress (pH bas, stress au sel...), certaines bactéries à gram négatif deviennent sensibles à leurs action (**Labioui et al., 2010**).

- **Effet des sels inorganiques**

Différentes concentrations de NaCl et KCl ont été utilisées afin d'étudier l'effet des sels inorganiques sur l'activité des isolats bactériocinogènes.

Il a été constaté une augmentation d'activité de la bactériocine en parallèle avec l'augmentation de la concentration du NaCl.

Nous avons observé la tendance plus ou moins semblable en traitant le surnageant avec différentes concentrations en KCl. Les bactériocines ont montré l'activité la plus élevée en présence du KCl à 3% contre les Uropathogènes.

Les isolats traités par le SDS (détergent anionique) et le Triton X-100 (détergent non ionique) ont donné des zones d'inhibitions variant entre 12 et 17 mm, La plantaricine C19 agit de la même manière face au traitement par le SDS et Triton X-100 (**Atrih et al., 2001**), cependant les bactériocines HA-6111- 2 et HA-5692-3 ne sont pas affectées par le SDS mais perdent leur activités suite au traitement au Triton X-100 à raison de 1%, (**Albano et al., 2007**).

Nos isolats ne sont pas affectés par les traitements au tween 20 (détergents non ionique), et l'EDTA, suite aux importantes zones d'inhibitions enregistrées comparativement aux témoins (tween 20 et EDTA seuls).

Selon les travaux de **Kumari et al. (2011)**, ils justifient ce résultat par le fait que ces détergents n'ont pas causé la dissociation de la bactériocine ou alors des agrégats qui font perdre l'activité bactériocinogénique n'nt pas été provoqué.

Nos résultats sont en accord avec plusieurs auteurs, comme le cas de, la bozacine 14, la mesentericine ST99, la bactériocine ST15, la bactériocine AMA-K, la bactériocine produite par la souche LR/6, la bactériocine R1333 et les bactériocines SD1, SD2, SD3 et SD4 (**Ivanova et al., 2000, Todorov et Dicks 2004, De Kwaadsteniet et al., 2005, Todorov et al., 2007, Todorov et al., 2010, Kumar et al., 2010 et Schirru et al., 2012, philip et al., 2015**) ayant montré une résistance face à ces surfactants.

Ces agents permettent de séquestrer les ions magnésium des lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram- permettant ainsi aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (**Rodgers, 2004; Deegan et al., 2006; Gálvez et al., 2007**).

#### **III.4. Caractérisation des bactériocines**

- **Extraction par solvants**

L'extraction des bactériocines a été réalisée dans un premier temps par des solvants, à savoir le chloroforme et le diether éthyl (**Figure III.26.a**). Ce qui a attiré notre attention sur la séparation a bien évidemment été le chloroforme (**Figure III.26.b**). Nous pouvons observer les différentes phases ou la partie censée contenir les bactériocines et celle du milieu entre la phase aqueuse et celle du solvant, et ce vu le caractère amphiphile des peptides antimicrobiens.



**Figure III.26.a** : Extraction par le diether ethyl



**Figure III.26.b** : Extraction par le chloroforme

Quant à l'activité antibactérienne, elle a été de 25 mm, ce qui est en accord avec les travaux de **Meziani et al., 2010**.

Cependant, cet effet peut également être exprimé par celui des solvants, étant donné que le témoin a quant à lui montré une zone d'inhibition de 15 mm.

- **Adsorption désorption**

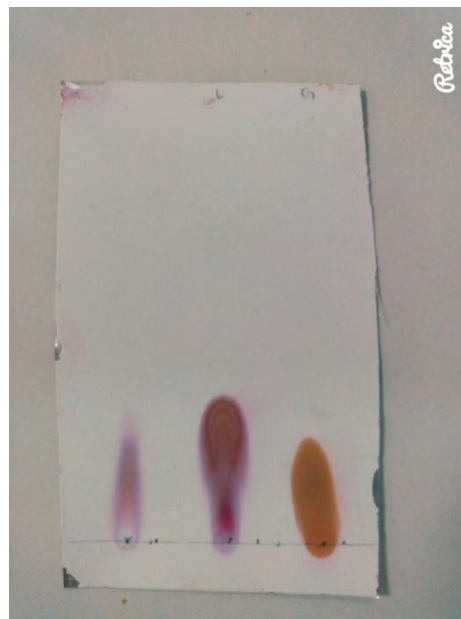
Le rendement de cette méthode est plus élevé que celui de la précipitation (**Yang et al., 1992**). Plusieurs travaux (**Pinto et al., 2009** ; **Pringsulaka et al., 2011** ; **Xie et al., 2011**) ont utilisé cette méthode pour la purification des bactériocines.

L'activité antimicrobienne des extraits obtenus par cette technique, ont montré une bonne zone d'inhibition atteignant 22 mm, selon **Tulini et al., (2009)** cette double extraction par adsorption-desorption a exprimé de bons résultats, quant à la révélation de la présence des bactériocines, elle a été faite en utilisant la ninhydrine par chromatographie sur couche mince (CCM).

- **Chromatographie sur couche mince**

La révélation au Ninhydrine nous a permis de vérifier la présence de substances de nature protéique, en les comparant avec des acides aminés purs en tant que témoin.

La révélation au Ninhydrine en combinaison avec la chromatographie sur couche mince nous a montré que nos échantillons extraits obtenus par adsorption désorption contiennent des substances protéiques, ce qui confirme la présence de bactériocines (**Figure III.27**).



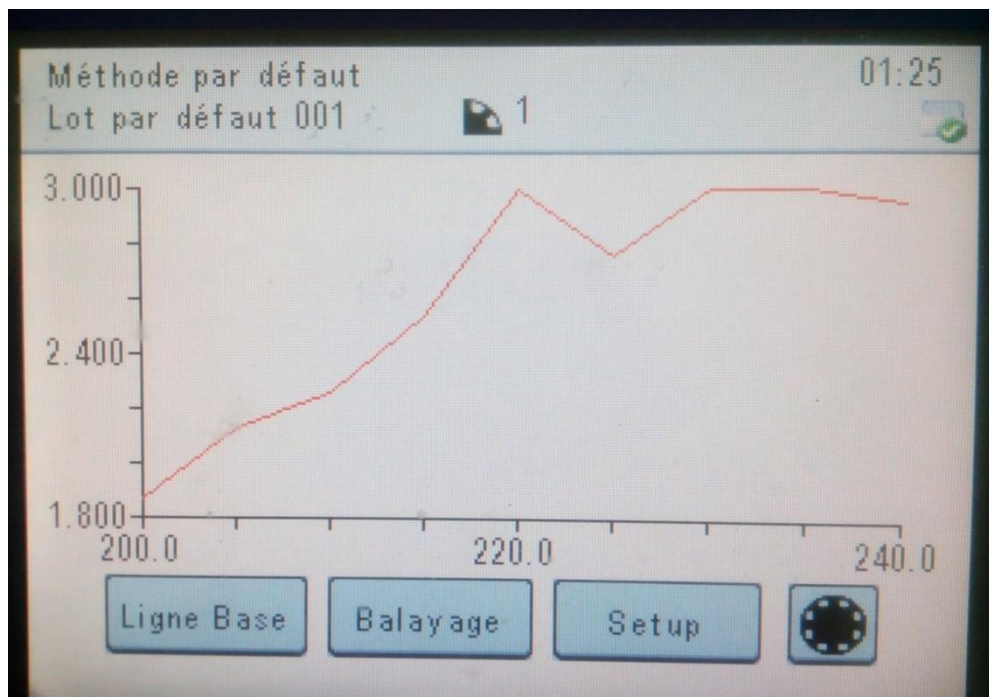
**Figure III.27** : Résultats de la révélation par la Ninhydrine sur CCM

Nous pouvons déduire par conséquent, qu'en comparant les deux techniques utilisés, la meilleure ayant donné des résultats plus fiables est celle adsorption-désorption, étant donné que les extraits ne contiennent aucun solvant à défaut de nous induire en erreur quand aux diamètres des zones d'inhibitions obtenues, ce qui fut notre cas par rapport au témoin lors de l'extraction par solvant qui a donné une zone d'inhibition.

Le rendement des extraits obtenus par le biais de la technique adsorption-désorption est bien meilleur en effectuant 2 extractions consécutives en utilisant le même support cellulaire, cela nous permet d'obtenir un maximum de bactériocines restant sur la paroi bactérienne. Ces résultats sont en accord avec **Tulini et al., (2009)**.

- **Analyse spectroscopique UV-VIS-NIR des bactériocines**

Le spectre d'absorption UV de nos extraits a été examiné entre 200 et 400 nm. Le peptide a montré des pics maximum d'absorbance entre 220, 273 nm, aucune absorbance n'a été détecté au-dessus de 300 nm (**Figure III.28**). Un pic à 220 nm correspond à la caractéristique absorption de liaisons peptidiques ce qui est typique de l'absorption des protéines. **Bizani et al., 2005** ont obtenus des résultats similaires avec des maximum d'absorbance de 220 et 255.

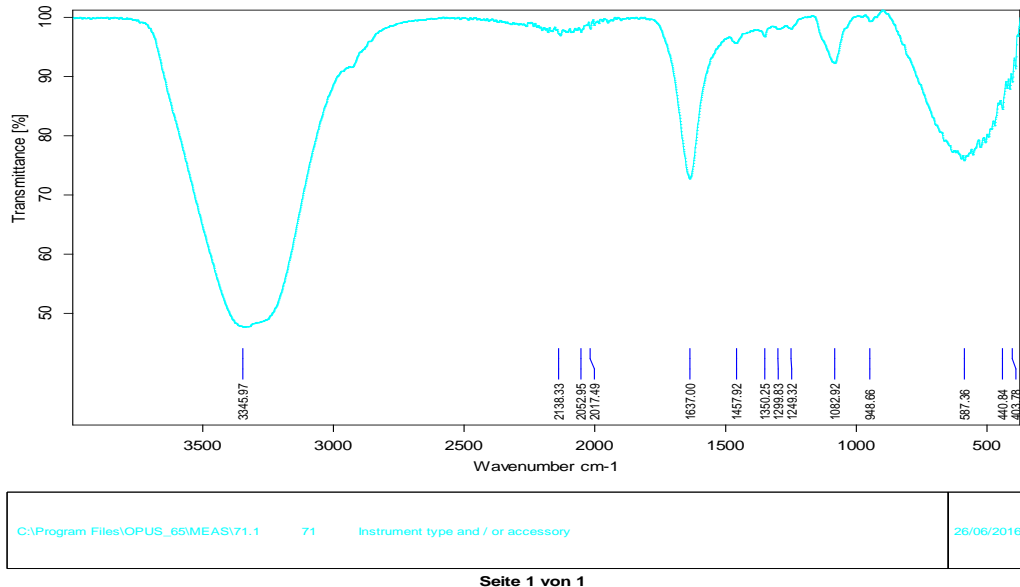


**Figure III.28** : Spectrophotomètre UV visible des la souche MGM 85.

- **Analyse spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)**

Le spectre infrarouge de nos extraits est représenté sur la **Figure III.29**. Les groupes prédominants sont le groupe carboxylique (OH-C = O) qui se situe dans la gamme d'ondes 1650 - 2850  $\text{cm}^{-1}$  ce qui indiquent que la substance contient des peptides, et le groupe alkyle (-CH<sub>3</sub>) qui se situe entre 2960 - 2850  $\text{cm}^{-1}$  indiquant la présence de chaînes aliphatiques.

Les travaux de **Ramalingam et al., 2013** montrent également après analyse spectroscopique infrarouge du lait, des pics à peu près similaires aux nôtres, avec des ondes variant entre 1670 cm<sup>-1</sup> et 2960 cm<sup>-1</sup> ; ce qui confirme la nature protéique de nos extraits.



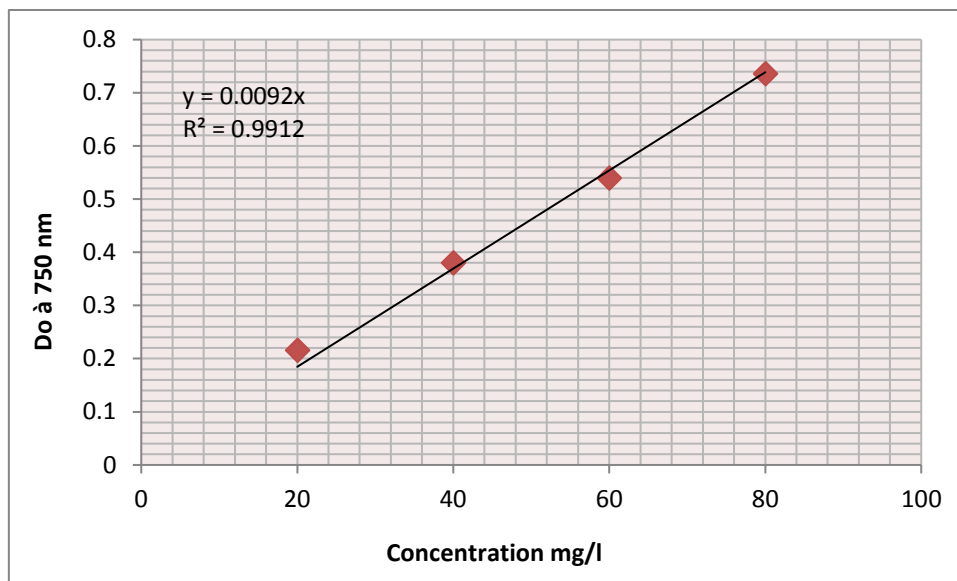
**Figure III.29** : Résultats de l'analyse spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

- **Dosage des protéines solubles**

Les avantages de cette méthode sont sa sensibilité et surtout, sa précision. Cependant, elle nécessite plus de temps que les autres techniques et beaucoup de composés essentiellement utilisés dans les solutions de préparation de protéines interfèrent avec la méthode de Lowry et forment des précipités. Néanmoins, l'effet de ces substances peut être réduit par dilution de l'échantillon mais seulement si la concentration des protéines est suffisamment élevée. Dans notre cas et suite à la courbe d'étalonnage (**Figure III.30**), nous avons déduit une faible concentration de bactériocines estimé à 0.2 mg/ml.

Les travaux de **Makhloufi et al., 2011** montrent également après dosage d'une bactériocine isolé du boza, une quantité de 0.1 mg/ml a été obtenu.

Ce qui explique que la quantité des bactériocines est assez faible après extraction, nécessitant ainsi d'importants volumes de milieux de culture (**Tagg et al., 1976**)



**Figure III.30 :** Courbe du dosage des protéines par la méthode de Lowry (albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéines de référence.

- **Electrophorèse SDS-PAGE**

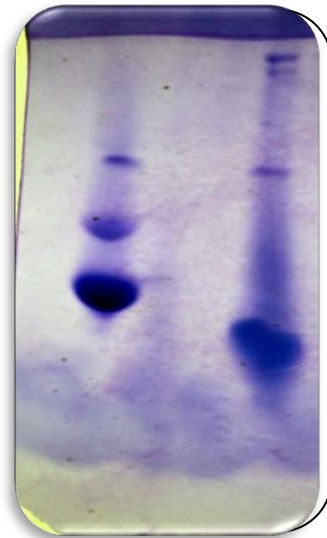
SDS PAGE (électrophorèse en gel d'acrylamide en utilisant le sodium dodécyl sulfate, en condition non dénaturante) est une technique très utilisée pour séparer les protéines, selon leur poids moléculaire. Cette séparation permet la mise en évidence des protéines de l'échantillon.

Les résultats obtenus lors de l'électrophorèse (**Figure III.31**) impliquent que nos bactériocines ont été purifiées à homogénéité, possédant un spectre d'action très large contre toutes les bactéries que ce soit Gram+ comme contre les bactéries Gram-.

- La migration des marqueurs donne des bandes de différentes intensités.
- Des bandes électrophorétiques assez claires sont constatées pour les surnageants, ceci peut être dû aux faibles concentrations des bactériocines.
- Les poids moléculaires obtenus sont nettement inférieurs à 14 kDa. Ce qui confirme qu'il s'agit d'une bactériocine de la classe I ou II.

Les résultats sont tout à fait compatibles avec les résultats rapportés par **Atanassovaa et al., (2003)** sur la bactériocine de *Lb. paracasei subsp. paracasei* de 43 kDa, la pentocine TV35b de 3930 Da (**Okkers et al., 1999**), la leucocine KM432Bz de 3930 Da (**Makhloufi, 2012**), la BacTN635 de 3847 Da (**Smaoui, 2010**).

**Todorov et al., (2007)**, ont aussi observé ce genre de bande, après coloration au bleu de Coomassie du gel. Cette bande (2,9 KDa) correspondait à la bactériocine AMA-K, qui a inhibé la croissance de la souche *Lactobacillus casei*. Selon les travaux de **Kumar Tiwari et Srivastava (2008)**, il a été observé des bandes électrophorétiques claires de la plantaricine LR14  $\alpha$  et  $\beta$ , après coloration du gel au bleu de Coomassie. Ces bandes ont des poids moléculaires compris entre 3,4 à 6,2 KDa.



**Figure III.31** : Résultats de SDS PAGE

- **Détermination de la CMI**

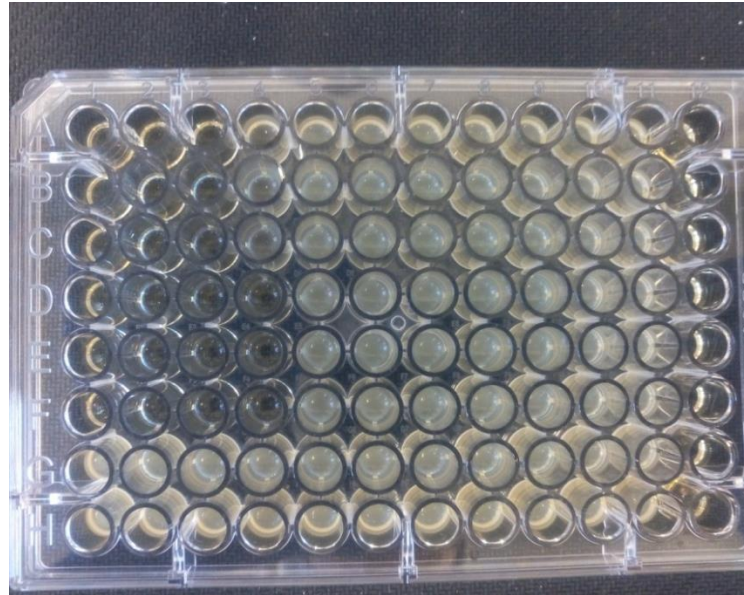
La concentration minimale inhibitrice CMI est la concentration la plus faible permettant d'éradiquer les bactéries nuisibles (effet bactéricide).

Nos bactériocines présentent une CMI variant entre 02 mg.l<sup>-1</sup> et 07 mg.l<sup>-1</sup>. Les isolats des uropathogènes ont été très sensibles à ces bactériocines, de plus ces valeurs sont variables entre les différentes espèces (**Figure III.32**).

D'autres résultats ont été obtenus sur les carnobactériocines Cbn BM1 et Cbn B2 présentent une CMI 04 mg.l<sup>-1</sup> contre *L. ivanovii* et *L. innocua* (**Jasniewski et al., 2008**); et la pediocine PA-1 (CMI 6.25-12.5  $\mu$ g.l<sup>-1</sup>) contre *L. monocytogenes* LSD530 et *L. monocytogenes* LSD538 (**Naghmouchi, 2007**).

La leucocine KM432Bz est particulièrement active contre les bactéries à Gram positif phylogénétiquement proches avec des CMI comprises entre 0.08 nM et 10  $\mu$ M. La leucocine KM432Bz est également active contre des pathogènes telles que *L. monocytogenes* pour laquelle elle présente une CMI de 156 nM.

Par ailleurs la leucocine KM432Bz a un effet bactéricide sur la croissance de *Lb. sakei* subsp. *sakei* et un effet bactériostatique sur *L. monocytogenes* (Makhloufi, 2012).



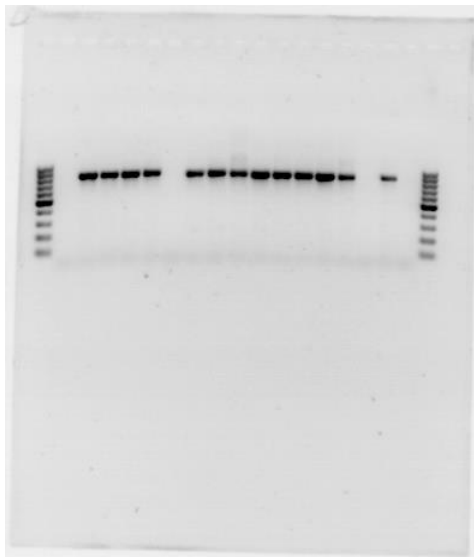
**Figure III.32** : CMI des extraits bactériocinogènes

### **III.5. Identification moléculaire (génotypique)**

La caractérisation des isolats obtenus par les méthodes classiques présente beaucoup de difficultés, car du fait de l'existence de différences significatives dans les profils de fermentation des sucres ayant été préalablement observées. Par conséquent, l'identification génotypique est indispensable afin de confirmer la classification phénotypique.

Les isolats lactiques retenus tout au long de notre travail, et après identification phénotypique et biochimique, ont fait l'objet d'identification moléculaire.

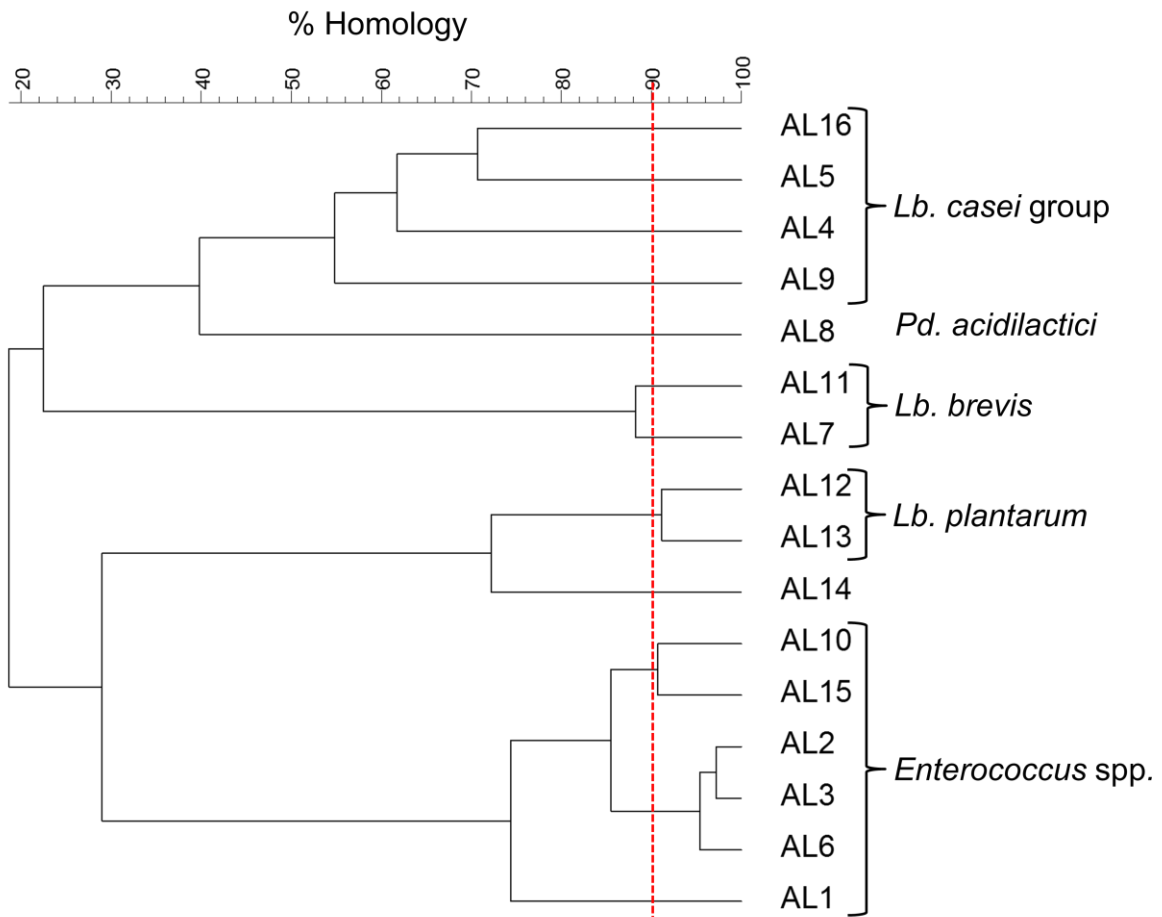
Nous pouvons dire qu'à l'aide du 16S ARNr, les gènes ayant été amplifiés nous ont permis d'obtenir les résultats suivants (**Figure III.33**) :



**Figure III.33** : Amplification des gènes par PCR

L'ordre d'apparition des bandes de PCR est comme suit, il en est de même pour le reste de l'identification moléculaire : MGM 85, MVO 95, MGM 02, MGM 03, LCM 04, LCM 73, LCM 74, LCM 02, LCM 103, LCM 17, LCM 22, LCM 24, MVM 15, MVM 17, MVM 19, MVM 20.

Après séquençage, nous avons obtenu les résultats suivants avec leur pourcentage d'homologie après vérification avec le logiciel BLAST (**Figure III.34**).

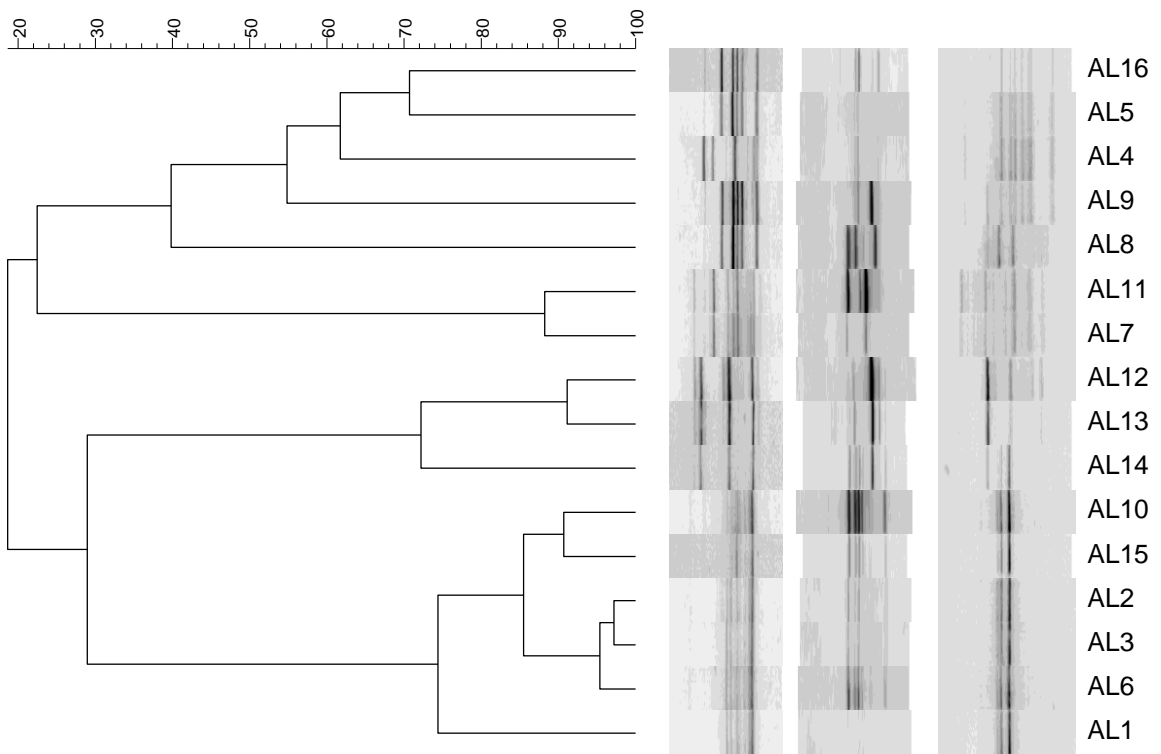
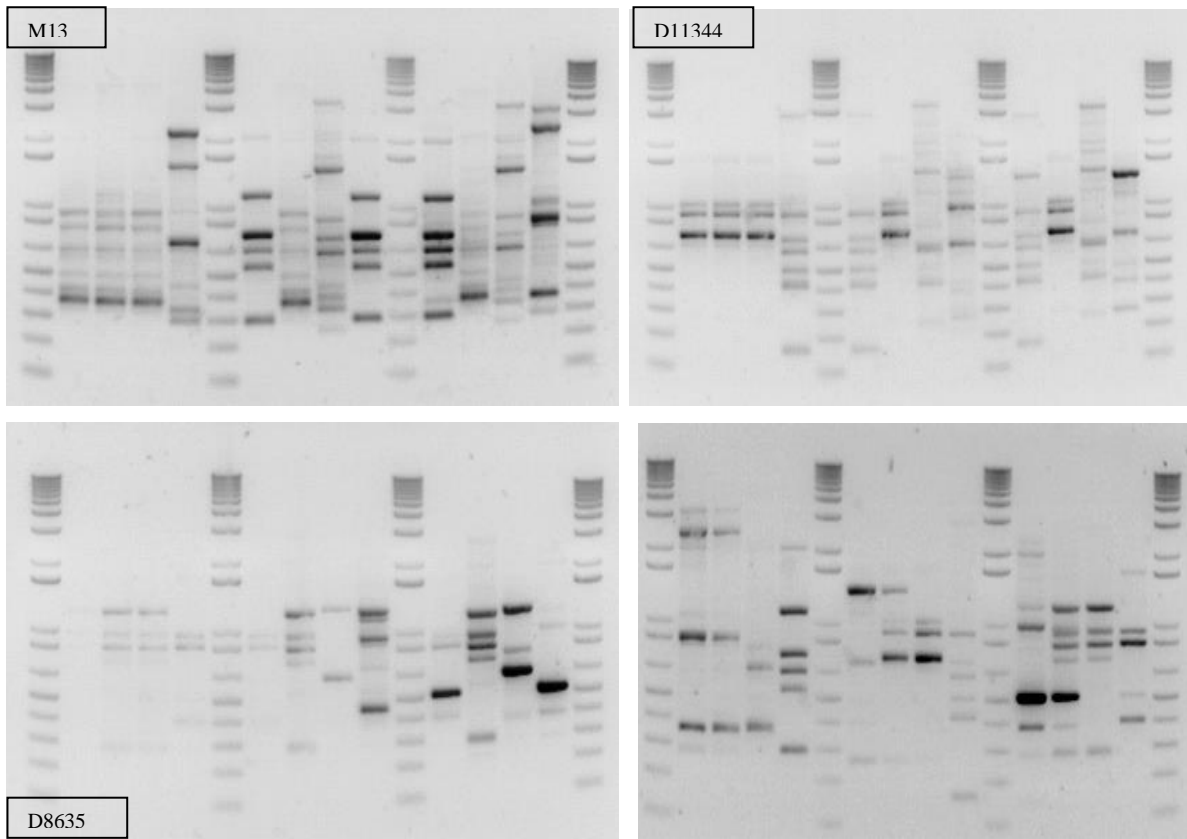


**Figure III.34 :** Arbre phylogénétique après séquençage des isolats lactiques.

Suite à l'analyse des données obtenues, nos isolats ont été identifiés comme suite : 04 isolats de *Lactobacillus casei*, 01 isolat *Pediococcus acidilactici*, 02 isolats *Lactobacillus brevis*, 03 isolats *Lactobacillus plantarum* et 06 isolats *Enterococcus spp*

- **RAPD-PCR**

Les réactions RAPD-PCR ont été réalisées avec les amorces M13, D11344 et D8635  
 La valeur de reproductibilité du dosage RAPD-PCR, calculée sur la répétition d'amplifications indépendantes de souches de type enterocoques, était supérieure à 90%. Après la comparaison des profils d'amplification, nous avons obtenu (**Figure III.35**) :



**Figure III.35** : Diagramme de l'analyse RAPD-PCR

- **Sensibilité aux antibiotiques**

La majorité des bactéries lactiques ont une résistance contre les antibiotiques. Cette résistance est intrinsèque et non transmissible (**Klein et al., 1998; Salminen et al., 1998**).

Cependant, certaines souches lactiques ont des gènes d'antibiotiques codés sur le plasmide (**Ishiwa et Iwata, 1980; Fons et al., 1997**).

Nos isolats lactiques, ont exprimé différentes résistances vis-à-vis des antibiotiques utilisés, ils ont été pour certains sensibles et pour d'autres intermédiaires (**Tableau III.06**).

Tous les isolats ont montré une résistance totale à l'oxacillin, alors qu'une sensibilité a été constatée pour tous contre la Nitrofurantoin, Chloramphenicol et Rifampicin.

Les isolats LCM 85 et LCM 24 sont les souches qui ont montré le plus de résistance vis-à-vis des antibiotiques (8 antibiotiques parmi ceux ayant été utilisés), par contre l'isolat MGM 22 est la plus sensible face aux antibiotiques.

Les isolats ont été dans l'ensemble sensibles à intermédiaire quant à la Levofloxacin, l'Erythromycin et la Ciprofloxacine.

Pour ce qui est du reste des antibiotiques utilisés, il a été remarqué également des sensibilité et résistance en passant par des intermédiaires pour nos isolats.

Selon **Naghmouchi., (2007)**, certaines souches lactiques présentent des différences quant à leur sensibilité à différents antibiotiques, ce qui justifie la modification de la composition de leurs membranes cellulaires.

Les profils généraux de résistances aux antibiotiques des bactéries lactiques de notre étude concordent avec ceux rapportés dans la littérature, ce qui a été souvent rapporté par plusieurs auteurs (**Charteris et al., 1998b; Delgado et al., 2005; Florez et al., 2005; Swenson et al., 1990**) ou comme celle à des aminoglycosides (kanamycine, gentamycine, tobramycine, amikacine), elle aussi déjà signalée par (**Charteris et al., 1998b; Coppola et al., 2005; Zhou et al., 2005**).

Cependant certaines résistances sont très variables et spécifique aux espèces comme celles à la rifampicine, nitrofurantoine et tetracycline ce qui est le cas des Enterocoques.

Tableau III.06 : Profil d'antibiorésistance des isolats lactiques

Isolats lactiques	F	C	RD	LEV	E	CIP	VA	P	TE	AMP	OX	QD
MGM 22	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S
MVO 95	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S
MGM 02	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S	R	S
MGM 03	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S	R	S
LCM 04	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S	R	S
LCM 73	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S	R	I
LCM 74	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S	R	I
LCM 02	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S	R	S
LCM 103	S	S	S	R	I	R	R	S	R	R	R	R
LCM 17	S	S	S	I	R	I	S	S	S	S	R	S
LCM 85	I	I	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R
LCM 24	I	I	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R
MVM 15	S	S	I	I	S	R	R	S	S	S	R	S
MVM 19	S	S	I	S	I	I	S	S	R	S	R	S
MVM 17	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	I
MVM 20	S	S	I	S	I	I	S	S	R	S	R	S

F : Nitrofurantoin

C : Chloramphenicol

RD : Rifampicin

MUP : Mupirocin

CT : Colistin Sulfate

LEV : Levofloxacin

E : Erythromycin

CIP : Ciprofloxacin

CN : Gentamicin

VA : Vancomycin

P : Penicillin G

TE : Tetracycline

AMP : Ampicillin

TOB : Tobramycin

OX : Oxacillin

FEP : Cefepime

AK : Amikacin

CAZ : Ceftazidime

ATM : Aztreonam

S : Streptomycin

QD : Quinupristin / Dalfopristin

PRL : Piperacillin

IMP : Imipenem

**R** : Résistante (<15mm)

**S** : Sensible (>25mm)

**I** : Intermédiaire (>15mm)

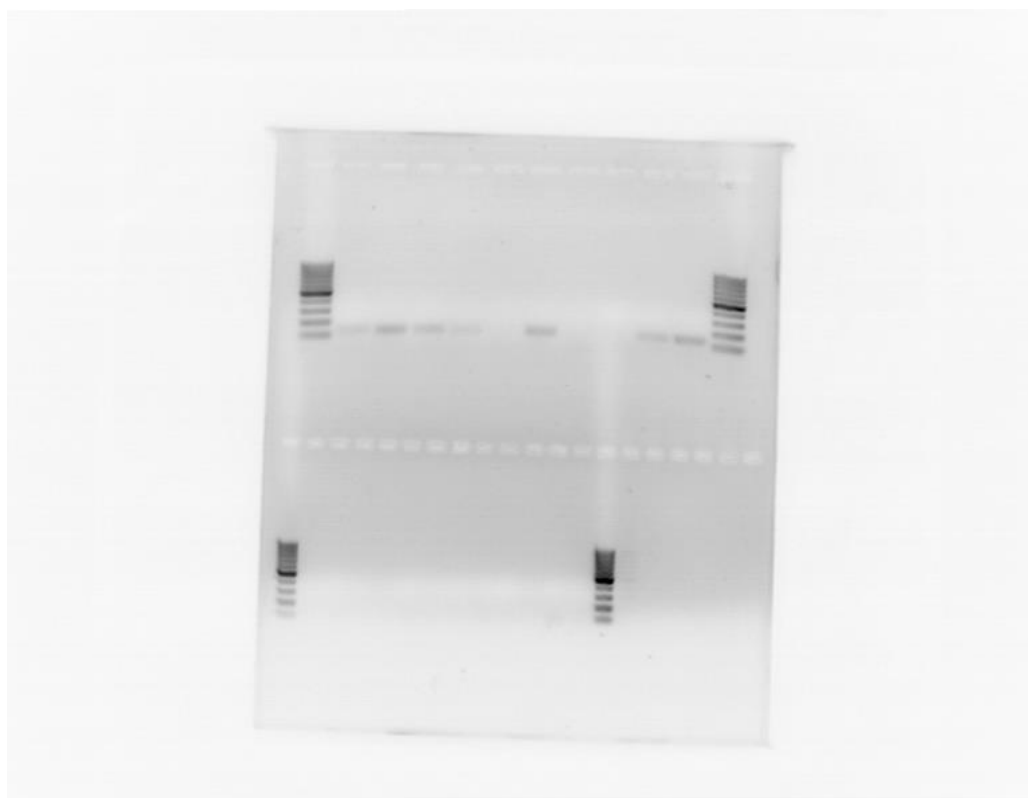
- **Détection des gènes codants pour bactériocines, résistance aux antibiotiques et facteurs de virulence par PCR**

Tous les isolats ont été jugés sensibles aux antibiotiques cliniquement importants (ampicilline, érythromycine, pénicilline G, rifampicine, tétracycline et vancomycine). D'autre part, toutes les souches testées n'ont pas été inhibées par l'oxacilline. Cette observation est en accord avec **Klare et al. (2003)** qui ont déclaré que les entérocoques sont naturellement résistants aux pénicillines semi-synthétiques comme l'oxacilline.

Selon les données phénotypiques, les Entérocoques semblent exempts de leurs déterminants antibiotiques respectifs : aucune donnée PCR n'a été détecté pour les gènes tet (tetK, tetL, TetM, tetO, tetS et int), van genes (vanA, vanB, vanC1, vanC2, vanC3, vanD, vanE et vanG) ou les gènes erm (ermB et ermC).

Pour ce qui est de la détection des gènes codant pour les bactériocines, il a été noté que nos isolats lactiques seulement les entérocoques parmi eux après PCR démontrent des bandes qui codent pour la bactériocine Enterocin P (Gènes codant pour la bactériocine Enterocin P) (**Figure III.36**).

Nous déduisons donc que nos isolats lactiques, plus précisément les Enterocoques ont la capacité de produire des bactériocines de type Enterocin P.



**Figure III.36** : Gènes codant pour la bactériocine P

# ***CONCLUSION & PERSPECTIVES***

---

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

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

Parmi les métabolites des bactéries lactiques, des substances antimicrobiennes appelées les bactériocines-like se sont des biomolécules antimicrobienne efficaces et très recherchées pour diverses applications en industrie agro-alimentaire, comme en industrie pharmaceutique, permettant ainsi de pallier aux problèmes de résistances aux différentes infections pathologiques.

Les études faites sur les différentes bactériocines depuis deux décennies ont permis l'acquisition de beaucoup de connaissances sur les propriétés et les différents modes d'action des bactériocines. A ce jour la nisine est la seule à posséder le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (**Sahl et Bierbaum, 1998**).

Dans le cadre de la préparation de cette thèse, nous avons travaillé sur une large gamme d'isolats lactiques, obtenus à partir de produits du terroir, à savoir le lait de vache et chèvre de la région et quelques isolats de bifidobactéries issus de selles de nourrissons.

Dans un premier temps, nous nous sommes proposé d'isoler et recherché les isolats lactiques les plus performants, entre autre ceux comme étant producteurs de bactériocines-like, par la détection des différents aspects des colonies sur les milieux appropriés. Après isolement, les isolats retenus ont été identifiés par des testes phénotypiques et biochimiques.

Il s'en suit un état des lieux concernant une pathologie classé deuxième au rang mondial, de par sa fréquence et gravité qui n'est autre que les infections urinaires, le problème réside dans le fait est que ces germes Uropathogènes expriment une forte résistance à l'égard des antibiotiques, ce qui donne naissance à une difficulté de traitement et une émergence de cette pathologie.

On s'est donc proposé de palier à ce fléau de résistance et ce en subsistant les antibiotiques, par des bactéries lactiques dites bénéfiques, en visant plus particulièrement les peptides antimicrobiens (Bactériocines).

Dans un deuxième temps, nous avons testé nos isolats lactiques (au total de 152) par la méthode des puits vis-à-vis des Uropathogènes, afin de tester et mesurer l'activité antimicrobienne, sélectionner et retenir les plus performants.

Un screening a été nécessaire, et ce afin de caractériser les bactériocines-like, de par sa nature protéique et ce à l'aide d'enzymes, la détermination de l'acidité Dornic, l'étude de la cinétique ainsi que l'estimation de la quantité de bactériocine produite, seulement 16 isolats ont été retenus, dont la plus puissante étant MGM 85.

Nous avons également proposé d'optimiser le milieu de culture, afin de permettre une bonne production de bactériocines, les paramètres étudiés ont été la composition du milieu de culture à savoir la source d'azote, de carbone et de potassium, l'effet de la température et du pH.

Les propriétés physico-chimiques ont également été sujet de notre étude, et ce toujours dans le but du criblage de nos peptides antimicrobiens.

Par ailleurs, afin de pousser la recherche encore plus loin, nous avons extrait les bactériocines-like des bactéries lactiques par deux techniques différentes, les solvants organiques et par la méthode d'adsorption-désorption, il s'en est suivie une chromatographie sur couche mince (CCM) et révélation par Ninhydrine afin de nous assurer de la nature protéique de nos extraits.

Afin d'identifier ces extraits bactériocinogènes, des analyses chimiques de ces biomolécules ont été faites, une analyse spectroscopique UV-VIS-NIR suivie d'une analyse spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR).

Un dosage des protéines solubles a été nécessaire par la méthode de Folin et ce afin de déterminer la concentration des bactériocines-like présents dans nos échantillon, suivie de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour connaître l'effet bactéricide de nos molécules qui varie entre 2 et 7 mg.l<sup>-1</sup>

L'Electrophorèse sur gel polyacrylamide (SDS-Page) nous a permis de prendre connaissance sur le poids moléculaire de nos bactériocines-like.

Enfin, une identification moléculaire de nos 16 isolats retenus a été effectué par PCR ADN<sub>r</sub> 16S et analyse par RAPD-PCR. Après extraction de l'ADN et amplification un séquençage a été nécessaire, nous avons donc obtenus *Lactobacillus casei*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* et *Enterococcus faecium*, *durans* et *hirae*.

L'étude de la résistance de nos isolats lactiques a été différente d'un isolat à un autre, pour les Enterocoques elle a été plus particulièrement visée contre Amikacin et Oxacillin, pour le reste elle a été variée, exprimant également des sensibilités alors que d'autres isolats ont exprimé leurs caractères intermédiaires. Ce qui a été confirmé par PCR des gènes résistants à la vancomycin et Oxacillin plus précisément pour les Enterocoques.

Enfin la localisation des gènes codant pour les bactériocines-like, il a été détecté la présence de gènes codant pour les Enterocoques uniquement, il s'agira donc de la bactériocine Enterocin P.

Au terme de ce travail de recherche, nous pouvons dire que nous possédons une collection d'isolats à spectre large, ayant la capacité d'agir sur les Gram négatif en produisant des peptides antimicrobiens intéressants, ce qui nous donne l'opportunité d'élargir encore plus ce sujet, et noté en tant que perspectives d'étudier d'une manière plus approfondi la confirmation de ces isolats capables de produire des bactériocines-like, combiner deux isolats lactiques performant en culture mixte, optimiser les différents milieux de culture, Il serait très intéressant de poursuivre cette étude pour mieux comprendre les mécanismes d'antibiorésistance des bactéries et penser à étudier l'effet in vivo pour avoir des résultats beaucoup plus concret sur la physiologie d'un être vivant.

# **Références**

## **Bibliographiques**

---

## Références Bibliographiques

- Al-Jeboury GHA (2010) In vivo and in vitro Study of Probiotic Effect of *Lactobacillus acidophilus* on Pathogenicity of *Proteus mirabilis* isolated from Urinary Tract Infection (UTI). *Journal of Biotechnology Research Center*, 4 (2) : 53 - 63
- Ammor M.Salim, Tauveron grégoire, Dufour Eric, chevallier Isabelle , 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1-screen and characterization of the antibacterial compounds. *food control*, 17 :454-461. (mémoire de magistère présenté par BELARBI Fatima , isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices antibactériennes ; université d'Oran ; 2011.)
- Anderson, G. G., K. W. Dodson, T. M. Hooton & S. J. Hultgren, (2004) Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol* 12: 424-430.
- Andreas. U. Gerber. (2003). Infections simples des voies urinaires: diagnostic, traitement et prophylaxie. *Forum Med Suisse*, N°11.
- Ashraf M, Arshad M, Siddique M ET muhammad G.(2009). In vitro screening of locally isolated *Lactobacillus* species for probiotic properties. *Pakistan Vet.J.*, 2009.
- Avril. J., 1988- Dictionnaire pratique de bactériologie clinique. Ellipses, Paris.
- Avril. J., 1988- Dictionnaire pratique de bactériologie clinique. Ellipses, Paris .
- Azadnia P, Khan Nazer AH (2009) Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of Fars province. *Iranian journal of veterinary research*, Shiraz university. Vol 10, N°03, Ser N°28.
- Badis A (2004) Identification and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk from four local goat populations. State doctoral thesis, University of Oran.
- Barefoot SF, Klaenhammer TR (1983) Detection and activity of lactacin B, a Bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 45(6) : 1808-1815.
- Bekhouche F.(2006). bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytique des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimiques 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzymes polygalacturonase. Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur en Microbiologies et Enzymologie, Option : génie alimentaire. université de Mentouri Constantine. P21,24,27.

- Ben Omar N. *et al.*, 2004. Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst. Appl. Microbiol.*, 27, 118-130.
- Bendimerad N, Kihal M, Berthier F (2012) Isolation, identification, and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation. *Dairy Sciences of Technology*, 92(3): 249 - 264
- Bent S., Nallamotheu B., Simel D., Fihn S., Saint S. (2002). Does this woman have an acute uncomplicated urinary infection? *JAMA*, 287:2701-10.
- Bergy's manual. (2009) ). *Systematic of bacteriology*. Second Edition. Volume three the firmicutes. Edition springer
- Bernier L. les probiotiques en 2010, une revue de la littérature. 2010. thèse pharm : université d'Angers. 2010 ; 166.
- Bhardwaj A, Puniy M, Sangu KPS, Kumar S, Dhewa T (2012) Isolation and Biochemical Characterization of Lactobacillus species Isolated from Dahi. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2 (2) : 1 - 14
- Bjorkroth, et Holzapfel W, 2003. Genera leuconostoc Oenococcus and Weissellain the prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological community Edited by M. Dworkin. New York, Springer-Verlag. Epub March 28.
- Boiron P. (1999). Etude des infections fongiques: des avancés multiples. *Option/Bio 238* : 4-5. *Références bibliographiques*
- Bonn et Blanc J.M. (2008). *Annales de dermatologie et vénéréologie*, Item 87- Infections cutanéomuqueuses bactériennes et mycosiques : *Candida albicans*. 135(115): 42-48.
- Bottazzi, V., Mercenier, A. (1994). Propriétés prophylactiques et thérapeutiques des bactéries lactiques. Dans : *Bactéries lactiques*. H De Roissart et F.M. Luquet. Eds, Loriga-Uriage, 2 : 409-418.
- Botto H. (2003). Infections urinaires nosocomiales de l'adulte: conférence de consensus 2002, Texte long. *Médecine et maladies infectieuses*. 33: 223s-244s.
- Bouguettoucha A, Balannec B, Amrane A (2011) Models for Lactic Acid Fermentation, *Food Technol. Biotechnol.* 49 (1) 3-12
- Bruyère F., Cariou G., Boiteux J-P, Hoznek A., Mignard J-P., Escaravage L., Bernard L., Sotto A., Soussy C-J., Coloby P., le CIAFU., (2008). Généralités. *Progrès en Urologie*, 18 Suppl. 1, S14-S18.
- Callewart, T. et De Vuyst, L., 2000. Bacteriocin production with *Lamylovorus DCE 471* improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(2), 606-613.

- Calvez. S ; Belguesmia. Y ; Kergourley. G.(2009). in bactériocines : de la synthèse aux applications in bacteries lactiques :physiologique , metabolisme,genomique et applications industrielles edition : Economica .2009. p 100-122.
- Carine. D ; Tonart. P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. BASE. VOLUME 13.
- Carr FJ, Chill D, Maida N (2002) The lactic acid bacteria : A littérature survey. Crit. Rev. Microbiol., 28 :4,281-370.
- Castro MP, Palavecino NZ, Herman C, Garro OA and Campos CA (2011) Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages : Characterization of antibacterial compound and study of the factors affecting bacteriocin production. Meat science. 87 : 321-329.
- Collins M.D., Williams A.M.et Wallbanks S(1990):the phylogeny of Aerococcus and pediococcus as determined by 16rRNA sequence analyse:description of Tetragenococcus gen.nov.FEMS microbial let.70:255-262.
- Corrieu G. et Luquet F. M., 2008. Bactéries lactiques : de la génétique aux ferments. *Tec et Doc, Lavoisier, Paris* : 269-306.
- Cox E. (1998). Nosocomial urinary tract infections Urology. 32: 210-5.
- Ctinilis (2010).conduit à tenir en cas de suspicion d'infection invasive à Streptococcus pyogenes (streptocoque bêta-hémolytique du groupe A en service de gynécologie obstétrique et maternité. centre de coordination de lutte contre les infections Nosocomiales Sud-Est. p 9.
- Daniel J G Thirion., David Williamson. (2003). Les infections urinaires: une approche clinique, *Pharmactuel Vol. 36 No 5*.
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) Medium of Lactobacilli. Journal Applied Bacteriology, 23: 130–135
- De Roissart, H. et Luquet, F.M. (1994). Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. pp. 1-286
- De vuyst luc, leroy Frédéric, 2007.Bcteriocins from lactic.acid Bacteria: production, purification,and Food Applications.J.mol.Microbiol Biotechnol.,13 :194-199.
- De Waard. R., J. Garssen, J. G. Vos, and E. Claassen. (2002). Modulation of delayed-type hypersensitivity and acquired cellular resistance by orally administered viable indigenous lactobacilli in *Listeria monocytogenes* infected Wistar rats. Lett. Appl. Microbiol. 35(3):256-260.
- Deegan LH, Cotter PD, Hill , Ross P (2006) Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int Dairy J 16: 1058–1071.
- Delaeare. (2000). Infections urinaires communautaires et Diarrhées infectieuses aigues.119: S110-S117.

- Delavierre. (2007). Prostatite chronique et syndrome douloureux pelvien chronique de l'homme. Enquête auprès des urologues français *Dominique*, 17 : 69-76. diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66,
- Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. et Janssens, C. (1994) In : Bactéries lactiques aspects fondamentaux et technologiques, 1 : 25-114.
- Djadouni F, Kihal M (2013) Characterization and determination of the factors affecting anti-listerial bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from dairy milk products. *African Journal of Food Science* Vol. 7(2). 35-44
- Do T, Jolley KA, Maiden MC, Gilbert SC, Clark D, Wade WG, Beighton D: Population structure of *Streptococcus oralis*. *Microbiology* 2009, 155:2593-2602.
- Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T. et Shaha N.P., 2007. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *INRA, EDP Sciences*. 86 : 21-38.
- Dupas M. *Conférence: la gestion des infections uro-génitales chez la truie* Expo-congrès du porc du Québec 2004, 69-78
- El Fassi F, Moujahi A, Ben Rakkad N, Elmalki F, Barrijal S, Fessiwi K, Idaoma M (2013) Science Lib Editions Mersenne : Volume 5, N ° 131117
- Emonet . S., Harbarth. S., van Delden. C. (2011) .Infection urinaire de l'adulte. *Revue Médicale Suisse*. *Rev Med Suisse*. 7: 912-6.
- Erdourul Z et Erbulur F. 2006. Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various Foods. *Turk J Biol*, N°: 30( 2006) 39-44.
- Eslava C, Villaseca J, Hernandez U, Cravioto A. 2003. *Escherichia coli* (123-135). In *International Handbook of Foodborne Pathogens*, Miliotis MD, Bier JW (eds). Marcel Dekker: New York; 688p.
- FAO, T. W. H. O. (2001) .Probiotic definition.
- Feigin et Cherry. (2004). *Text book of paediatric infectious diseases*, 5 the Edition, V.B. Sanders company. Canada.
- Feng P. 2001. *Escherichia coli* (143-162). In *Guide to Foodborne Pathogens*, Labbé RG, García S (Eds). John Wiley and Son: New York; 400p.
- Foxman B. (2002). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economic costs. *American Journal of Medicine*. 113:5S-13S.
- Foxman B., Barlow R., D'Arcy H., Gillespie B., Sobel JD. (2000). Self reported incidence of urinary tract infection and associated costs, *Ann Epidemiol*, vol. 10, pp, 509–515.

- Franciosi E, Settanni L, Cavazza A ; Poznanski A (2009) Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. *International Dairy Journal* 19 : 3-11.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66(5):365-378.
- Gbassi K.G., Vandamme T., Yolou S.F. et Marchioni E., 2011. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. *Int. Dairy J.* 21 : 97-102.
- Gevers. D. (2002). Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.
- Gill, H. S., F. Doull, K. J. Rutherford, and M. L. Cross. 2000. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br. J. Nutr.* 84 (S1):S111-S117.
- Gillor O, Etzion A, Riley MA (2008) The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biot* 81: 591–606.
- Girard R., Pierre Bénite.,(2009).Infection urinaire. CCLIN Sud-Est.
- Gobbetti M ; De Angelis M ; Corsetti ; De cagno R ( 2005) Trends in food science.
- 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.
- Götz, F., T. Bannerman, and K.-H. Schleider. 2006. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In *Prokaryotes* 3rd edition (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E., Eds): 4 pp 4-75. Springer, New York, NY, USA.
- Guessas B, Adjoudj F, Hadadji M and Kihal M (2012) Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Their Major Technological Traits. *World Applied Sciences Journal* 17 (4): 480-488
- Guiraud J (2003):*Micribiologie alimentaire, Techniques d'analyse microbiologiques*.Ed,Dunod,parid,2003,651 p
- Guiraud J. P. et Rosec J. P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire, *Dunod, Paris* : 238-245.
- Guiraud, J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agroalimentaire, Eds. Dunod Paris, 652 p.
- Hammes W.P.et Vogel, R.F.(1995). The genus *Lactobacillus*.Inwood.B.J.B,Holjapfel, W.H.the genera of lactic acid bacteria, Blackie Academic et professional.19-54.
- Hardy KG (1987) : Methods of studying colicins and their plasmids : In plasmids, IRL, press 105-161.
- Harrison(2002). - Principes de médecine interne, 15ième édition. Paris : Médecine-Sciences, Flammarion. p: 799-803.

- Hélène C. Carnobacterium maltaromaticum : caractéristiques physiologiques et potentialités en technologie fromagère. Thèse présentée en vue d'obtenir les grades de docteur de l'INPL et Docteur/PhD en procédés Biotechnologiques et Alimentaire. Université de Ngaoundere, Cameroun. P5.
- Hernandez D, Cardell E, Zarate V (2005) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by Lactobacillus plantarum TF711. *Journal of Applied Microbiology*. 99, 77–8
- Herreros MA, Sandoval H, González L, Castro JM, Fresno JM, Tornadijo ME (2005) Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiol* 22:455–459.
- Heyman, M., Heuvelin, E. (2006). Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique le paradoxe. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20 : 85–9.
- Heyman, M., Heuvelin, E. (2006). Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique le paradoxe. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20 : 85–9.
- Ho T.N.T., N. Tuan N., Deschamps A. et Caubet R., 2007. Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology*. 134-142.
- Holzapfel W,H,Haberer P, Geisen R,Bjorkroth J,and schillinger U,2001,Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition.*Am J clin Nutr*, 73:3655-735.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr* , 73: 36S-73S *Int. J. Food Microbiol.* , 132:109-116.
- Holzapfel, 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.
- Hopp U., Baltensweiler J. (2009). Mycoses-Mycoses cutanées-Candidoses-Moniliases ou Monilioses, causes et facteurs de risque. France.
- Hugenholtz, J., and Kleerebezem, M., 1999. Metabolic engineering of lactic acid bacteria: Overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *curr. opin, biotechnol*, 10(5), 492-497.
- Iyer R. and Tomar T., 2010. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 20 pp :133.
- Jett B., Huycke M. & Gilmore M., 1994. Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, 7(4), 462-478.

- Jidar K., (2007).Prévalence du Staphylocoque doré résistant à la méthicilline chez les patients hospitalisé en dermatologie. Thèse de doctorat : université Paris Descart faculté de médecine Paris Descart. 55p.
- Jozala AF, de lencastre Novaes LC,c holewo O, Moras D,et penna TCV.2005,Increase of nisin production by lactococcus lactis in different media.Afr J Biotechnol,4:3:262-265.
- Katina K, M Sauri, H.-L Alakomi, T Mattila-Sandholm (2002) Potential of Lactic Acid Bacteria to Inhibit Rope Spoilage in Wheat Sourdough Bread. Lebensm. Wiss. u. Technol. 35, 38–45
- Kayser F., 2003.Safety aspects of enterococci from the medical point of view. Int. J. Food Microbiol., 88, 255-262.
- Kihal M, Provost H, Lhotte ME, Huang DQ and Divies C (1996) Instability of plasmid encoded citrate permease in *Leuconostoc*. J.App Microbiol 22 :219-223.
- Kivanç M, Yilmaz M, çakir E (2011) Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. Turk J Biol 35. 313-324
- Kleerebezem, M., 2004.Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their Own biosynthesis.peptides,25:1405-1414
- Kotelnikava EA,et Gelfand MS.2002,Bcateriocin production by Gram positif bacteria and the Mechanisms of Transcriptional Regulation, Russian J,Genetics,38(6):628-641,translated from genetika,38(6):758-772.
- Krishnendra Namal S, Sakshi D, Priyanka P, Priyanka S, Neelofar S, Jitendra N (2013) Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria from Dairy Products. Int. J. Pure App. Biosci. 1 (1): 28-32
- Kumar Pundir R, Neha kashyap SR and Kaur A (2013) Probiotic Potential of Lactic acid Bacteria Isolated from food Samples – an in Vitro study. J App Pharm Sci. 3 (03): 085- 093.
- Lentilhac JP. (2002). Responsabilités médicales et infections nosocomiales.*Hygiène*, 6: 471-8.
- les recommandations 2002 de la SPILF (Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française) Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) : INFECTIONS URINAIRES NOSOCOMIALES DE L'ADULTE.
- Leveau J-Y.,Brielle, De Roissart H.,1991.la flore lactique IN Technique d'analyse et de control dans les industries agroalimentaire.Bourgeois C.M.,leveau J-Y .Tec et DOC ,lavoisier, pp :152-186.
- Lim IS, Lee HS, Kim WY (2009) The effect of lactic acid bacteria isolates on the urinary tract pathogens to infants in vitro. J Korean Med Sci. 24 Suppl:S57–62.
- Little P. (2010). Presentation. Pattern. And natural course of severe symptoms. And role of antibiotics and antibiotic resistance among patients presenting with suspected

- 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.(mémoire de magistère présenté par BELARBI Fatima , isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices antibactériennes ;université d'Oran ;2011.).
- -Lubelski, J., 2008. Biotesynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the mode antibiotic nisin. *cell.Mol.life*;65:455-476.
- MacFaddin JF (2000) *Biochemical tests for identification of medical bacteria.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Madec F., Tillon J.P. *Incidence et diagnostic de l'infection urinaire dans les troupeaux de truies.* Bulletin d'information des laboratoires des services vétérinaires, 1983, 9 : 17-27.
- Madec F. *Epidémiologie des problèmes urinaires chez la truie en élevage intensif.* Bulletin des GTV, 1990, 2 : 39-45
- 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 (école doctorale iviv)
- Makhloufi K M,(2011).caractérisation d'une bactériocine produite par une bactéries lactique *Leuconostoc pseudom :esenteroides* isolée du bosa. Thèse présenté pour le grade de Docteur en Spécialité : Microbiologie, Biochimie. Université Pierre et Marie Curie.P5,19,86.
- Mami A (2014) Study of the Antimicrobial and Probiotic Effect of *Lactobacillus Plantarum* Isolated from Raw Goat's Milk from the Region of Western Algeria. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR).* 13 (1) : 18-27
- Manzoor A,Ul-Haq I, Baig S, Iqbal Qazi J, and Seratlic S (2016) Efficacy of Locally Isolated Lactic Acid Bacteria Against Antibiotic-Resistant Uropathogens. *Jundishapur J Microbiol.* 9(1): 18952
- marteau P. et Seksik P., 2005. Place des probiotiques dans la prévention et le traitement des diarrhées postantibiotiques. *Re. Fran. Lab.* 73-76.
- Mathot A.G.,Beliard E, Thnault D., 1996,propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques *INMicrobiologies alimentaires : aliments fermentés et fermentation alimentaires.* Bourgeois C.M.,larpent J-P.Tome 2,Tect Doc, lavoisier, pp :432-456.
- McLeod, A., Nyquist, O. L., Snipen, L., Naterstad, K., and Axelsson, L. (2008) Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Syst Appl Microbiol.*31: 393-403.
- McMillan, A., M. Dell, M. P. Zellar, S. Cribby, S. Martz, E. Hong, J. Fu, A. Abbas, T. Dang, W. Miller, and G. Reid. 2011. Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 86(1):58-64.

- Medellín-Pena, M. J., and M. W. Griffiths. (2009). Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(4):1165-1172.
- Menad N, Cheriguene A, Belarbi F, Hammouni R and Moghtet S (2014) The Antibacterian Activity of *Lactococcus lactis* sbsp *cremoris* against *Salmonella* sp. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis* 3:1.
- Meziani M (2012) Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*. Thèse de magister Spécialité : BIOCHIMIE. Université Mentouri Constantine
- Naderi A, Kasra-Kermanshahi R, Gharavi S, Imani Fooladi AA, Abdollahpour Alitappeh M, Saffarian P (2014) Study of antagonistic effects of *Lactobacillus* strains as probiotics on multi drug resistant (MDR) bacteria isolated from urinary tract infections (UTIs). *Iran J Basic Med Sci.* 17: 201-208.
- Nousiainen J., Javanainen P., Setälä J. ET Wright A.V., 2004. Lactic acid bacteria as animal probiotics. In: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 547-560.
- O' Shea EF, Cotter PD, Ross RP and Hill C (2013) Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology.* 24:130–134
- Patel, R, K. E. Piper, M. S. Rouse, J. R. Uhl, F. R. 3rd Cockerill, and J. M. Steckelberg. 2000. Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunensis* among staphylococcal isolates causing endocarditis: a 20-year experience. *J. Clin. Microbiol.* 38:4262-3.
- Pfaller M.A. (2002). Focus on fungal infectious 3. Phoenix Arizona March.
- Pilet M.F., Magras C., Federighi M., 2005. Bactéries lactiques. In : *bactériologie alimentaire* (Federighi M.). 2e Ed., *Economica*. Paris. 219-240.
- Pilet M.F., Magras C., Federighi M., (1998). Bactéries lactiques. In : *Manuel de bactériologie alimentaire* (Sutra L., Federighi M., Jouve J.L.). *Polytechnica*. Paris. 235-260.
- Pilet M.F., Magras C., et Federighi M., 2005: Bactéries Lactiques .In : Federighi M : Bactériologie alimentaires .Ed, Economica , paris (France). pp :219-240.
- Prescott et al (2003). *microbiologie*. 2ème Edition française. Traduction de la 5ème Edition américaine par Claire-Michelle-Bacq-Calberg et Jean Dussart. Edition de Boeck-
- Priyanka, S. et Prakash, A. (2009). Screening of Lactic Acid Bacteria for Antimicrobial Properties Against *Listeria monocytogenes* Isolated from Milk Products at Agra Region. *Internet Journal of Food Safety*, 11:81-87
- QUERIN. S., VALIQUETTE. L., 2000- Physiopathologie des maladies du rein et des voies urinaires. Maloine, Canada.

- Raynaud. S. (2006). Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de Doctorat, Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries Toulouse N° d'ordre : 826 pages : 309
- Raynaud. S. (2006). Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de Doctorat, Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries Toulouse N° d'ordre : 826 pages : 309
- Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK (2003) Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev.* (4):658-72.
- Renouf V., Claisse O., Miot-sertier C. et Lonvaud-funel A. (2006) : lactic acid bacteria evolution during Winemaking : use of rpoB gene as a target for PCR-dgge analysis. *Food Microbiol.* 23:136-145.
- Riaz B, Khatoon H (2013) Evaluation of the use of cephalosporin antibiotics in pediatrics. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 3 (04), 063-066
- Ronald A. (2002). The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med*, 113(Suppl 1A):14S-9S.
- Sahnouni F, Matallah Boutiba A, Chemlal D and Boutiba Z (2012) Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of Marine fish in the Oran Algeria coast. *African journal of Microbiology Research.* 6 (13) : 3125-3133.
- Sánchez J. et al., 2007. Antimicrobial and safety aspects and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci Aguilar-Galvez A., Dubois-Dauphin R., Destain J. et al. isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.*, 117, 295-305.
- Schlegel L, Grimont F, Ageron E, Grimont PA, Bouvet A: Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003, 53:631-645.
- Schnurer J., et Magnusson. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Food Sc. Technol.* 16:70-78.
- [Science Photo Library Ltd. \(2012\). Science Photo Library: Klebsiella oxytoca bacteria; \[accessed 2012 Feb 14\].](#)
- Selvamohan T, Sujitha S (2010) Antimicrobial activity of a probiotic *Lactobacillus Plantarum* against urinary tract infection (UTI) causing pathogens. *Der Pharmacia Lettre*, 2(5): 432-440
- Shah N.P., 2007. Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* 17 : 1262-1277.

- Sharpe ME (1979) Identification of lactic acid bacteria, In: Skinner F.A., Lovelock D.W., (Ed), identification methods for microbiologists. Academic Press, London, 233-259.
- Smith, J. L., P. M. Fratamico & N. W. Gunther, (2007) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis* 4: 134-163.
- Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME and Holt JG (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. In Williams & Wilkins, Baltimore.
- Spurbeck, R. R., and C. G. Arvidson. 2010. *Lactobacillus jensenii* surface-associated proteins inhibit *Neisseria gonorrhoeae* adherence to epithelial cells. *Infect. Immun.* 78(7):3103-3111.
- Stéphanie VORKAUFER ( Le 07 Décembre 2011). Les infections urinaires communautaires bactériennes de l'adulte : Prise en charge diagnostique et thérapeutique. THÈSE pour obtenir le grade de DOCTEUR EN MÉDECINE, Présentée et soutenue publiquement dans le cadre du troisième cycle de Médecine Générale, Université Nancy 1, Faculté de Médecine.
- Stiles et al; 1997. ME, Biopreservation by lactic acid bacteria Antonie Van leeuwenhoek 1997 ;70 :33-345.
- Stiles M.E. et Holzapfel W.H., 1997. *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy.* *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.
- Svec, P., M. Vancanneyt, J. Koort, S. M. Naser, B. Hoste, E. Vihavainen, P. Vandamme, J. Swings, and J. Björkroth. 2005. *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:2479-84.
- Tagg JR, Mc Given AR (1971) Assay system for bacteriocins. *Journal of Applied Microbiology* 21: 943
- Tambekar DH, Bhutada SA, Choudhary SD and Khond MD (2009) Assessment of potential probiotic bacteria isolated from milk of domestic animals. *J Appl Biosci.* 15: 815–819.
- Tamime A.Y., 2002. Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366
- Terzaghi BE and Sandine WE (1975) Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29 : 807-813.
- Thomas TD, Pritchard GC (1987). Proteolytic enzymes of Dairy starter cultures. *FEMS Microbiol. Rev.* 46 : 245-268.
- Torriani S.;Zapparoli G .;Syzzi G (1999). Genetic and phenotypic diversity of saccharomyces ensuetric tostrains isolated from Amarone Wine.*Anatomic .van leeuvenhok* 75:207-215.
- Trautner BW, Hull RA, Arouiche ROD (2005) Colicins prevent colonization of urinary catheters. *J Antimicrob Chemother* 56: 413-415

- Tredez M et Louise H.( 2008). Méta- analyse des effets protecteurs des probiotiques sur la cancérogénèse colorectale chez les rongeurs. Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire.Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE. P 38-39.
- -Tredez M et Louise H.Méta-analyses des effets protecteurs des probiotiques sur la cancérogénèse colorectale chez les rongeurs .thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire.Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse .P38-39.
- Trouillet S. (2011) Physiopathologie des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. Mémoire : Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche école pratique des hautes études .102p. uncomplicated urinary tract infection in primary care: observational study. *BMJ*, 340:b5633.
- Vijaya Swetha V, Sreenivasa Rao U, Hema Prakash P and Subbarayudu S (2014) Aerobic bacteriological profile of urinary tract infections in a tertiary care hospital. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 3(3): 120-125
- Vollenweider,S.,2004.3-hydroxypropionaldehyde :application and perspectives of biotechnological production *Appl.Microbiol,biotech.*,64 :16-27.
- Wiles, T. J., R. R. Kulesus & M. A. Mulvey, (2008) Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 85: 11-19.
- Yanagida F, Chen YS, Onda T, Shinohara T (2005) Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28-1, isolated from soil. *Lett. Appl. Microbiol.*, 40: 430-435.
- Younes, J. A., H. C. van der Mei, H. E. van den, H. J. Busscher, and G. Reid. 2012. Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli. *PLoS. One*. 7(5):e36917.
- Zalan Z.Barath A.,Halasz A.,2005.influence of growth medium on Hydrogen peroxide and bacteriocin production of lactobacillus strains.*food Technol.Biotch.*,43(3) :219-225.

# *Annexes*

---

# ANNEXES

## Annexe I

### Milieu MRS (De Man, Rogosa and Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
Glucose	20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
MnSO <sub>4</sub>	0,05 g
Cystéine-HCl	0,5 g
Eau distillée	1000 ml
pH =6,8	
Autoclavage 120°C, 20 min	

### Milieu MRS-BCP Sans Extrait De Viande

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
Glucose	20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
MnSO <sub>4</sub>	0,05 g
Pourpre de bromocrésol	0,025 mg
Eau distillée	1000 ml
pH =6,8	
Autoclavage 120°C, 20 min	

### Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)

Extrait de levure	2,5 g
-------------------	-------

Extrait de viande	5 g
Lactose	2 g
Biopolytone	5 g
Peptone papaïnique de soja	5 g
Acide ascorbique	0,5 g
Acétate de sodium	1,8 g
L-Arginine	4 g
Pourpre de bromocrésol	0,05 g
Agar	10 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH 6,5	
Autoclavage 120°C, 20 min	

#### **Milieu chapman**

Peptone	10g
Extrait de viande	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g
Rouge de phenol	0.025g
Agar	15g
pH 7.4	
Autoclave 120° C, 20min	

#### **Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)**

Infusion de viande de bœuf	3000 cm <sup>3</sup>
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar-agar	17 g
pH=7.4	
Autoclavage 120°C, 20 min	

#### **Bouillon nutritive (par litre)**

EXTRAIT DE VIANDE	1 g
EXTRAIT DE LEVURE	2 g
PEPTONE	5 g

CHLORURE DE SODIUM 5 g  
pH =7.4  
Autoclavage 120°C, 20 min

### **Gélose nutritive (par litre)**

EXTRAIT DE VIANDE 1 g  
EXTRAIT DE LEVURE 2 g  
PEPTONE 5 g  
CHLORURE DE SODIUM 5 g  
AGAR 15 g  
pH =7.4  
Autoclavage 120°C, 20 min

### **Eau physiologique**

Chlorure de sodium 8,5 g  
PEPTONE 0,5 g  
EAU DISTILLEE 1000 ml  
pH =7  
AUTOCLAVAGE : 120° C PENDANT 20 MINUTE

### **Lait écrémé**

LAIT ECREME 10 g  
EXTRAIT DE LEVURE 0.5 g  
Eau distillée 100 ml  
pH =7  
Autoclavage 120°C, 20 min

### **MILIEU M17 (TERZAGHI ET SANDINE, 1975)**

Peptone de caséine 10 g  
PEPTONE PEPSIQUE DE VIANDE 2,5 g  
PEPTONE PAPAÏNE DE SOJA 5 g  
Extrait de levure 2,5 g  
EXTRAIT DE VIANDE 5 g  
B-GLYCEROPHOSPHATE 19 g  
MGSO4 0,25 G  
LACTOSE 5 g  
ACIDE ASCORBIQUE 0,5 g  
  
AGAR-AGAR 20 g  
EAU DISTILLEE 1000 ML  
pH=7.2  
Autoclavage 120°C, 20 min

### **Eau peptonée**

PEPTONE EXEMPLE D'INDOLE 10 g  
CHLORURE DE SODIUM 5 g  
pH=7.2  
Autoclavage 120°C, 20 min

## **Annexe II**

### **Tampon phosphate de sodium**

Solution (a): 27,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dans 100ml d'eau distillée

Solution (b): 53,65g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$  dans 100ml d'eau distillée  
Tampon 0,1 M: 39ml (a) + 61 ml (b) + eau distillée

Stérilisation à 110° pendant 20mn

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20mn  
sauf ceux contenant le lait (110° C pendant 10 min).

### **Eau peptonée**

PEPTONE EXEMPLE D'INDOLE 10 g

CHLORURE DE SODIUM 5 g

pH=7.2

Autoclavage 120°C, 20 min

### **Tampon phosphate de sodium**

Solution (a): 27,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dans 100ml d'eau distillée

Solution (b): 53,65g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$  dans 100ml d'eau distillée  
Tampon 0,1 M: 39ml (a) + 61 ml (b) + eau distillée

Stérilisation à 110° pendant 20mn

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20mn  
sauf ceux contenant le lait (110° C pendant 10 min).

# ***PUBLICATIONS***

---



**REGULAR ARTICLE**

## ***In Vitro* antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's raw milk of Mostaganem (West Algeria) against Gram negative bacteria responsible for urinary tract infections**

Zergoug Amina\*<sup>1</sup>, Cheriguene Abderrahim<sup>1</sup>, Chougrani Fadela<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Mostaganem, B.P. 227, 27000 Mostaganem, Algeria

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received: 23 Feb 2016

Revised: 18 Mar 2016

Accepted: 25 Mar 2016

#### \*Corresponding Author:

Email: zergoug.amina@gmail.com

Phone: +213779727034

**Keywords:** Urinary tract infection - Gram negative - lactic acid bacteria - antibacterial activity - therapeutic agent - Bacteriocin-like

### ABSTRACT

Urinary tract infections (UTI) are a serious bacterial pathological challenges all over the world, leading to respiratory infections, that's why new strategies don't cease to develop. Lactic acid bacteria having shown beneficial effects for years in various areas, may prove to be excellent candidates in medical field. The current research focused on the selection of lactic acid bacteria having the potential of an antibacterial activity against Gram negative bacteria responsible for UTI, for an eventual use as a therapeutic agent. A total of 40 isolates were isolated from goat's raw milk of Mostaganem (West Algeria). *In vitro* tests were conducted in order to determine the efficiency of the isolates to produce antibacterial agents in interaction with uropathogens. Among 40 isolates, only 10 isolates identified as *Lactobacilli* and *Lactococci* were performant. The Screening showed that the inhibitor agent was proteinaceous substance. Therefore, it is noted that a treatment with presence of LAB is very encouraging as a result of the production of bacteriocin-like substance. On the other hand, LAB can be considered as a good alternative to the large extent to the antibiotics in the treatment of UTI.

### 1. Introduction

Urinary tract infections (UTI) are considered as a common clinical problem, having as causative microorganisms *Enterobacteria* which are Gram-negative bacilli, knowing as an important part of the bacteria isolated during the bacteriological diagnosis of UTI. Their abundance in the intestine, their mobility, and quickly multiplication explain that they are the most involved bacteria in human infectious diseases, where *Escherichia coli* represents 80% of cases followed by *Klebsiella sp*, and *Proteus sp* (El Fassi et al., 2013). Therefore, studies increased about the kinds of pathogens responsible

for UTIs and according to the emergence of antibiotic resistance phenomenon, the use of other therapeutic strategies became very important in order to help clinicians to choose the right treatment (Riaz et al., 2013). Medical interest on *Enterobacteria*, as a way of research, makes this bacterial group one of the best known and most studied. In recent period, probiotics are used in different areas from food to therapeutic uses, and have a beneficial effect for the antagonistic activity of metabolites that they secrete, raising a veritable interest against the invasion of uropathogens (Meziani, 2012

Among the antibacterial substances secreted by farms in the region of Mostaganem (Latitude: 35.8956, Longitude: 0.071433 35° 53' 44" North, 0° 4' 17" East) in the Western Algeria under aseptic conditions removed in sterile bottle, then transferred to the laboratory at 4°C.

the scientific research so as to reduce the resistance problem. Bacteriocins are usually specific to related bacteria, without being lethal to the productive strain with size lower than 10Kda, amphiphilic having the potential to act on the membrane of the target cells (Hernandez, 2005). Due to their nature, their diversity and their different mode of actions, these antimicrobial proteinaceous substances can be an interesting alternative among new therapeutic strategies in order to resolve the bacterial multiresistance to antibiotics (Trautner et al., 2005). During these last 20 years several axes were studied from the research of new producing isolates aimed to characterize these biomolecules (Djadouni et al., 2013)

In this study we investigated to isolate and identify by several tests, lactic acid bacteria collected from samples of goat's raw milk, then screening and studying the antagonistic activity of their metabolites against Gram negative pathogens such as *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolated from patients infected by urinary tract infections. The aim was to detect bacteriocins which are Gram positive able to be efficient and considered as a cure against the Gram negative pathogens.

## 2. Materials and Methods

### *Urine samples collection*

Morning urine samples were collected aseptically in sterile plastic tubes from patients in the Nephrology department of E.H.U.Oran (West Algeria) after verbal consent, then transferred to the laboratory at 4°C.

### *Isolation and identification of uropathogenes*

A full loop of urine samples was spread on MacConkey agar, then incubated at 37°C for 24h (Al-Jeboury, 2010). After incubation, a morphological examination was carried out in order to select the colonies to be characterized on the basis of microscopic, physiological and biochemical tests (MacFaddin, 2000). The identification of these uropathogenes was done according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath et al., 1986) and with API 20E kit.

### *Collection of samples for isolation of LAB*

03 Samples of goat's raw milk were collected from

### *Isolation and identification of lactic acid bacteria*

The Samples were incubated at 37°C until coagulation, then serial dilution were made in NaCl solution (0.85 w/v) (Bhardwaj et al., 2012). For the isolation of lactic acid bacteria, 0.1 mL of each dilution ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-9}$ ) was seeded in MRS and M17 agar mediums (De Man et al, 1960, Terzaghi and Sandine, 1975) for isolation and incubated under anaerobic conditions using a candle extinction jar at 37°C for 48h (Badis, 2004). Morphological examination was carried so as to pick off plates single colonies with similar color, size and shape before microscopic examination. Only rod shaped bacteria were spread on MRS and M17 agar mediums for purification (Bendimerad et al., 2012). MRS, M17 broths supplemented with 30% of glycerol were used for the conservation of the isolates at -20° for further uses (Mami et al., 2014). Afterward, the selection and characterization of isolates were done on the basis of morphological, physiological and biochemical tests.

Growth at different temperatures was done in MRS and M17 broths at 15° and 45°C (Carr et al., 2002). Effect of 4 and 6.5% of NaCl at pH 9.6 was performed in MRS and M17 broths (Carr et al., 2002). Hydrolysis of arginine was tested in M16BCP (Thomas et al., 1987). The fermentative profiling was done in Durham's bells on glucose broth (Azadnia et al., 2009).

The identification of isolates was done according to Bergey's manual of Bacteriology and Sharp (1979). Microplates were used in order to determine the sugar profile. MRS broth without meat extract and lactose supplemented with Bromocresol purple as an indicator was used. Each microplate received 0.1 ml of MRS-BCP medium, 10 µl of microbial cell previously washed with sterile saline solution (8g NaCl/L) and 10 µl of a solution of individual sugars sterilised, are added to a final concentration of 2%, then incubated at 37°C (Guessas et al., 2012).

### *Antagonistic activity of metabolites of lactic acid bacteria*

*In vitro* evaluation of antibacterial potential of lactic acid bacteria was carried out on solid medium

by the agar well diffusion assay (AWDA) according to Tagg and Mac Given (1971). A young bacterial suspension of the indicator bacteria was prepared, then seeded on nutrient agar (Menad et al., 2014). Wells of 6 mm of dimension were created using a steril cookie piece, then filled with 100 $\mu$ l from an overnight culture of the producer cell. After the incubation at 37°C/24h the appearance of a clear zone around the wells means a positive result (Barefoot and Klaenhammer, 1983).

#### Screening of bacteriocinogenic isolates

In order to detect the inhibitions of the sensitive isolates, the agar well diffusion assay described by Tagg and McGiven was performed (Tagg and Mac Given, 1971). Wells filled with 100 $\mu$ l from cell free supernatant (CFS) after centrifugation at 6000rpm for 15min from the producer bacteria. Plates were pre-incubated for 4h at 4°C, after that incubated at 37°C for 24h. A positive result was reflected by the appearance of a clear zone around the wells, that it means the inhibition of the indicator strain (Barefoot and Klaenhammer, 1983). CFS was adjusted to pH 7 with 1N NaOH to determine inhibition due to the acidity (Castro and al., 2011). Then to detect the inhibition due to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mg of catalase was added to the CFS (Herrerros et al., 2005). Concerning lytic phages, The method used was according to Hardy (1987). The inoculated plates were incubated at 37°C for 24h, the presence of clear zones of inhibition indicated an antimicrobial activity. The sensitivity to proteases was made by using CFS treated with pepsin, trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin at a rate of 1 mg / ml (Yanagida et al., 2005).

#### Kinetics of growth, Acidifying activity and pH determination

The isolates were inoculated in MRS and M17 broths for 24h/37°C, then centrifuged at 4000 rpm/5min. Skimmed milk was added to the pellet after being rinsed with peptone water (Franciosi, 2009). Afterward milk coagulation, the content was transferred into 100 ml of skimmed milk, the mixture was subsequently divided into tubes (Sahnouni, 2012). The determination of the acidity of each sample was made by titration with 1/9 NaOH after supplemented with drops of phenolphthalein until appearance of a persistent pink color. The initial and final pH was measured simultaneously using pH meter (Hanna). The kinetic of growth was carried out by measuring the OD at 600nm every 2 h through 24 h on MRS and M17 broths (Kihal, 1996).

### 3. Results

In the current research, *in vitro* antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated and identified from goat's raw milk against uropathogens was studied. The uropathogens isolates grown on MacConkey agar were Gram negative, catalase positive and rod-shaped. Further identification of uropathogens was carried out by API 20E kit, identified as *E. coli* (lactose ferment) which is unable to use citrate as carbon source and couldn't produce urease. *K. pneumoniae* (lactose ferment) is VP positive and *P. mirabilis* (non-lactose ferment) unable to make indole. These are the major properties distinguishing from other species. However, A total of 40 lactic acid bacteria were isolated from three samples of raw goat's milk, the isolates were mostly Gram positive, catalase negative. Results of acid fermentation from different sugars are shown in Table 1. The isolates were identified as described by Bergey's manual of Bacteriology (Sneath et al., 1986) and Sharp (1979). 18 isolates as *Lactobacillus*, 15 isolates as *Lactococcus* and 07 isolates as *Enterococcus*. Figure 01 illustrated the percentage of division of the identified isolates. All the lactococci isolates belonged to *Lactococcus lactis*. Concerning the genus *Lactobacillus* 5 strains were identified as *L. acidophilus*, 04 isolates were assigned as *L. plantarum*, also 04 isolates were identified as *L. rhamnosus*. Then, 02 isolates were identified as *L. casei* and finally 03 isolates were assigned to *L. delbrueckii*.

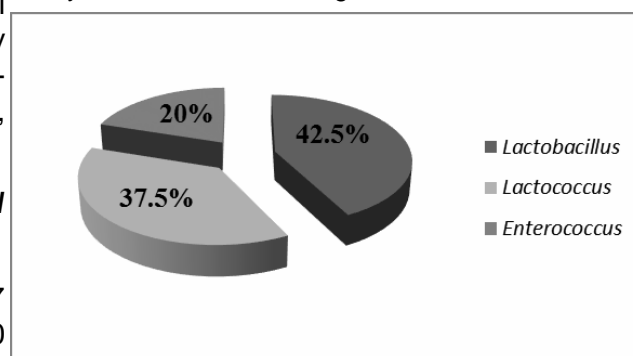


Figure 1: Repartition of isolates of raw goat's milk.

The second step consisted to evaluate antibacterial activity of the isolates on solid medium. We noted that the effect was bactericidal, only 10 isolates were selected for their antagonistic potential against uropathogens.

The inhibition diameters varied between (13  $\pm$  0.00 mm and 25  $\pm$  0.5 mm) (Table 2), as well the cell free supernatant of lactic isolates tested against uropathogens showed inhibition zones (Figure 02). The activity was also present after neutralization with

Isolates	1 LCM 1,5,7,30,35	2 LCM 13,18,22,40	3 LCM 4,6,11,21	4 LCM 2,9	5 LCM 16,33,38	6 MGM 3,8,10,12,14,17,2 3,24,25,27,31,32, 37,39
Morphology	White, circular and large	Cream, circular and compact	White and circular	White and circular	White and circular	Creamwhite
Gram	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-
ADH	+	-	-	+	-	-
Effect of NaCl						
4	+	+	+	+	+	-
6.5	-	-	-	-	-	-
Temperature						
15°C	+	+	+	+	+	-
45°C	-	-	-	-	-	+
Sugar profil						
Xylose	+	-	+	-	-	+
Maltose	-	+	+	-	+	-
Galactose	-	+	+	-	-	+
D-sorbitol	-	+	-	-	-	-
Arabinose	+	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	-	-	-
L-rhamnose	+	-	+	-	-	-
Sucrose	+	+	+	-	+	-
Lactose	+	+	+	-	+	+
D-fructose	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+

Table 1: Physiological and Biochemical characteristics of isolates.

1: *Lactobacillus acidophilus*, 2: *Lactobacillus plantarum*, 3: *Lactobacillus rhamnosus*, 4: *Lactobacillus casei*, 5: *Lactobacillus delbrueckii*, 6 : *Lactococcus lactis*

	Indicator isolates		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Control	00	00	00
LCM 5	15	13	13
LCM 7	15	17	14
LCM 22	13	15	14
LCM6	16	17	13
LCM 2	18	16	15
LCM 38	20	18	16
MGM 8	22	19	19
MGM 10	25	23	20
MGM 23	23	20	18
MGM 39	22	19	17

Table 2: Antagonistic activity of LAB against uropathogens.



Figure 2: Inhibitory zones of LAB against uropathogens. (a) Effect of *Lactobacillus* supernatant against *Proteus mirabilis* (b) Effect of *Lactococcus* supernatant against *Escherichia coli* (c) Effect of *Lactobacillus* supernatant against *Klebsiella pneumoniae*.

NaOH likewise after treatment with catalase. in order to cope with the pathogens responsible for urinary tract infections being resistant to antibiotics, the use of lactic acid bacteria can be very effective.

However after the addition of proteolytic enzymes the activity was lost (Table 3). The results obtained following the identification of uropathogenes were the similar to those obtained by Vijaya Swetha et al. (2014). Out of 40 positive isolates screened using MRS and M17 mediums, which were characterized by morphological, physiological and biochemical tests, only 10 isolates were selected. Among the 10 identified isolates, 4 belonged to the same specie *L. lactis* and 2 be-

**4. Discussion**

In a time where we are looking for new alternatives

	CFS	Catalase	Phages	Proteolytic enzymes
<b>Control</b>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+	-

Table 3: Screening of bacteriocinogenic isolates.  
+ : Growth; - : Inhibition

Isolates	Initial		Final	
	pH	Acidity °D	pH	Acidity °D
LCM 5	6.5	1.0	5.03	25
LCM 7	6.5	1.0	4.88	46
LCM 22	6.5	1.0	4.75	40
LCM6	6.5	1.0	4.80	43
LCM 2	6.5	1.0	4.50	50
LCM 38	6.5	1.0	4.50	50
MGM 8	6.5	1.0	5.01	28
MGM 39	6.5	1.0	5.07	20
MGM 23	6.5	1.0	5.06	23
MGM 10	6.5	1.0	5.08	19

Table 4: Evolution of pH and acidity in time.

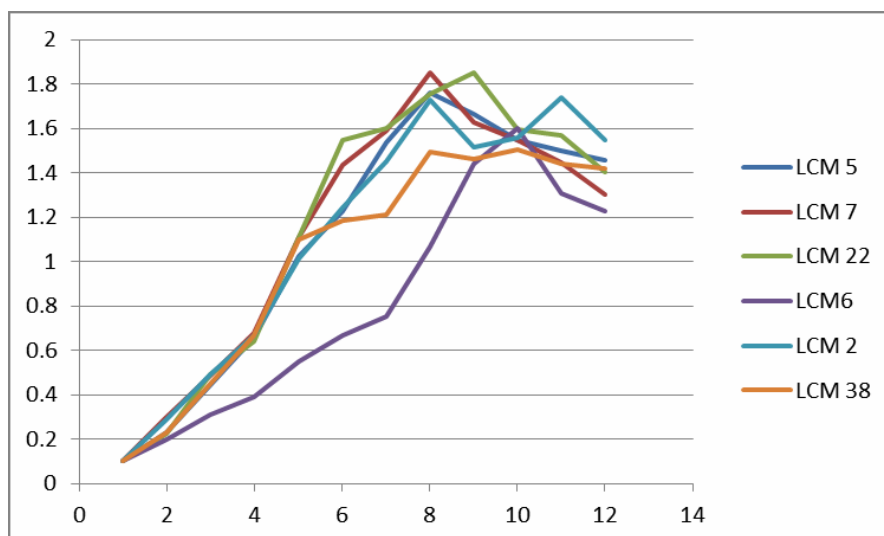


Figure 3: Kinetics of growth of *Lactobacilli*.

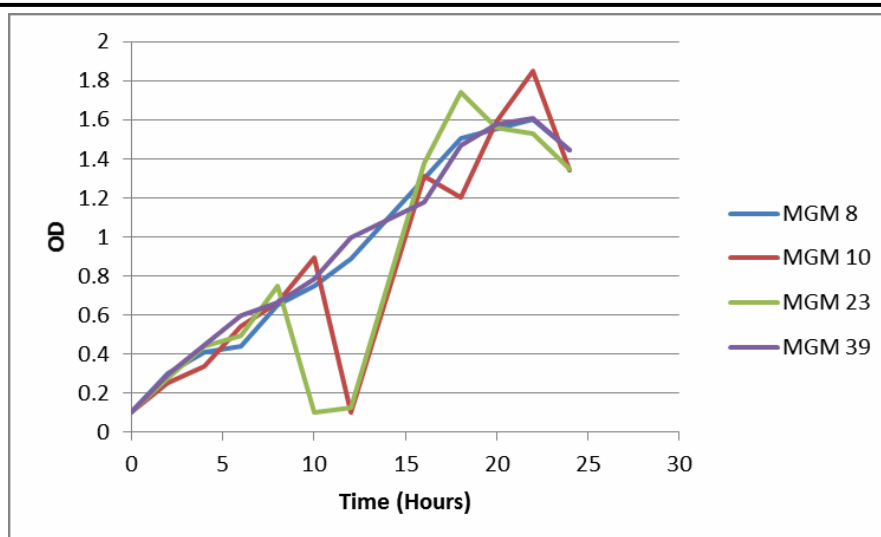


Figure 4: Kinetics of growth of *Lactococci*.

longed to *L. acidophilus*. The rest of the isolates were represented by *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei* and *L. delbrueckii*. The antimicrobial activity of LAB against uropathogens was investigated using agar well diffusion method. All the isolates had a strong inhibitory effect against the urinary pathogens, the *in vitro* antagonistic activity of LAB showed greater inhibitory zones. Both *Lactococcus* and *Lactobacillus* were effective against *Escherichia coli* (>20mm), However, the maximum inhibition zone has been registered in MGM 10 followed by MGM 23, 39, 8 and LCM 38, the least efficient was LCM 22. It was demonstrated by Reid (2003) that *E. coli* which is implicated with a high percentage in UTI about 80% of cases was sensitive to antimicrobial compounds of LAB. The results obtained for *Proteus mirabilis* and *K. pneumoniae* are just as considerable. Krishnendra et al. (2013) found similar results, unlike to the results of Naderi et al. (2014), which found no antagonistic activity against *K. pneumoniae*. The results of our work are in agreement with previous studies of Selvamohan et al. (2010) about *Lactobacilli* against *E. coli* having good inhibitions. Also the studies of Kumar et al. (2013) and Tambekar et al. (2009) are in agreement with ours. This inhibition is due to the antimicrobial metabolites of selected LAB against all the pathogens causing UTI in this work, such as hydrogen peroxid, organic acid or bacteriocins-like. After the screening of the isolates it has been demonstrated that the nature of the responsible agent was proteaceous, it means bacteriocin-like. Ours findings are consistent with those mentioned by Manzoor et al. (2016) and Lim et al. (2009) which found a broad spectrum of antimicrobial activity against tested uropathogens. The production of bacteriocins has been regarded as the key element in Medi-

tions has the necessity to the application of antimicrobial agents as an alternative to antibiotics (O'Shea et al., 2013). Most of Bacteriocins of LAB are effective against Gram positive, However in this study our isolates expressed a broad spectrum of activity against Gram negative pathogens, they showed greater potential, what a few studies demonstrated. The major inconvenient of some bacteriocins of Gram positive is that they are limited and unable to kill Gram negative pathogens (Deegan et al., 2006; Gillor et al., 2008). The evolution of pH and acidity was noted in the same time, when pH decreased, the acidity increased. LCM 2 and 38 have been the most acidifying unlike to other isolates. MGM 10, with values of pH ranging between 4.50 and 5.08. Our isolates of LAB that have been examined were found to be rather moderate acid producers, Mami et al. (2014) have obtained approximately the similar results, except, *Lactobacillus* which were higher acid producers than ours. Kivanç et al. (2011) also found moderate acid producer isolates from LAB of Boza. Moreover, Katina et al. (2002) have isolated strains more acidifying ranging up to 100°D. The kinetics of the isolates informed us about the existence of 3 phases: Latence (0-8h) up to 11h (MGM 23 and MGM 10), exponential phase up to 22h and finally the stationary phase. It noted that the latence phase was long enough due to the difficulty of adaptation to MRS and M17. Nevertheless, an excellent growth has been noted during the exponential phase with a OD > 1, which explained the presence of the necessary nutrients to the secretion and production of antimicrobial metabolites, which are the main actors responsible of inhibitions once in interaction with the uropathogens (Bouguettoucha et al., 2011).

## 5. Conclusion

It is concluded from the current research, that both *Lactobacillus* and *Lactococcus* isolated and identified from goat's raw milk (West Algeria) expressed strong antimicrobial activity against Gram negative causing urinary tract infections (*E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. mirabilis*) knowing that it's one of the most frequent bacterial infections. The isolates that showed antagonistic activity, possessed an inhibitor substance which it was from proteinaceous nature such as bacteriocin-like. According to our *In vitro* assays, these isolates demonstrated clearly a very interesting strategy in the treatment of UTI. We can show the significant effect of LAB considered as potential bacteriocin producers especially against Gram negative. Further studies of the *in vitro* selected candidates having antimicrobial peptides are encouraged to be continued.

## References

- Al-Jeboury GHA (2010) *In vivo* and *in vitro* Study of Probiotic Effect of *Lactobacillus acidophilus* on Pathogenicity of *Proteus mirabilis* isolated from Urinary Tract Infection (UTI). Journal of Biotechnology Research Center 4 (2) : 53-63
- Azadnia P, Khan Nazer AH (2009) Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of Fars province. Iranian Journal Of Veterinary Research, Shiraz university 10 (03) : 235-240
- Badis A (2004) Identification and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk from four local goat populations. State doctoral thesis, University of Oran.
- Barefoot SF, Klaenhammer TR (1983) Detection and activity of lactacin B, a Bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology 45 (6) : 1808-1815
- Bendimerad N, Kihal M, Berthier F (2012) Isolation, identification, and technological characterization of wild *Leuconostocs* and *Lactococci* for traditional Raib type milk fermentation. Dairy Sciences of Technology 92 (3) : 249-264
- Bhardwaj A, Punij M, Sangu KPS, Kumar S, Dhewa T (2012) Isolation and Biochemical Characterization of *Lactobacillus* species Isolated from Dahi. Journal of Dairy Science and Technology 2 (2) : 1-14
- Bouguettoucha A, Balannec B, Amrane A (2011) Models for Lactic Acid Fermentation, Food Technol Biotechnol 49 (1) 3-12
- Carr FJ, Chill D, Maida N (2002) The lactic acid bacteria : A literature survey. Crit. Rev. Microbiol 28 (4) : 281-370
- Castro MP, Palavecino NZ, Herman C, Garro OA, Campos CA (2011) Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages : Characterization of antibacterial compound and study of the factors affecting bacteriocin production. Meat science 87 (4) : 321-329
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) Medium of *Lactobacilli*. Journal Applied Bacteriology 23 (1) : 130-135
- Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P (2006) Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int Dairy J 16 (9) : 1058-1071
- Djadouni F, Kihal M (2013) Characterization and determination of the factors affecting anti-listerial bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from dairy milk products. African Journal of Food Science 7 (2) : 35-44
- El Fassi F, Moujahi A, Ben Rakkad N, El malki F, Barrijal S, Fessiwi K, Idaoma M (2013) Fréquence et résistance aux antibiotiques des bactéries uro-pathogènes à l'hôpital Saniat Rmel Tétouan. Science-Lib Editions Mersenne 5 : 2111-4706
- Franciosi E, Settanni L, Cavazza A, Poznanski A (2009) Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. International Dairy Journal 19 : 3-11
- Gillor O, Etzion A, Riley MA (2008) The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. Appl Microbiol Biot 81 : 591-606
- Guessas B, Adjoudj F, Hadadji M, Kihal M (2012) Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Their Major Technological Traits. World Applied Sciences Journal 17 (4) : 480-488
- Hardy KG (1987) Methods of studying colicins and their plasmids : In plasmids, IRL, press : 105-161
- Hernandez D, Cardell E, Zarate V (2005) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. Journal of Applied Microbiology 99 : 77-8
- Herrerros MA, Sandoval H, González L, Castro JM, Fresno JM, Tornadizo ME (2005) Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). Food Microbiol 22 : 455-459.
- Katina K, M Sauri, H.-L Alakomi, T Mattila-Sandholm (2002) Potential of Lactic Acid Bacteria to Inhibit Rope Spoilage in Wheat Sourdough Bread. Lebensm. Wiss. u. Technol 35 : 38-45
- Kihal M, Provost H, Lhotte ME, Huang DQ, Divies C (1996) Instability of plasmid encoded citrate permease in *Leuconostoc*. J.App Microbiol 22 : 219-223.
- Kivanç M, Yilmaz M, Çakir E (2011) Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. Turk J Biol 35 : 313-324
- Krishnendra Namal S, Sakshi D, Priyanka P, Priyanka S, Neelofar S, Jitendra N (2013) Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria from Dairy Products. Int. J. Pure App. Biosci 1 (1) : 28-32
- Kumar Pundir R, Neha kashyap SR, Kaur A (2013) Probiotic Potential of Lactic acid Bacteria Isolated from food Samples – an *in Vitro* study. J App Pharm Sci 3 (03) : 085- 093
- Lim IS, Lee HS, Kim WY (2009) The effect of lactic acid bacteria isolates on the urinary tract pathogens to infants *in vitro*. J Korean Med Sci 24 : 57-62
- MacFaddin JF (2000) Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Mami A (2014) Study of the Antimicrobial and Probiotic Effect of *Lactobacillus Plantarum* Isolated from Raw Goat's Milk from the Region of Western Algeria. International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR) 13 (1) : 18-27
- Manzoor A, Ul-Haq I, Baig S, Iqbal Qazi J, Serattic S (2016) Efficacy

- of Locally Isolated Lactic Acid Bacteria Against Antibiotic-Resistant Uropathogens. Jundishapur J Microbiol 9 (1) : 18952
- Menad N, Cheriguene A, Belarbi F, Hammouni R, Moghtet S (2014) The Antibacterial Activity of *Lactococcus lactis sbsp cremoris* against *Salmonella sp.* Journal of Medical Microbiology & Diagnosis 3 : 1
- Meziani M (2012) Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et Pseudomonas. Thèse de magister Spécialité : BIOCHIMIE. Université Mentouri Constantine
- Naderi A, Kasra-Kermanshahi R, Gharavi S, Imani Fooladi AA, Abdollahpour Alitappeh M, Saffarian P (2014) Study of antagonistic effects of *Lactobacillus* strains as probiotics on multi drug resistant (MDR) bacteria isolated from urinary tract infections (UTIs). Iran J Basic Med Sci 17 : 201-208
- O'Shea EF, Cotter PD, Ross RP and Hill C (2013) Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria. Current Opinion in Biotechnology 24 : 130-134
- Reid G, Jass J, Sebelsky MT, McCormick JK (2003) Potential uses of probiotics in clinical practice. Clin Microbiol Rev (4) : 658-72
- Riaz B, Khatoon H (2013) Evaluation of the use of cephalosporin antibiotics in pediatrics. Journal of Applied Pharmaceutical Science 3 (04) : 063-066
- Sahnouni F, Matallah Boutiba A, Chemlal D and Boutiba Z (2012) Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of Marine fish in the Oran Algeria coast. African journal of Microbiology Research. 6 (13) : 3125-3133
- Selvamohan T, Sujitha S (2010) Antimicrobial activity of a probiotic *Lactobacillus Plantarum* against urinary tract infection (UTI) causing pathogens. Der Pharmacia Lettre 2(5) : 432-440
- Sharpe ME (1979) Identification of lactic acid bacteria, In: Skinner F.A, Lovelock D.W, (Ed), identification methods for microbiologists. Academic Press, London, 233-259
- Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. In Williams & Wilkins, Baltimore.
- Tagg JR, Mc Given AR (1971) Assay system for bacteriocins. Journal of Applied Microbiology 21 : 943
- Tambekar DH, Bhutada SA, Choudhary SD, Khond MD (2009) Assessment of potential probiotic bacteria isolated from milk of domestic animals. J Appl Biosci 15 : 815-819
- Terzaghi BE, Sandine WE (1975) Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Applied Microbiology 29 : 807-813
- Thomas TD, Pritchard GC (1987). Proteolytic enzymes of Dairy starter cultures. FEMS Microbiol. Rev 46 : 245-268
- Trautner BW, Hull RA, Arouiche ROD (2005) Colicins prevent colonization of urinary catheters. J Antimicrob Chemother 56 : 413-415
- Vijaya Swetha V, Sreenivasa Rao U, Hema Prakash P, Subbarayudu S (2014) Aerobic bacteriological profile of urinary tract infections in a tertiary care hospital. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci 3(3): 120-125
- Yanagida F, Chen YS, Onda T, Shinohara T (2005) Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28-1, isolated from soil. Lett. Appl. Microbiol 40 : 430-4

