



DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

**MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES**

Présenté par :

ZAFRANE HOURIA

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES**

**Spécialité: Production et transformation laitières**

THÈME

Potentiel inhibiteur des  
bactéries lactiques

Devant les membres du jury

Président	Dr RECHIDI SIDHOUM Nadra	Maître de conférences	U. Mostaganem
Examineur	Dr TAHLAITI Hafida	Maître de conférences	U. Mostaganem
Encadreur	Dr DAHOU Abdelkader El amine	Maître de conférences	U. Mostaganem
Co – encadreur	MEGHOUFEL Naima	Docteur	U. Mostaganem

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales

Année universitaire 2019-2020

# Sommaire

Dédicaces

Remerciements

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction ..... 1

**Synthèse bibliographique.....**

**Chapitre 01 : 1-Les bactéries lactiques ..... 2**

1-1-Généralités sur les bactéries lactiques .....2

1-2-Différentes voies de fermentations lactiques .....3

1-3-Habitat et origine des bactéries lactiques..... 5

1-4- Taxonomie et classification des bactéries lactiques ..... 5

1-5-Les genres de la bactérie lactique ..... 5

1-5-1- Lactobacillus ..... 6

1-5-2-Lactococcus ..... 7

1-5-2-Streptococcus... .....9

1-5-4-Enterococcus ..... 9

1-5-5-Pediococcus ..... 10

1-5-6-Bifidobacterium..... 11

1-5-7-Leuconostoc ..... 11

1-6-Les aptitudes technologiques des bactéries lactiques ..... 12

1-6-1-Aptitudes acidifiantes ..... 13

1-6-2-Aptitudes protéolytiques..... 14

1-6-3- Aptitudes lipolytiques.....	15
1-6-4- Aptitudes aromatisants .....	15
1-5-5- Aptitudes texturantes .....	16
1-6-6-Activité antimicrobienne .....	16
1-7- Effets probiotiques des bactéries lactiques .....	17
<b>1. Mécanismes antimicrobiens des bactéries lactiques .....</b>	<b>18</b>
1.1. Agents antimicrobiens non protéiques .....	18
1.1.1. Les acides organiques.....	18
1.1.2. Le dioxyde de carbone CO <sub>2</sub> .....	19
1.1.3. Le peroxyde d'hydrogène.....	19
1.1.4. Le diacétyle .....	19
1.1.5. L'acétaldéhyde .....	19
1.1.6. Reutéline .....	20
1.1.7. La reutéricycline.....	20
1.1.8. L'acide pyroglutamique .....	20
1.2. Agents antimicrobiens protéiques : Les bactériocines .....	20
1.2.1. Définition de bactériocines.....	21
1.2.2. Classification des bactériocines .....	21
Classe I. Les l'antibiotique... ..	21
Classe II.....	21
Classe III.....	22
Classe IV .....	<b>22</b>
1.2.3. Le conditionnement des bactériocines .....	23
1.2.4. Mode d'action des bactériocines .....	24
<b>Chapitre III. Techniques d'étude de l'activité antimicrobiennes</b>	
<b>III. Techniques d'étude de l'activité microbienne chez les bactéries lactiques.....</b>	<b>26</b>
III.1. Méthode sélémentaires de criblage et d'évaluation du potentiel inhibiteur des bactérie: .....	26
III.1.1. méthode de culture en touche (Spot agar test).....	26
III.1.2. Méthode de diffusion sur disques (agar-disk diffusion method).....	26

III.3.3. Méthode des stries croisées (Cross streak method).....	27
III.3.4. Méthode des cylindres / douilles (Agar plug diffusion method).....	28
III.1.5. la méthode des puits (Agar well diffusion method).....	29
III.2. Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur .....	29
III. 2. 1. Inhibition due au peroxyde d'hydrogène.....	29
III.2.2 - Inhibition due à la production d'acides organiques.....	29.
III.2.3 -L'action de protéase .....	30.
III.2.4 - La stabilité thermique.....	30
<b>IV: Matériel et méthodes</b>	
1-Les souches utilisées	
1.1- Conservation des souches à long terme.....	31
Conservation de courte durée .....	31
1.2-Conservation de courte durée.....	31
1-3- Revivification et purification des souches bactériennes... ..	31
1-4- Tests de confirmation de l'identification des souches.....	32
a-Examen macroscopique.....	32
b-Examen microscopique .....	32
c- La coloration de Gram.....	32
d- La recherche de la catalase.....	32
2.1- Méthode directe de culture en touche (Spot agar test).....	33
2-2 la méthode indirecte des puits .....	33.
3- Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur.....	34
3-1- Inhibition due au peroxyde d'hydrogène .....	34
3-2 Inhibition due à la production d'acides organiques.....	34.
3-3- Recherche de substances inhibitrices de nature protéique... ..	34
3-3-1- Action de protéase .....	34
3-3-2- Stabilité thermique.....	34
Discussion.....	36.
Conclusion.....	39

Références bibliographiques .....	40
Annexes .....	43



*Dédicaces*

*Je dédie ce travail, avant tout,*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me  
portez depuis mon enfance et j'espère que votre  
bénédictioin m'accompagne toujours*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux  
tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices,  
bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.*

*Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur  
et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

*À mon frère Mohamed*

*À tous les membres de ma famille.*

*À tous mes enseignants depuis mes premières années  
d'études.*

*Houria*

## *Remerciements*

*Je tiens à remercier tout d'abord Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail. En second lieu,*

*je tiens à remercier mon encadreur Mr DAHOUA, pour la qualité de son encadrement, l'aide précieuse qu'il m'a apportée, ses conseils éclairés et les remarques constructives tout au long de la préparation de ce mémoire.*

*Je remercie vivement Dr RECHIDIS de m'avoir honorée pour présider ce jury.*

*Aussi, mes sincères remerciements à Dr TAHLAITH d'avoir acceptée d'examiner ce travail.*



*Je voudrais aussi remercier mon Co encadreur  
MELLE MEGHOUFEL Naïma ses précieux conseils  
et son aide lors de la rédaction de mon mémoire ses  
commentaires et suggestions ont été judicieux et  
appréciés.*

*Je remercie tous les enseignements de ma promotion  
en production et transformation laitière Mme  
TAHLAITI, Mme RECHIDI SIDHOUM, Mr  
DAHOU, Mr HOMRANI, Mr BOUCHERF, Melle  
MEGHOUFEL et Melle ZOUAOUI et tous ceux qui  
ont fourni une assistance et je souhaite beaucoup de  
succès pour moi et pour tous les étudiants et sans  
oublier l'ingénieur du Laboratoire, M Benharrat et  
mes camarades de la promotion.*

*Je tiens à remercier spécialement tous les amis avec  
qui j'ai passé les moments les plus mémorables et je  
leur souhaite en beaucoup de succès.*

*MERCI A TOUS...*



## Résumé

Les bactéries lactiques font naturellement partie de notre environnement et de notre alimentation. On reconnaît depuis longtemps leurs propriétés biotechnologiques leur rôle dans la bio-préservation des aliments. La recherche de souche bactéries lactiques productrices des substances antimicrobiennes a été entreprise à partir de souches lactiques, identifiées par MALDITOF/MS, appartenant à la collection du laboratoire **LSTPA**. Elles ont été testées pour leur effet antibactérien à l'encontre de bactéries pathogènes responsables d'infections humaines. L'effet inhibiteur est mis en évidence par la méthode directe de Fleming et *al* 1975 et la méthode indirecte de diffusion des puits, qui ont permis de détecter et d'observer les taux d'inhibition. L'agent responsable de l'inhibition a été recherché par la méthode de puits. Une production de bactériocines a été mise en évidence pour certaines souches lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Pediococcus*.

Mots clés : bactéries lactiques, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, bactéries pathogènes, bactériocines, activité antagoniste.

## Abstract

Lactic acid bacteria are a natural part of our environment and our diet. Their biotechnological properties have long been recognized as their role in the bio-preservation of magnets. The search for lactic acid bacteria strain producing antimicrobial substances was undertaken from lactic acid strains, identified by MALDI TOF / MS, belonging to the collection of the LSTPA laboratory. They have been tested for their antibacterial effect against pathogenic bacteria responsible for human infections. The inhibitory effect was demonstrated by the direct method of Fleming et al 1975 and the indirect well diffusion method, which made it possible to detect and observe the inhibition levels. The agent responsible for the inhibition was tested for by the well method. A production of bacteriocins has been demonstrated for certain lactic acid strains belonging to the genera *Lactobacillus* and *Pediococcus*.

Key words: lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, pathogenic bacteria, bacteriocins, antagonist activit

تعد بكتريا حمض اللاكتيك جزءا طبيعيا من بيئتنا و نظامنا الغذائي لطالما تم الاعتراف بخصائص التكنولوجيا الحيوية الخاصة بها على أنها دورها في الحفاظ الحيوي للمغناطيس.

تم إجراء البحث عن سلالة بكتيريا حمض اللاكتيك المنتجة لمواد مضادة للمكروبات من سلالات حمض اللاكتيك التي حددتها IALDI TOF/ MS تنتمي إلى مجموعة مختبر LSTPA تم اختبارها لتأثيرها المضاد للبكتيريا ضد البكتيريا المسببة للأمراض المسؤولة عن العدوى البشرية

تم توضيح التأثير المثبط من خلال الطريقة المباشرة ل Fleming et al 1975 وطريقة نشر البئر غير المباشرة والتي جعلت من الممكن اكتشاف ومراقبة مستويات التثبيط .

تم اختبار العامل المسؤول عن التثبيط بواسطة طريقة البئر تم إثبات إنتاج بكتريوسينات لبعض سلالات حمض اللاكتيك التي تنتمي إلى جنس *Lactobacillus Pediococcus*

الكلمات المفتاحية: بكتريا حمض اللاكتيك , *Lactibacillus Pediococcus* , البكتيريا المسببة للأمراض , لبكتيريا نشاط مضاد .

## Liste des figures

<b>Figure 01 :</b> Principales voies métaboliques des bactéries lactiques .....	4
<b>Figure 0 2:</b> Observation au microscope électronique à transmission de <i>Lactobacillus</i> .....	7
<b>Figure 03:</b> Observation au microscope électronique à balayage de <i>Lactococcus lactis</i> .....	8
<b>Figure 0 4:</b> Observation au microscope électronique à balayage de <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	9
<b>Figure 05:</b> Observation au microscope électronique <i>Enterococcus faecium</i> .....	10
<b>Figure 0 6:</b> Observation au microscope électronique à balayage de <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	10
<b>Figure 0 7:</b> Observation au microscope électronique à balayage de <i>Bifidobacteriu manimalis</i> .....	11
<b>Figure 08:</b> Observation au microscope électronique de <i>Leuconostoc mesenteroïdes</i> .....	12
<b>Figure 09 :</b> Observation de résultats d'un test par la méthode des disques pour l'inhibition de <i>Candida albicans</i> .....	25
<b>Figure 10 :</b> Observation de résultats d'un test d'inhibition par technique de stries croisées d'une souche d'actinomycètes (strie centrale) inhibant différentes souches de bactéries pathogènes et leur test négatif (contrôle négatif) .....	27
<b>Figure 11:</b> Observation de résultat d'un test d'inhibition de <i>Candida albicans</i> par la méthode des cylindres .....	28
<b>Figure 12:</b> Observation des résultats du test d'inhibition de souches de (A) <i>Staphylococcus aureus</i> (B) <i>Streptococcus viridans</i> et (C) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par un actinomycète .....	29
<b>Figure 13 :</b> Activité inhibitrice de 4 souches lactiques vis-à-vis de <i>Pseudomonas aerugina</i> .....	37
<b>Figure 14 :</b> Zones d'inhibition des souches lactiques vis-à-vis de la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	37

## Liste des tableaux :

**Tableau 01.** Les principaux genres des bactéries lactiques et les caractéristiques physiologiques qui forment la base de la classification et de l'identification .....6

**Tableau 02 :** Principaux produits obtenus grâce aux aptitudes des bactéries lactiques...  
..... 13

**Tableau 03 :** Classification des bactériocines..... 23

# Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**Asn** : Asparagine

**Ac** : *Aerococcus*

**Cb** : *Carnobacterium*

**C +G**: Cytosine +guanine

**EMP: EMbden** Meyerhof Parnas

**EPS**: exopolysaccharides

**E**: Enhancing

**E-C** : Echirichai – Coli

**Ec** : *Enterococcus*

**FPC**: Fructose 6-phospho-cétolase

**GRAS**: Generally Recognized As Safe

**Gly** : glycine

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Peroxyde hydrogène

**KDa**: killo Dalton

**Lb**: *Lactobacillus*

**Lc** : *Lactococcus*

**Ln** : *Leuconostoc*

**mg/L** : milligramme par litre

**μL** : Microlitre

**M17** : gélose de Terzaghi

**MRS**: De Man, Rogosa et Sharpe

**MALDI-TOF MS**: Matrix-assisted laser desorption/ionization –time of mass spectrometry

**NaCL** : Chlorure de sodium

**Oe.** *Oenococcus*

**Pc** : *Pediococcus*

**Ppm** : partie par million

**PH** : Potentiel hydrogène

**Sc** : *Streptococcus*

**S**: Synergy

**Tc** : *Tetragenococcus*

**Tyr** : tyrosine

**Vc**: *Vagococcus*

**Val** : Valine

**We**: *Weissella*

**ZI**: zone d'inhibition



# Introduction

## Introduction

Ces dernières années une grande importance a été donnée à la recherche et le développement d'agents antimicrobiens, et une grande attention a été portée au potentiel inhibiteur des bactéries lactiques contre les divers agents pathogènes et contaminants dans le domaine de l'agroalimentaire.

Les bactéries lactiques avec leur statut "GRAS" (Generally Recognized As Safe) jouent un rôle important dans la fermentation et la conservation des aliments, que ce soit en tant que microflore naturelle ou comme cultures ajoutées sous des conditions contrôlées, et sont couramment employées dans la préparation de nombreux aliments fermentés (yaourts, laits fermentés, fromages...). En plus de leur rôle technologique, la contribution la plus importante de l'ajout de ces souches au produit est l'amélioration de sa qualité (saveur, texture) et son innocuité en inhibant les flores d'altération et pathogène (**Mechai, 2009**).

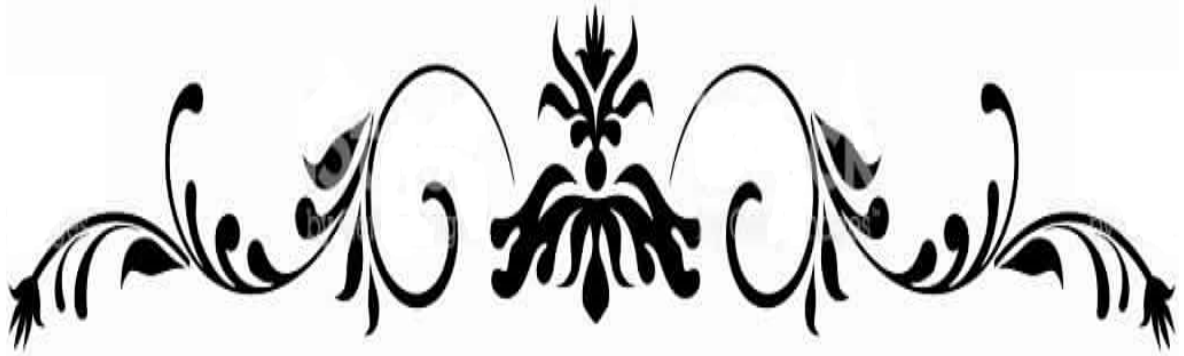
L'activité antagoniste des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes comme *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *Echerichia coli*, a été confirmée par plusieurs études menées dans ce sens Cette activité antimicrobienne des bactéries lactiques dépendent de plusieurs critères : le pH, le milieu de croissance et la capacité de produire des substances inhibitrices comme les bactériocines, les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène (**Huttunen et al, 1995**).

L'intérêt des agents antimicrobiens issus des bactéries lactiques réside d'une part dans leur effet antagoniste et son spectre d'action et d'autre part dans leur sûreté pour la santé humaine, car ils sont sensibles aux protéases digestives, et ils sont non toxiques pour les cellules eucaryotes. Ils ont également la capacité de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou altérantes, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables. Tous ces critères suggèrent qu'ils peuvent être idéals dans la lutte contre les infections microbiennes alimentaires (**Mehidi, 2015**).

L'objectif de ce travail consiste à évaluer le potentiel antimicrobien de bactéries lactiques vis-à-vis de certains germes pathogènes par la comparaison de résultats de tests de l'activité antagonistes souches lactiques de différentes origines



# Synthèse bibliographique



Chapitre 01 :

Les bactéries lactiques



## **1- Les bactéries lactiques**

### **1-1- Généralités sur les bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle. Elles constituent un groupe hétérogène (**Stackebrandt et Goebel, 1994**). Elles ont en commun la production d'acide lactique comme. Ces bactéries sont ubiquistes, elles sont présentes dans de différentes niches écologiques (**Drouault et Corthier, 2001**). Elles jouent un rôle important dans notre santé car elles constituent une partie importante de notre flore intestinale et tapissent les muqueuses nasales et buccales, contribuant ainsi à nous protéger contre l'invasion des germes pathogènes.

Elles sont utilisées depuis des siècles et de manière empirique, en tant que ferments pour transformer les aliments. Leur usage est fréquent pour fabriquer des produits laitiers (fromage, yaourt...). Elles présentent un grand intérêt biotechnologique grâce à leur fermentation lactique, leur acidification du milieu, la production de différents arômes, ainsi que la production d'enzymes permettant d'améliorer la digestibilité des aliments et enfin leur capacité à inhiber des micro-organismes qu'ils soient pathogènes ou d'altération (**Holzappel et al. 1996**).

Les bactéries lactiques sont retrouvées sous forme de cocci (exemple : *Streptococcus* et *Lactococcus*), des bâtonnets (*Lactobacillus*) et des *coccobacilles* (**Roissart, 1994**). Elles sont en générale aérotolérantes, cependant, certaines espèces qui colonisent par exemple le tube digestif des animaux sont anaérobies strictes, même en présence d'O<sub>2</sub>, elles sont incapables de réaliser la phosphorylation oxydatives. Elles sont positives à la coloration de Gram, généralement immobiles et a sporulées (**Delaglio et al. 1994**). Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochromes oxydase. De plus, elles ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux (**Delaglio et al. 1994**).

Les bactéries lactiques sont des procaryotes hétérotrophes et chimio-organotrophes, elles sont considérées comme un des groupes bactériens les plus exigeants du point de vue nutritionnel parce qu'elles requièrent non seulement des substances complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés mais aussi des facteurs de croissances comme les vitamines et les oligoéléments qui jouent un rôle de coenzymes (**Luquet, 1986**). L'énergie des bactéries

lactiques est tirée de la phosphorylation du substrat au cours de la fermentation des sucres. Cette transformation génère d'une à deux molécules d'ATP en fonction de la voie métabolique homo ou hétérofermentaire suivie (**Raimbault, 2005**).

En effet, les bactéries homolactiques strictes produisent uniquement de l'acide lactique en suivant la voie D'Embden-MeyerhofParnas, alors quelles bactéries hétéro-lactiques peuvent produire de l'acide acétique, de l'éthanol et du dioxyde de carbone en plus de l'acide lactique suivant la voie des pentoses phosphates (**Prescott et al ; 2003**).

### 1-2-Différentes voies de fermentations lactiques

La voie d'EMbden Meyerhof Parnas (EMP) ou dite voie de la glycolyse, est observée chez les genres *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* et certaines espèces de *Lactobacillus*, cette fermentation donne 2 molécules d'acide lactate et 2 molécules d'ATP par molécule de glucose catabolisé (**Rattanachaikunsopon et Phumkhachorn, 2010**). Divers hexoses comme le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le lactose ou le saccharose peuvent être oxydés par cette voie.

La fermentation hétérolactique, quant à elle, appelée voie des pentoses phosphates permet d'avoir une seule molécule d'ATP mais aussi de l'acide lactique, du CO<sub>2</sub>, de l'acétate, de l'éthanol et en plus faible proportion et selon le substrat initial catabolisé, de l'acide acétique et du glycérol. Les genres de bactéries lactiques qui empruntent cette voie sont : *Weissella*, *Leuconostoc* et certaines espèces de *Lactobacillus* (**Rattanachaikunsoporn et Phumkhachorn, 2010**). Cette voie peut être facultative pour certaines espèces qui sont homofermentaires pour la fermentation des hexoses, mais dans certaines conditions suivent la fermentation hétérolactique (**Axelsson, 2004**).

Il existe d'autres voies métaboliques que certaines bactéries lactiques suivent pour leur fermentation, comme la voie bifide ou FPC (Fructose 6-phospho-cétolase) empruntée par les bactéries du genre *Bifidobacterium* et qui permet d'avoir 1,5 molécule d'acétate et 2,5 molécules d'ATP à partir d'une molécule d'hexose consommée (**Dridier et Prevost, 2009**), ou la voie des citrates, à l'origine de composés carbonés volatils conférant un arôme particulier aux aliments fermentés.

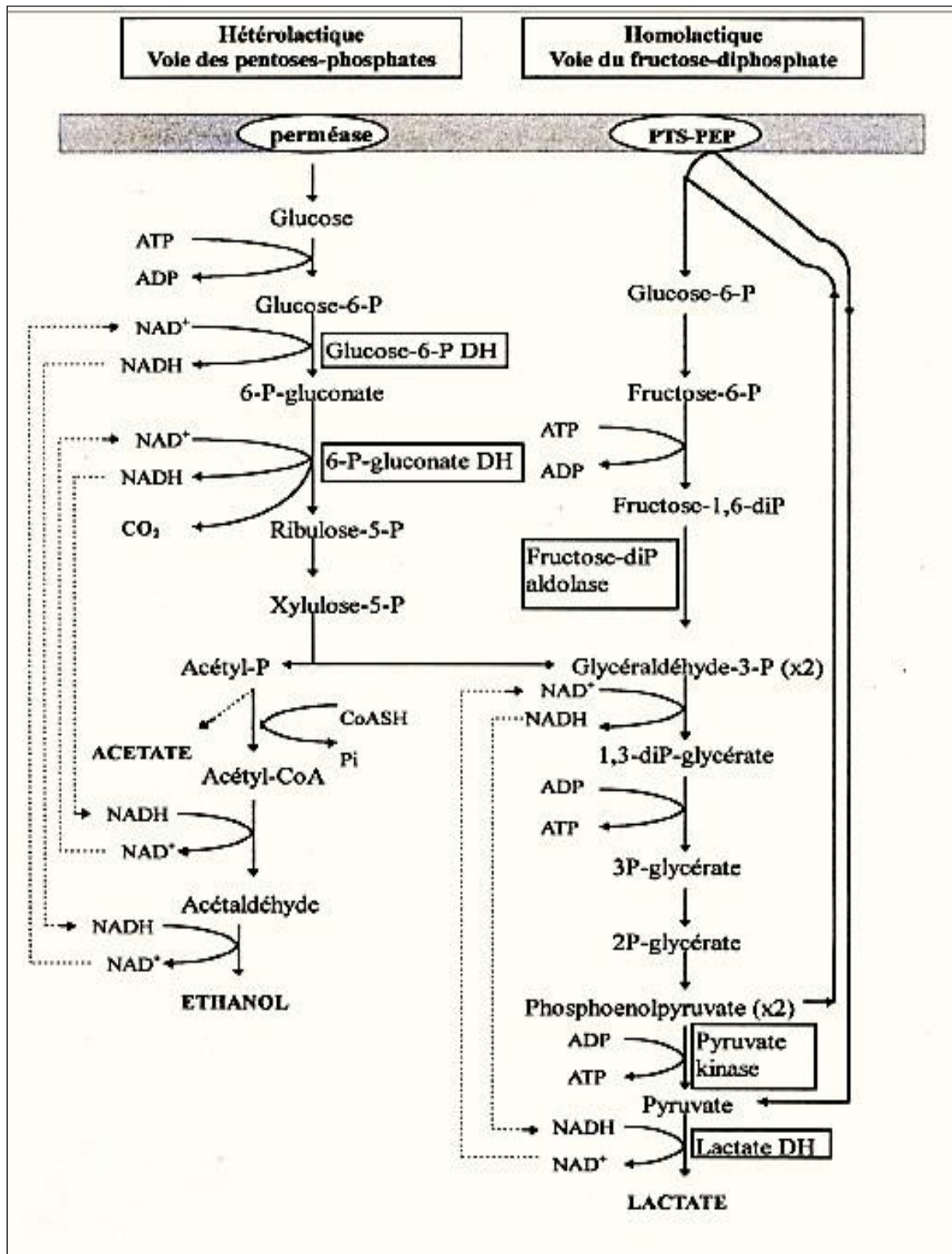


Figure 0 1 : Principales voies métaboliques des bactéries lactiques (Desmazeud et Roissart, 1994).

**1-3-Habitat et origine des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait et des produits laitiers, de la viande et des végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Leveau et Bouix, 1993); (Hassan et Frank, 2001).

**1-4- Taxonomie et classification des bactéries lactiques**

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique et biochimique classique demeurent inévitables dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à :

- Fermenter les hydrates de carbone.
- Tolérer différentes concentrations de bile.
- Produire des polysaccharides extracellulaires.
- Exiger des facteurs de croissance.
- Produire de l'acétone et synthétiser certaines enzymes.

La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique du lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Vandamme, 1996) ; (Stiles et Holzopfel, 1997) ; (Ho et al. 2007). Selon le Bergey's manual of systematic bacteriology , les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des *Firmicutes*, la classe des *Bacilli* et L'ordre des *Lactobacillales* renferment trente-cinq genres répartis sur six familles. (*Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae*) (Ludwig et al. 2009).

**1-5-Les genres de la bactérie lactique**

Les principaux genres des bactéries lactiques, les caractéristiques physiologiques qui forment la base de leurs classifications sont présentés sur le (tableau 01).

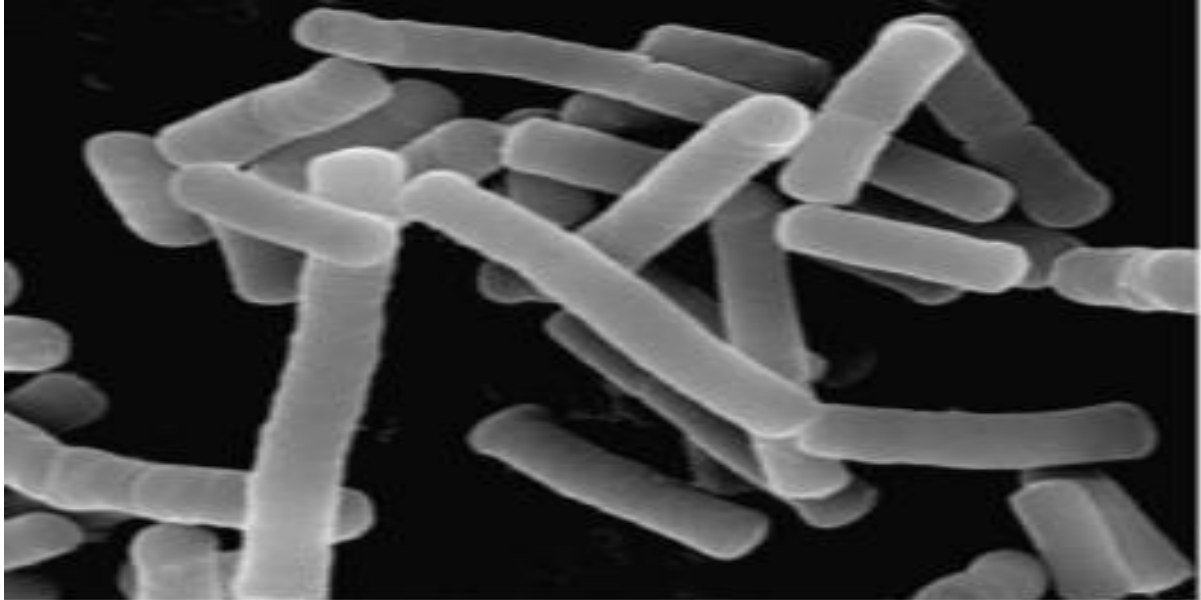
**Tableau 01** : Les principaux genres des bactéries lactiques et les caractéristiques physiologiques qui forment la base de la classification et de l'identification (**Matamoros, 2008**)

Genre	Forme de la cellule	Type de fermentation	Configuration de l'acide lactique	Espèce type
<i>Aerococcus</i>	Coques	Homofermentaire	L(+)	<i>Ac. Viridans</i>
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles			
<i>Enterococcus</i>	Coques	Hétérofermentaire	L(+)	<i>Cb. Divergens</i>
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaire	L(+)	<i>Ec. foecalis</i>
	Coques	Homo ou hétéro-fermentaire	D(-), L(+) ou	<i>Lb delbrueckii</i>
	Coques			
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaire		Lc.lactis
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétérofermentaire	D /L	Ln.mesenteroides
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétérofermentaire	L(+)	Oe.oini
<i>Pediococcus</i>	Coques	Homofermentaire	D(-)	Pc.damnosus
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaire	D(-)	Sc.salivarius
<i>Tetragenococcus</i>	Ovoïdes	Homofermentaire	D /L ou L(+)	Tc.halophilus
<i>Vagococcus</i>	Petits	Homofermentaire	L(+)	Vc.fluvialis
<i>Weissella</i>	bacilles	Hétérofermentaire	L(+)	We.viridescens
			D /L ou D(-)	

### 1-5-1- Lactobacillus

*Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries agroalimentaires ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, a sporulés, à catalase négative, se développant à un optimum de température situé entre 30 et 40°C Les *lactobacilles* sont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en

vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990).



**Figure 0 2:** Observation au microscope électronique à transmission de *Lactobacillus sp* (GX10000) (Boumediene, 2013)

### **1-5-2-Lactococcus**

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits «lactique», car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet et al. 2005). Les *lactocoques* se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que d'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, et sont capables de se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

Le genre *Lactococcus* comporte plusieurs espèces et sous espèces. Les trois espèces suivantes sont utilisées dans l'industrie laitière : *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* (Teuber et al. 1995).



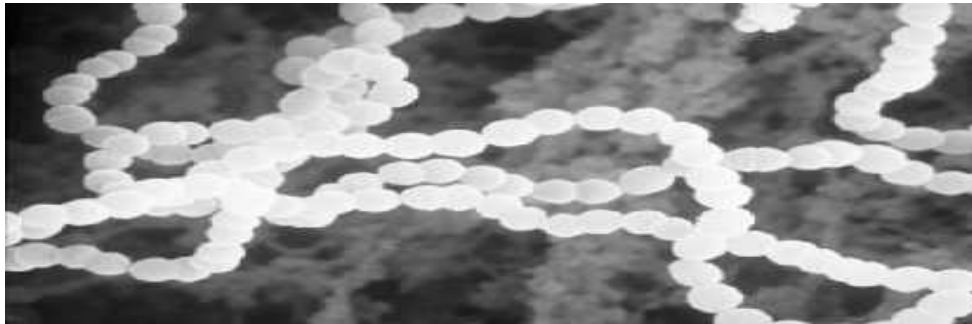
**Figure 0 3:** Observation au microscope électronique à balayage de *Lactococcus lactis* (GX10000) (Teuber et Geis, 1989).

**1-5-3-Streptococcus**

Ce genre comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus agalactiae* d'autres sont impliquées dans la formation de la plaque dentaire (*Streptococcus. mutans*).

La seule espèce utilisée en biotechnologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* (Hols et al. 2005), elle est isolée du lait, et des levains artisanaux (Bekhouche, 2006). Sa température optimale de croissance est d'environ 42°C. Cependant, elle est incapable de croître à des valeurs de pH supérieures à 9,6, à une concentration égale ou supérieure à 4% (p/v) de NaCl et en présence de 0,1% (p/v) de bleu de méthylène. Cette espèce produit de l'acide lactique uniquement à partir de quelques sucres (fructose, glucose, mannose, lactose et saccharose) (Klaenhammer et al, 2002) et de l'acétaldéhyde à partir de certains acides aminés comme la thréonine issue de la protéolyse (Roissart et Luquet, 1994).

Les cellules sont généralement, de formes sphériques ou ovoïdes disposées par paires ou en chaînes. La formation de chaîne est plus clairement observée dans des cultures liquides, et il est difficile de distinguer ce genre des *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus* sur une base morphologique (Wijtzes et al. 199).

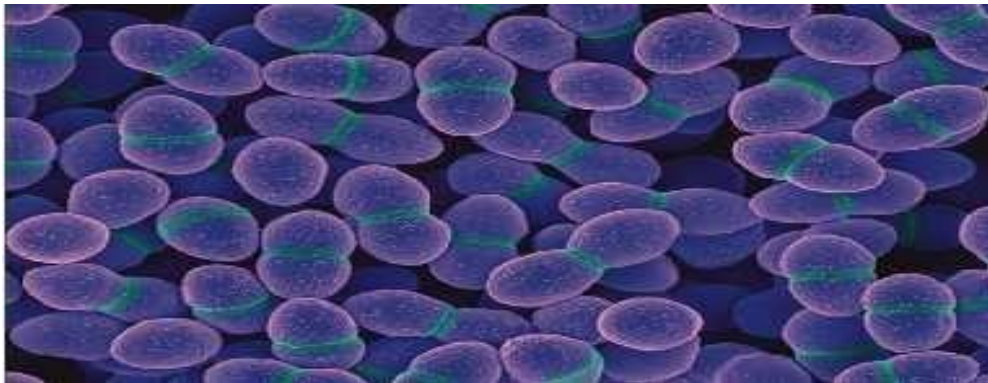


**Figure 4:** Observation au microscope électronique à balayage de *Streptococcus thermophilus* (GX7000) (Vendramin et al. 2017)

**1-5-4-Enterococcus**

Les entérocoques sont des bactéries de forme cocci ovoïdes à Gram positif se présentant isolées, en paires, en chaînes courtes ou disposées en groupes, en particulier si la morphologie des cellules est étudiée à partir des cultures cultivées sur un support solide. Les cellules sont souvent allongées dans la direction de la chaîne. Les entérocoques peuvent jouer un rôle bénéfique dans la maturation et le développement de l'arôme de certains produits alimentaires traditionnellement fermentés tels que les fromages et la charcuterie. Elles sont également

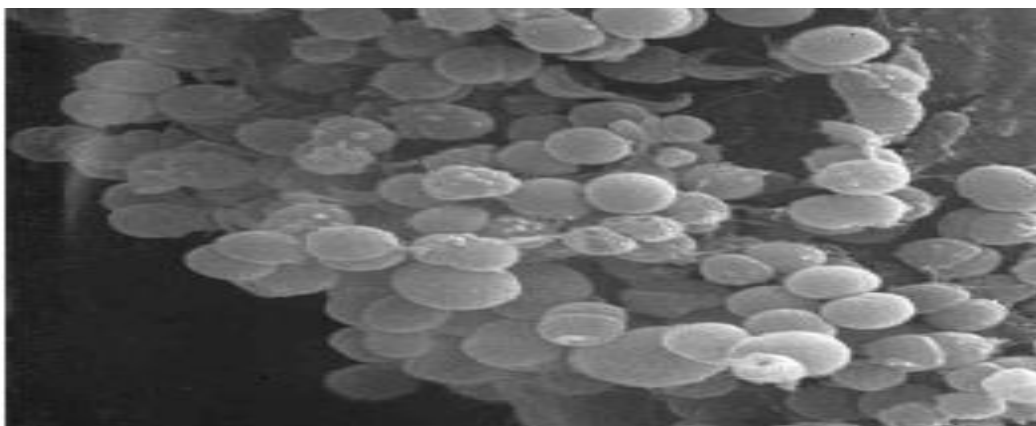
utilisées comme probiotiques humains, pour traiter les maladies diarrhéiques causées par des pathogènes d'origine alimentaire (Svec et Franz, 2014).



**Figure 5:** Observation au microscope électronique *Enterococcus faecium* (GX4000)  
(Kokkinos et al. 1989)

### 1-5-5-Pediococcus

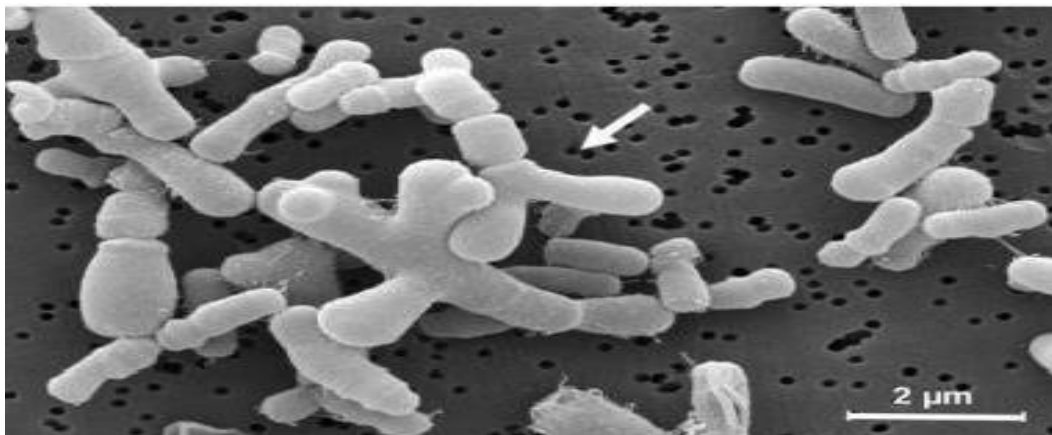
Les *pédiocoques* sont des bactéries à Gram positif, oxydase et catalase négatives. Elles sont immobiles, se révèlent tantôt que cellules sphériques d'une taille uniforme et se disposent comme tétrades par divisions perpendiculaires en deux directions (Gunther et Blanc, 1961). Les espèces *pédiocoques acidilactici*, *pédiocoques pentosaceus*, *pédiocoques parvulus* et *pédiocoques inopinatus* sont employées comme ferments « starters » importants dans la production de plusieurs produits à travers le monde (Svec et Franz, 2014). *pédiocoques pentosaceus* peut jouer un rôle dans la fermentation et la maturation du fromage (Callon et al. 2004). Un certain nombre de bactériocines (pediocines) a été décrit pour *pédiocoques acidilactici*, *pédiocoques pentosaceus* (Todorov et Dicks, 2005).



**Figure 6:** Observation au microscope électronique à balayage de *Pediococcus acidilactici* (GX10000) (Cho et al. 1996).

### 1-5-6-Bifidobacterium

Les *Bifidobacterium* sont des bactéries anaérobies mais quelques espèces tolèrent l'Oxygène avec la présence ou non du CO<sub>2</sub>. Les *bifidobactéries* sont dépourvues de catalase, et leur ADN est composé à 61% en G + C (Mattarelli et Biavati, 2014). Ce sont des bactéries commensales de l'homme, elles sont retrouvées également chez les animaux (Biavati et al ; 2000). Les conditions optimales de croissance des *bifidobactéries* d'origines humaine se situent à des températures comprises entre 37°C et 41°C, et des valeurs de pH entre 6,5 et 7 (Hadadji, 2007). A l'heure actuelle les *bifidobactéries* sont les fameuses bactéries utilisées comme probiotiques, dans divers produits comme les laits fermentés.



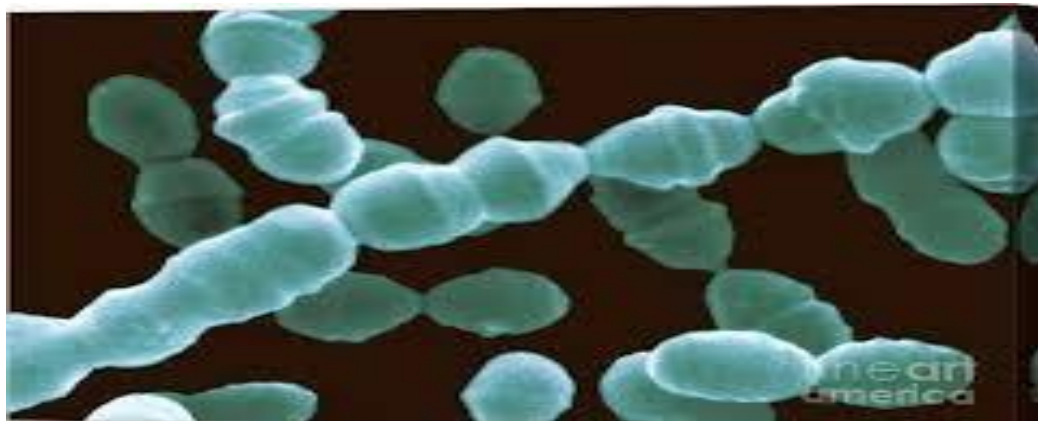
**Figure 0 7:** Observation au microscope électronique à balayage de *Bifidobacteriu manimalis* (GX10000) (Vinderola et al.2012).

### 1-5-7-Leuconostoc

Ce genre a été défini en 1878 par van Tieghem; le mot *Leuconostoc* vient de l'association de leukos qui veut dire clair avec Nostoc qui est une cyanobactérie, signifiant donc incolore (Ogier et al. 2007). Il appartient à la famille V des *lactobacillales* aux côtés des genres *Weissella* et *Oenococcus*. Les premières souches ont été isolées lors d'accidents apparus dans des raffineries de sucre. Les *leuconostocs* se présentent sous forme de cellules

sphériques immobiles, souvent lenticulaires après culture sur gélose, regroupées par deux ou en chaînes. Ces bactéries sont hétérofermentaires strictes, elles produisent de l'acide lactique, du CO<sub>2</sub> et de l'éthanol. Elles sont Gram positif et catalase négative. (Larpen et al. 1997).

Elles 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. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux (Zhang et Cai, 2014). Elles produisent la forme D lactate à partir du glucose et dégradent l'alginate, et sont généralement peu protéolytiques, certaines espèces possèdent l'activité caséinolytique. Elles ont la particularité et le pouvoir de prédominer dans un environnement. Les *Leuconostoc* jouent un rôle important dans la qualité organoleptique et texturale des aliments. (Mathot et al. 1994). Leurs températures de croissance se situe entre 25°C-30°C, leurs croissances est lente. Le développement des *Leuconostoc* entraine souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu (Guiraud et al. 2003).



**Figure 08 :** Observation au microscope électronique de *Leuconostoc mesenteroides* (Wallace et al. 2003).

### **1-6-Les aptitudes technologiques des bactéries lactiques**

Le secteur de l'industrie agroalimentaire utilise un certain nombre d'auxiliaires technologiques, parmi lesquels les bactéries lactiques, pour élaborer des aliments fermentés. Elles sont principalement utilisées en tant que ferments dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (Hugenholtz et al. 1990; Abee, 1995).

**Tableau 02 :** Principaux produits obtenus grâce aux aptitudes des bactéries lactiques  
(Penaud, 2006)

Genre de bactéries lactiques	Substrat	Produits
<i>Lactococcus</i>	Lait	Fromages – kéfirs
<i>Lactobacillus</i>	Lait Viandes Végétaux Céréales	Yaourt – Lait fermentés – kéfirs – fromages Saucissons – Jambons Choucroutes – olives – yaourts au lait de soja Pain au levain – bières
<i>Leuconostoc</i>	Lait Végétaux	Fromages – kéfirs Choucroutes – olives – vins
<i>Streptococcus</i>	Lait	Yaourts – lait fermentés – fromages
<i>Bifidobacterium</i>	Lait	Lait fermentés
<i>Pediococcus</i>	Végétaux Viandes	Choucroute Saucisses semi séchées
<i>Enococcus</i>	Végétaux	Vins

### 1-6-1-Aptitudes acidifiantes

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans l'industrie alimentaire. Elle se manifeste par un fort abaissement du pH extracellulaire dû à la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (**Mäyrä et Bigret, 2004 ; Monnet et al. 2008**). Pour un ferment donné, il s'agit de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Le niveau d'acidité dépend des spécifications du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches ((**Béal et al. 2008; Monnet et al., 2008**)). Les bactéries du genre *Leuconostoc* produisent à partir de glucides de l'acide lactique de type (D), de CO<sub>2</sub>, de l'éthanol et parfois même de l'acétate mais seule, l'espèce *Leuconostoc lactis* qui est capable d'acidifier rapidement le lait ; au contraire de l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* qui n'acidifie le lait que lentement (**Savado et Traore, 2011**).

Dans la pratique industrielle, les principales voies permettant d'agir sur les profils d'acidification sont le choix des ferments, les doses d'ensemencement et les profils de température (**Dacosta, 2000**). L'activité acidifiante des ferments dépend de la nature et de l'équilibre entre les différentes souches présentes, en particulier, la présence de certaines espèces ou mélanges d'espèces différentes qui vont permettre d'obtenir l'activité voulue. Cependant, il est important de souligner qu'il existe une forte variabilité de l'activité acidifiante des bactéries lactiques, y compris au sein d'une même espèce (**Corrieu et Luquet, 2008**).

Les conséquences, d'ordre physicochimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi (**Béal et al. (2008)**) :

- L'accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés.
- L'abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires.
- La limitation des risques de développement des flores pathogène et d'altération dans les produits finaux.
- La déstabilisation des micelles de caséines, coagulation des laits et participation à la synérèse.

### **1-6-2-Aptitudes protéolytiques**

La croissance des bactéries lactiques jusqu'à des densités cellulaires élevées leur permet d'assurer la fonction de fermentation, qui repose sur un système protéolytique. Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les *lactocoques* (**Donkoret al. 2007 ; Monnet et al. 2008 ; Roudj et al. 2009**). Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire qui catalysent l'hydrolyse des protéines en peptides contenant de 07 à 16 résidus aminés (**Law and Haandrikman, 1997**) et joue un rôle clé dans la fermentation du lait et permet l'obtention des acides aminés à partir des caséines qui sont les protéines les plus abondantes dans le lait (**Moussaoui, 2013**). L'activité protéolytique des bactéries lactiques reste faible comparativement à celle des autres genres bactériens (**Giraffa, 2003**).

Dans les produits laitiers, la protéolyse :

- Permet la croissance des bactéries par la fourniture d'azote aminé dont elles ont besoin. Après utilisation des acides aminés et des peptides libres présents en petite quantité dans le lait, les bactéries lactiques hydrolysent les protéines en peptides assimilables (de petite taille) et en acides aminés pour croître dans le lait.
- Contribue au développement de la texture : en hydrolysant la matrice protéique, en diminuant l'activité de l'eau par sa fixation sur les groupements carboxyles et aminés libérés par l'hydrolyse des ponts peptidiques, et en augmentant indirectement le pH par libération d'ammoniac à partir des acides aminés (**Upadhyay et al, 2004**).
- Contribue au développement de la flaveur des produits fermentés (en libérant des peptides et des acides aminés directement aromatisant, en hydrolysant des peptides amers libérés à partir des caséines, en libérant des acides aminés précurseurs de composés d'arôme (**Upadhyay et al. 2004**) tels que des alcools, des aldéhydes, des esters, et des composés soufrés.

### 1-6-3- Aptitudes lipolytiques

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les *lactocoques* sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les *lactobacilles*. Elles peuvent, de ce fait, présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (**Béal et al. 2008**). D'une manière générale on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (**Béal et al. 2008 ; Serhan et al. 2009**).

### 1-6-4- Aptitudes aromatisants

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l' $\alpha$ -acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyle, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal

est lié à cette activité microbienne (**Bourgeois et Larpent, 1996 ; Gerrit et al. 2005 ; Cholet, 2006**).

Certaines espèces de bactéries lactiques utilisées dans l'industrie laitière (*Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactiset Ln. mesenteroides* subsp. *Cremoris*), sont dites aromatiques puisqu'elles sont capables, à partir du pyruvate, de synthétiser divers composés responsables des arômes des produits laitiers : diacétyl, acétoïne, 2,3-butanediol et  $\alpha$ -acétolactate (**Raynaud et al. 2003 ; Leroy et DeVuyst, 2004**).

### **1-5-5- Aptitudes texturantes**

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. L'utilisation des EPS produits par les souches *Lactococcus Lactis* sub *streptococcus. cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (**Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho et al. 2007**).

### **1-6-6-Activité antimicrobienne**

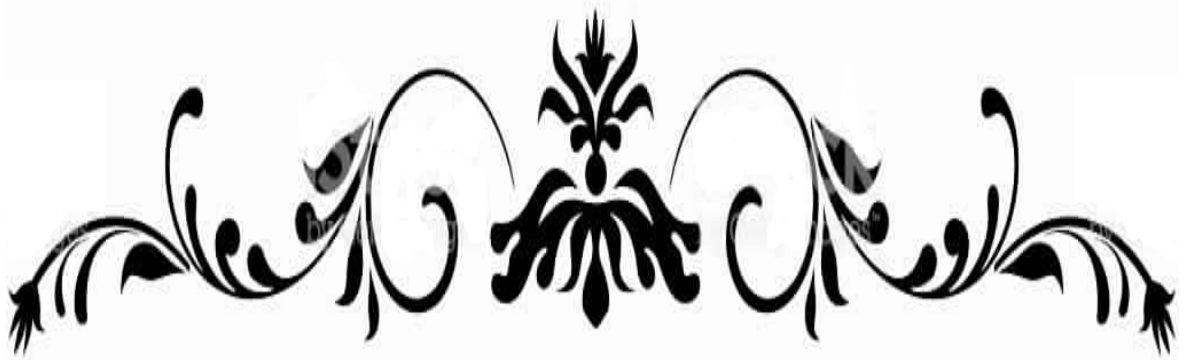
Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la bioconservation des aliments (**Labioui et al. 2005**). Les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes. Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire, son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui s'avère toxique pour certains microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Le diacétyl peut inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, des levures et moisissures (**Alakomi et al. 2000 ; Ammor et al. 2006**).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice et leur spectre d'action est généralement étroit. Les plus connues sont : la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane (**Ogunbanwo et al.2003**) ; (**Dortu et Thonart, 2009**). La plupart des bactériocines produites

par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (**Vuyst et Leroy, 2007**) ; (**Kumari et al. 2009**).

### **1-7- Effets probiotiques des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des années comme probiotiques dans l'alimentation humaine et animale et cela revient à certains effets bénéfiques sur la santé comme l'amélioration de la flore intestinale ou leur activité antimicrobienne (**Ishibashi et Yamazaki, 2001**), elles sont capables de stimuler le système immunitaire, d'améliorer la digestibilité du lactose et diminuer les allergies alimentaires. Les bactéries lactiques sont aussi connues pour la prévention et le traitement des diarrhées et des maladies inflammatoire de l'intestin ou encore la réduction du cholestérol, sans oublier les propriétés anti-tumorales et la prévention contre le cancer du côlon (**Izquierdo, 2009**).



Chapitre 02 :  
Mécanismes antimicrobiennes  
des bactéries lactiques



### 1. Mécanismes antimicrobiens des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont capables d'inhiber la croissance d'un certain nombre de microorganismes. Elles ont développées des mécanismes d'inhibitions à action bactéricide ou bactériostatique basés sur la sécrétions de métabolites antimicrobiens élaborés lors de la fermentation des glucides. Ces composés peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. Ces agents inhibiteurs ont une action spécifique (les bactériocines) ou non-spécifiques (acides organiques) qui permet d'améliorer la conservation des produits alimentaires (**Beliard, 1990**). Ils agissent sur certaines bactéries par inhibition de leur croissance ou par destruction totale de leurs cellules (**Dridier, 2006**).

#### 1.1. Agents antimicrobiens non protéiques

Les bactéries peuvent synthétiser des substances antagonistes non protéique à action non spécifique pouvant être des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, l'ion su peroxyde d'hydrogène ou du dioxyde de carbone (**Klaenhammer et al. 1994**).

##### 1.1.1. Les acides organiques

Les acides organiques tels que l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propénoïque, produits par les bactéries lactiques, sont les principaux accepteurs d'électrons et représentent les produits terminaux du métabolisme fermentaire. Sous leur forme non dissociée, ces acides sont toxiques pour les bactéries pathogènes. Ils diffusent passivement à travers la membrane cytoplasmique, et s'ionisent, lorsque la concentration en acide devient forte dans le milieu intracellulaire, il y a diminution du pH interne. Les fonctions cellulaires sont alors inhibées et le potentiel membranaire annulé et certains mécanismes de transport actif sont bloqués (**Klaenhammer et al. 1994**). Cette accumulation d'acides organiques inhibe directement les microorganismes pathogènes qui présentent un seuil de résistance bas aux changements de pH intracellulaire.

L'intensité de l'activité antimicrobienne d'un acide organique dépend de sa nature (acide fort/ acide faible). L'acide acétique par exemple est plus inhibiteur que l'acide lactique, il inhibe les levures, les moisissures et les bactéries (**Blom et al. 1991**).

### 1.1.2. Le dioxyde de carbone CO<sub>2</sub>

Le dioxyde de carbone exerce une action inhibitrice non spécifique sur plusieurs microorganismes par la création d'une anaérobiose toxique pour les bactéries aérobies. Il inhibe ainsi la décarboxylation enzymatique. L'accumulation du CO<sub>2</sub> dans la bicouche lipidique de la membrane peut provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Bellil, 2013**). La présence du CO<sub>2</sub> additionnée aux autres substances inhibitrices contribue à amplifier l'action inhibitrice globale (**Dridier, 2006**).

### 1.1.3. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est, depuis longtemps, reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celle des lactobacilles. (**Price et Lee, 1970, cité par Klaenhammer et al. 1994**). Les Bactéries lactiques sont dépourvues de catalases, en conséquence, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes présents (**Condon ; 1987**). L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène est principalement due à son fort effet oxydant sur les lipides membranaires et les protéines cellulaires (**Caplice et al, 1999**) et le niveau d'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varie selon la souche bactérienne et peut être auto-inhibiteur et révéler une activité plus intense des réactions génératrices de peroxyde d'hydrogène par rapport aux réactions peroxydasiques provoquant son élimination (**Condon, 1987**).

### 1.1.4. Le diacétyle

Le diacétyle est un produit du métabolisme du citrate qui est responsable de l'arôme beurre, c'est aussi un inhibiteur non spécifique. Les bactéries à gram négatif, les levures et les moisissures sont plus sensibles au diacétyle que les bactéries gram positif. Ce métabolite présente une action antagoniste en milieu acide, il inhibe la croissance bactérienne en interférant avec les mécanismes d'utilisation de l'arginine (**Motlagh et al.1991**). Ce composé est toutefois présent dans les aliments en quantité insuffisante et n'exerce donc pas une activité antimicrobienne importante (**Caplice et al.1999**).

### 1.1.5. L'acétaldéhyde

Ce composé qui est aussi un inhibiteur non spécifique produit par les bactéries lactiques à partir du glucose (**Devoyod et Poullain, 1988**). Il est produit par *Lactobacillus de lbrueckii* sub sp. *bulgaricus*, par l'action d'une aldolase à thréonine, qui clive la thréonine en

## Chapitre 02 : Mécanismes antimicrobiennes des bactéries lactiques

---

acétaldéhyde et en glycine. L'acétaldéhyde présent à une concentration de 10 à 100 ppm est capable d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhimurium* et d'*E. coli* dans les produits laitiers (Piard et Desmazeaud, 1991).

### 1.1.6. Reutérine

La reutérine (3-hydroxypropionaldéhyde) est un agent antimicrobien puissant à faible poids moléculaire, neutre et soluble dans l'eau (Axelsson et al., 1989), résistant aux enzymes protéolytiques et lipolytiques et stable dans une large gamme de pH (Montiel et al. 2014). La reutérine est un métabolite intermédiaire produit lors de la fermentation anaérobie du glycérol par quelques espèces du genre *Lactobacillus*, comme *Lactobacillus reuteri* mais aussi chez des bactéries non lactiques telles que *Bacillus*, *Clostridium* et *Klebsiella* (Vollenweider, 2004). Ce composé possède un large spectre d'activité antimicrobienne, il inhibe la croissance des bactéries à Gram positif et négatif, ainsi que les virus, les levures, les moisissures et les protozoaires (Cleusix et al. 2007).

### 1.1.7. La reutéricycline

Certaines souches de *Lactobacillus reuteri* secrètent d'autres substances antimicrobiennes que la réuterine, telle que la reutéricycline. La concentration d'inhibition minimale de cette molécule est de 0.05-1 mg/L pour les bactéries à gram positives (Ouwehand et al. 1999).

### 1.1.8. L'acide pyroglutamique

Cette molécule (2-pyrrolidone-5-carboxylic acid) est surtout produite par *Lactobacillus casei* subsp. *Casei* et *Streptococcus bovis*. Elle est présente aussi dans les fruits et les légumes. Elle inhibe *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens*. Elle est stable à 121°C pendant 20 minutes mais elle perd son activité inhibitrice quand le pH est de 2,5. Cet agent antimicrobien a le même mécanisme d'action que celui des acides organiques (Ouwehand et al. 1999).

## 1.2. Agents antimicrobiens protéiques : Les bactériocines

La détection de la première bactériocine remonte à 1925 par André Gratia qui a observé que la croissance de certaines souches d'*Escherichia coli* a été inhibée en présence d'un composé antibactérien qu'il a nommé colicin. En 1933, une bactériocine a été découverte par Whitehead chez le genre *Lactococcus*. Il a en effet observé dans un lot de lait spécifique que

## Chapitre 02 : Mécanismes antimicrobiennes des bactéries lactiques

---

la présence de deux souches de lactocoques inhibait la croissance d'un ferment de culture fromagère (Tagg *et al.* 1976).

En 1953 Jacob *et al.* Proposèrent le terme général de bactériocine pour nommer les protéines et peptides antimicrobiens synthétisés selon la voie ribosomique et qui sont différent de la plupart des antibiotiques par leur composition (protéique) et possédant généralement une spécificité d'action étroite contre les mêmes (Morisset, 2003).

### 1.2.1. Définition de bactériocines

Selon Klaenhammer (1988) les bactériocines sont des protéines, ou complexes protéiques, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action.

Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram (+). Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram (-) n'a été décrite, car la membrane externe de ces dernières ne permet pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Morency *et al.* 2001).

### 1.2.2. Classification des bactériocines

#### ➤ Classe I. Les l'antibiotiques

Ce sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à haute température et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement. Exemple : la lanthionine, la  $\beta$ -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types : la classe I qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (McAuliffe *et al.* 2001, Twomey *et al.* 2002).

#### ➤ Classe II

Ce sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à haute température, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoélectrique varie entre 8 et 10. Cette classe est divisée en trois sous-classes :

## Chapitre 02 : Mécanismes antimicrobiennes des bactéries lactiques

---

- Les bactériocines de la sous-classe II a contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val) ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (**Fimland et al. 2000 ; Richard et al. 2006**). Elles ont toutes une activité contre *Listeriamonocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (**Eijsink et al. 1998 ; Fimland et al. 2000 ; Drider et al. 2006 ; Richard et al. 2006**).
- La sous-classe II b comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe II b peuvent être distingués : le type E (Enhancing) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (Synergy) où les deux peptides sont complémentaires.
- La sous-classe II c contient les bactériocines qui ne peuvent pas être classées dans les autres sous-classes.

### ➤ Classe III

Des protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helvéticine J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysine produite par *Enterococcus faecium*, la zoocine A produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la millericine B produite par *Streptococcus milleri* (Nilsen et al. 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigmatova et al. 2007).

### Classe IV

- Ce sont des bactériocines requérant une partie carbohydratée ou lipidique (donc non lipidique) pour avoir une activité inhibitrice (**Jimenez-Diaz et al, 1993**).

**Tableau 3** : Classification des bactériocines (Papagianni, 2003)

Les classes	Caractéristiques
<p align="center"><b>Classe I</b> Les l'antibiotiques</p>	<p>Peptides ribosomiquement synthétisés, post traditionnellement modifiés contiennent des acides aminés inhabituels :lanthionines et B-méthyle lanthionine .</p> <p>Masse moléculaire. 2-5 KDa</p> <p>Sous classe A : molécules allongées. Flexibles.</p> <p>Sous classe B : molécules globulaires sans charge nette ou chargées négative.</p>
<p align="center"><b>Classe II</b> non l'antibiotique</p>	<p>Peptide stable à la chaleur , formés exclusivement avec des acides aminés non modifiés .</p> <p>Synthétisés sous forme dun pré peptide inactive clivé a la partie N-terminale pour donnés la forme active.</p> <p>Masse moléculaire : 10KDa.</p> <p>Sous classe Iia :pediocine like peptide ,peptide simple contient la séquence YGNGVN terminal nommé aussi )Listeria active peptide ) .</p> <p>Sous classe Iib : bactériocines a deux peptides.</p> <p>Sous classe Iic : autre bactériocines.</p>
<p align="center"><b>Classe III</b> bactériocines</p>	<p>Proes thermolabiles</p> <p>Masse moléculaire 30KDa.</p>
<p align="center"><b>Classe IV</b></p>	<p>Complexe bactériocines et parties lipidiques ou glucidiques.</p>

### 1.2.3. Le conditionnement des bactériocines

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. La purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en

## Chapitre 02 : Mécanismes antimicrobiennes des bactéries lactiques

---

œuvre de nombreuses techniques à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle. La stratégie souvent mise en œuvre consiste dès lors en l'adsorption de la bactériocine sur la cellule productrice suivie d'une centrifugation ou d'une ultrafiltration de la culture et de la désorption de la bactériocine par abaissement du pH à 2 et l'augmentation de la concentration en chlorure de sodium. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation (**Parente et al, 1997**). La nisine est la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, et est commercialisée sous une forme semi-purifiée (**Dortu et Thonart, 2009**).

### 1.2.4. Mode d'action des bactériocines :

Toutes les bactériocines ciblent le même site d'action qui est la membrane cytoplasmique, mais leur mode d'action est différent (**Mehidi, 2015**). Les lantibiotiques (ex : la nisine) ont un effet bactéricide, leur action est de créer des pores dans la paroi cellulaire, et cela grâce à une partie de sa structure cationique et amphiphile allongée qui va se lier au lipide II (précurseur des peptidoglycanes) et l'utiliser comme appui pour former les pores. Cela va entraîner une perturbation du potentiel membranaire et donc l'afflux des petites molécules. Quant à la mersacidine, elle interfère avec les réactions enzymatiques impliquées dans la synthèse de la paroi ce qui provoque la mort de la bactérie (**Carine et Philippe, 2009**). L'insertion des bactériocines de la classe II dans la membrane est conférée par la structure  $\alpha$ -hélice amphiphile, cette insertion induit la perméabilisation de la membrane et par conséquent la mort cellulaire suite à l'écoulement des molécules à faible poids moléculaire (**Ababsa, 2012**). Le mode d'action des bactériolysines est basé quant à lui, sur l'hydrolyse des liaisons peptidiques des peptidoglycanes (**Nilsen et al. 2003**).

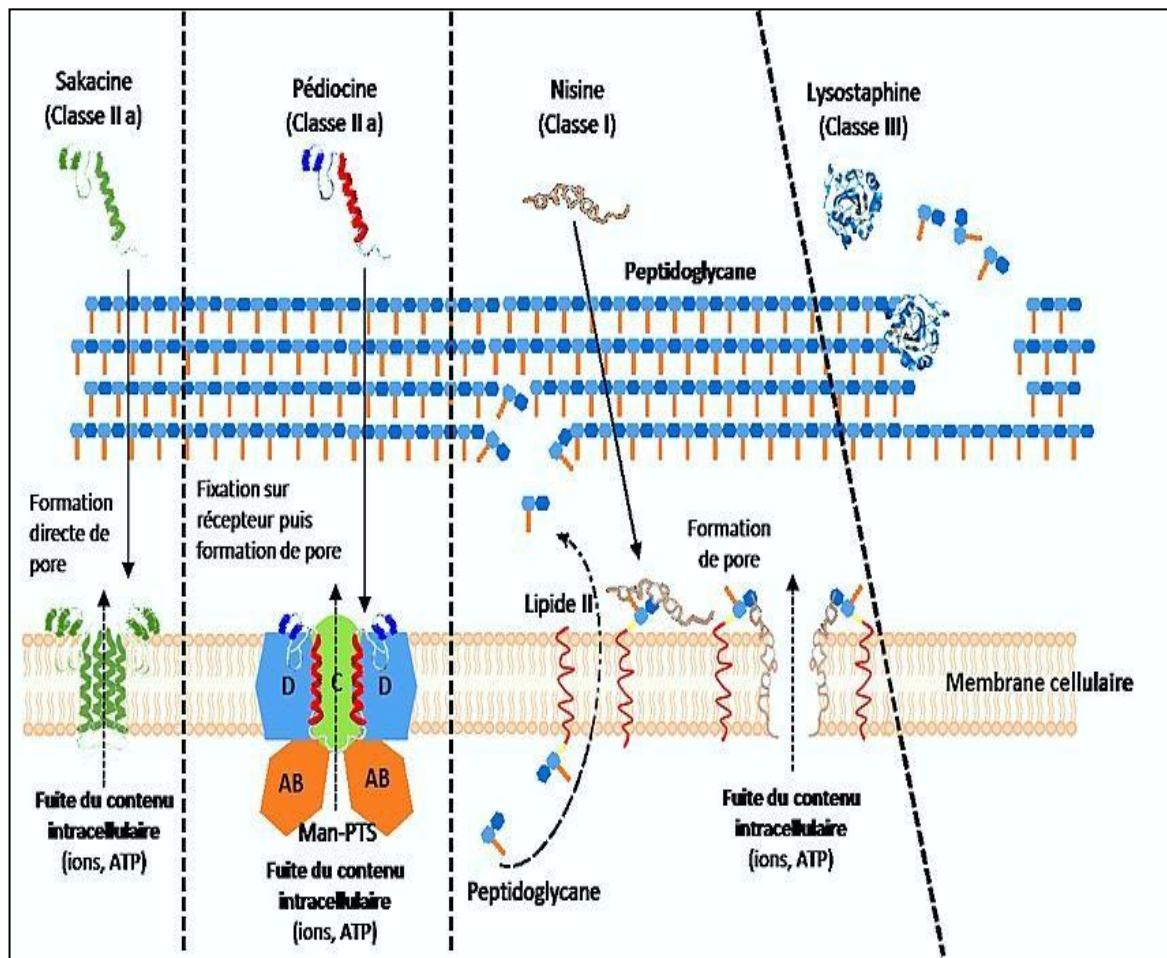
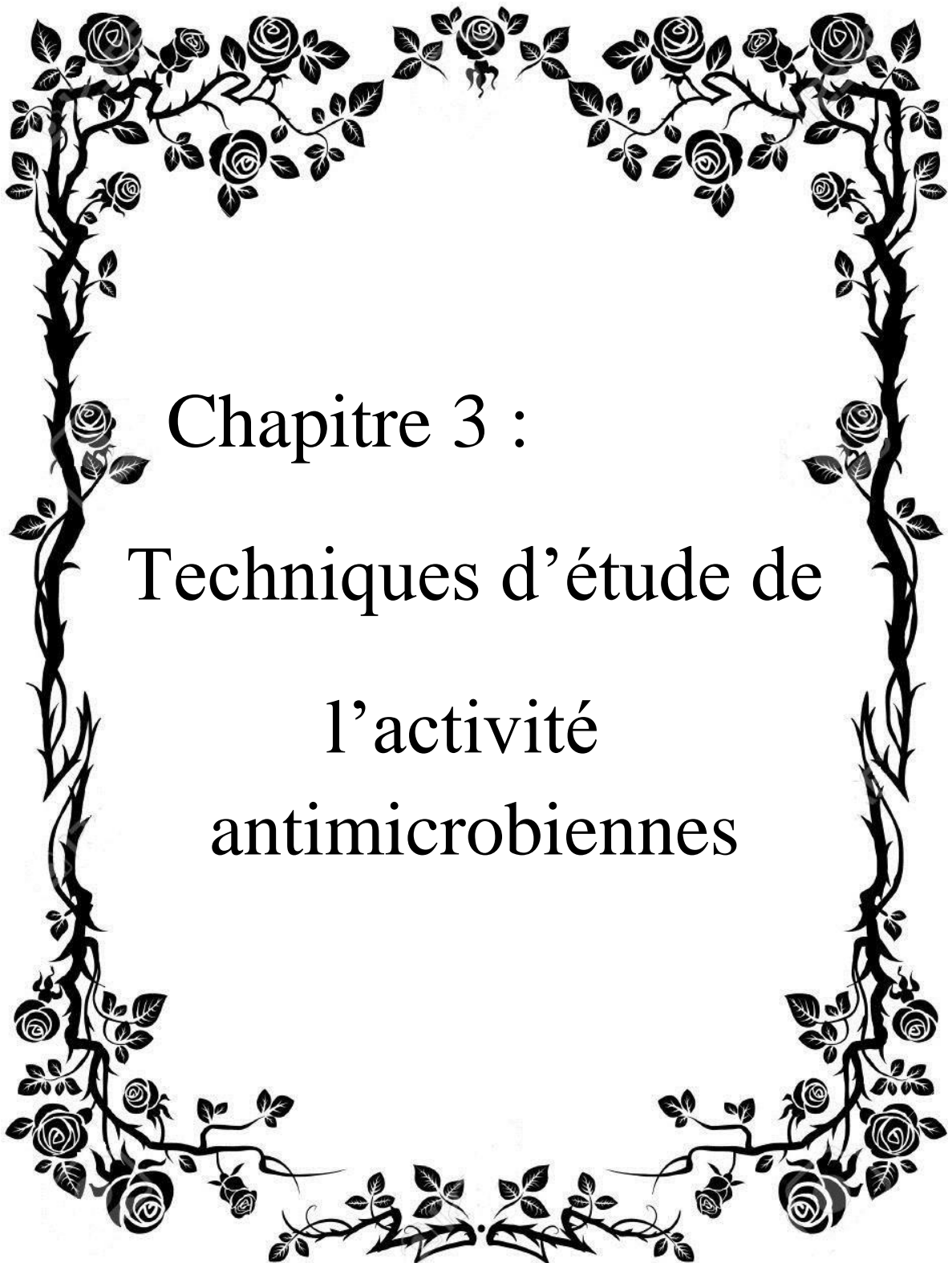


Figure 0 9: Mode d'action des bactériocines sur la paroi bactérienne.(Cotter *et al* ,2005)



## Chapitre 3 :

Techniques d'étude de

l'activité

antimicrobiennes

### **III. Techniques d'étude de l'activité microbienne chez les bactéries lactiques**

L'étude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques est basée sur des techniques diverses aussi bien classiques que modernes, elle commence par une étape de criblage « screening » pour identifier les bactéries à potentiel inhibiteur, puis par l'identification de l'agent inhibiteur exprimé par ces bactéries testée.

Plusieurs techniques *in vitro*, telles que la diffusion sur disque, la diffusion de puits et la dilution en bouillon (broth dilution) ou sur gélose, sont élémentaires, bien connues et couramment utilisées. Il existe d'autres techniques plus modernes, telles que les méthodes cytofluorométriques ou à flux bioluminescents, qui sont moins utilisées car elles nécessitent un équipement spécifique et une évaluation supplémentaire pour leur reproductibilité et leur standardisation. Elles sont ignorées au profit des techniques classiques et cela même si elles fournissent des résultats rapides sur la nature de l'effet inhibiteur (bactéricide ou bactériostatique ; effets en fonction du temps ou de la concentration) de l'agent antimicrobien et une meilleure compréhension de l'impact de l'inhibition sur la viabilité et les dommages cellulaires infligés au microorganisme testé (Balouiri et al. 2016).

#### **III.1. Méthodes élémentaires de criblage et d'évaluation du potentiel inhibiteur des bactéries :**

##### **III.1.1. méthode de culture en touche (Spot agar test)**

Cette une méthode directe de criblage rapide pour l'évaluation de l'antagonisme des bactéries à intérêt, sans révéler la nature de l'inhibition ni son effet. Développée par Fleming et al (1975) elle consiste à déposer l'inoculum des bactéries en touche sur la gélose, après une période d'incubation adéquate, la culture du pathogène à inhiber est ajoutée au-dessus de la gélose en bouillon semi solide. L'inhibition est appréciée par l'apparition de zones d'inhibition de la croissance du pathogène. Bien que cette méthode ne soit pas quantitative, la mesure du diamètre des zones claires peut renseigner sur certains aspects de l'inhibition.

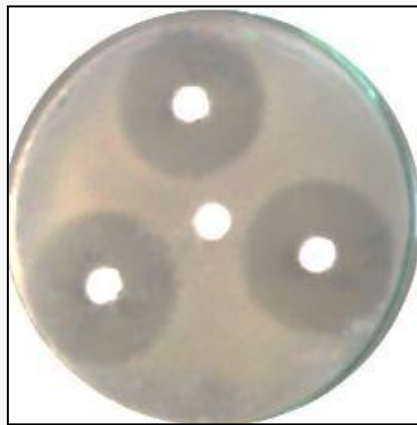
##### **III.1.2. Méthode de diffusion sur disques (agar-disk diffusion method)**

Développée en 1940 par Heatley, elle est la méthode officielle utilisée dans les laboratoires de microbiologie clinique pour les tests de sensibilité antimicrobienne de routine pour les bactéries et les levures. Elle permet de tester l'inhibition de certaines bactéries exigeantes telles que les streptocoques, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*,

## Chapitre 3 : Techniques d'étude de l'activité antimicrobiennes

*Neisseriagonorrhoeae* et *Neisseriameningitidis*, en utilisant des milieux de culture spécifiques, diverses conditions d'incubation et critères d'interprétation pour les zones d'inhibition.

Dans cette procédure bien connue, un inoculum standardisé du microorganisme testé est déposé sur des disques de papier filtre (environ 6 mm de diamètre), qui se trouvent sur la surface de la gélose. Cela permet à l'agent antimicrobien de diffuser dans la gélose et inhiber la croissance du microorganisme pathogène, puis les diamètres des zones de croissance d'inhibition sont mesurés. Cependant, cette méthode ne permet pas de distinguer l'effet bactéricide de l'effet bactériostatique de la bactérie. De plus, la méthode de diffusion sur disque d'agar n'est pas appropriée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), car il est impossible de quantifier la quantité d'agent antimicrobien diffusée dans le milieu gélosé. Néanmoins, le test de diffusion sur disque offre de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes: simplicité, faible coût, la possibilité de tester un grand nombre de micro-organismes et d'agents antimicrobiens, et la facilité d'interprétation des résultats fournis, ainsi qu'une bonne corrélation entre les résultats *in vitro* et les données *in vivo* de tests d'inhibition pour un microorganisme testé (Balouiri et al. 2016).



**Figure 10 :** Observation de résultats d'un test par la méthode des disques pour l'inhibition de *Candidaalbicans* (Balouiri et al. 2016).

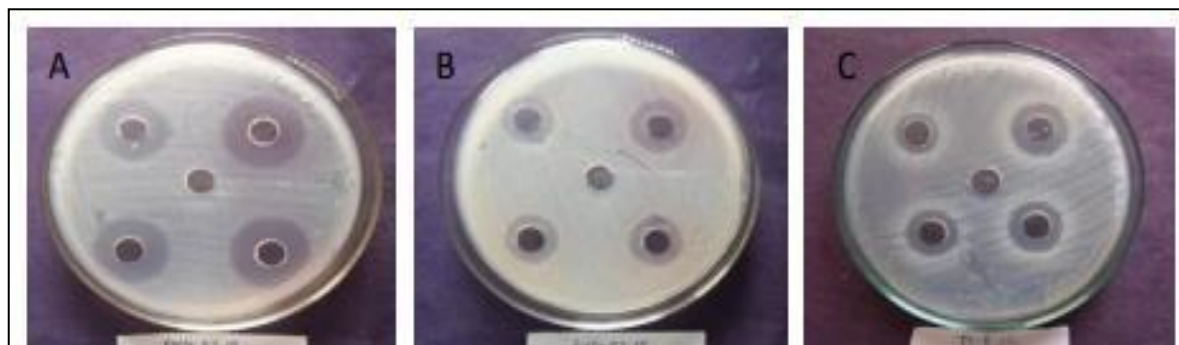
### III.3.3. Méthode des stries croisées (Cross streak method)

La méthode des stries croisées est utilisée pour cribler rapidement les micro-organismes ayant un effet inhibiteur de manière directe. La souche microbienne d'intérêt estensemencée en une seule strie au centre de la gélose. Après une période d'incubation, les bactéries à inhiber sont en simples strie perpendiculaire à la strie centrale. Après une nouvelle incubation, les interactions antimicrobiennes sont analysées en observant la taille de la zone d'inhibition (Balouiri et al, 2016).



## Chapitre 3 : Techniques d'étude de l'activité antimicrobiennes

Cette méthode consiste à déposer un volume du surnageant (pure ou dilué) obtenu à partir d'une culture bactérienne en milieu liquide (de la bactérie à intérêt) dans des puits (de 6 à 8mm de diamètre) creusés aseptiquement dans la gélose. Le pathogène à inhiber aura été inoculé au préalable sur la totalité de la surface du milieu solide. Au lieu de déposer un inoculum bactérien à la surface de la gélose. Après l'incubation des boîtes inoculées dans des conditions appropriées, l'agent antimicrobien diffuse dans le milieu gélosé et inhibe la croissance de la souche microbienne à la surface du milieu (**Balouiri et al. 2016**).



**Figure 12:** Observation des résultats du test d'inhibition de souches de (A) *Staphylococcus aureus* (B) *Streptococcus viridans* et (C) *Pseudomonas aeruginosa* par un actinomycète (**Srivastav, 2018**)

### III.2. Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur

Après l'étape de criblage des souches à potentiel inhibiteur, il est essentiel d'identifier l'agent antimicrobien impliqué, cette étape se fait par élimination de chaque possibilité en utilisant la méthode des puits :

#### III.2.1 - Inhibition due au peroxyde d'hydrogène

Pour écarter l'effet du peroxyde d'hydrogène dans l'inhibition des souches indicatrices pathogènes, les surnageant des cultures des bactéries inhibitrices sont traités par 1mg/ml de catalase puis incubées à 37°C pendant 1h. Le surnageant est stérilisé par filtration avant d'être testé (**Cogan et al. 1981 et Julliard et al. 1987**).

#### III.2.2 - Inhibition due à la production d'acides organiques

L'étude de l'effet des acides organiques est écarté par l'utilisation d'un milieu tamponné (le ph est ajusté à 7 par l'emploi d'un tampon phosphate de 0.1 M).

Pour les agents de nature protéiques il convient de procéder aux vérifications suivantes :

## **Chapitre 3 : Techniques d'étude de l'activité antimicrobiennes**

---

### **III.2.3 - L'action de protéase**

Cet effet est écarté en traitant le surnageant (en volume de 500  $\mu$ l) par la pepsine, cette enzyme va inactiver les protéases présentes lors du test

. Cet effet est écarté en traitant le surnageant (en volume de 500  $\mu$ l) par la pepsine, cette enzyme va inactiver les protéases présentes lors du test

**III.2.4 La stabilité thermique:** l'effet de température sur l'activité antibactérienne des surnageant est étudié après chauffage du surnageant à 100°C pendant 30min au bain marie avant de procéder au test.



## Matériel et méthodes



### **Objectif :**

L'objectif principal de la recherche présentée dans ce mémoire, est d'évaluer l'activité antibactérienne de souches de bactéries lactiques envers certaines bactéries pathogènes.

L'intégralité de ce travail a été réalisée au laboratoire des sciences et techniques de production animal (LSTPA) de université Abdlhamid Ibn badis de Mostaganem.

### **1-Les souches utilisées**

Les bactéries lactiques testées font partie de la collection des souches du laboratoire LSTPA, identifiées par MALDI TOF/MS, et conservées au sein du laboratoire.

#### **1.2- Conservation des souches à long terme**

Les souches pures de bactéries lactiques sontensemencées à partir de cultures jeunes (après 16 d'incubation à 30°C) dans un milieu liquide : MRS/M17 à pH 6.8 additionné de 30% de glycérol puis conservées à 20°C pour une longue durée (6 mois) (**Champagne et al, 2000**).

Quant aux souches de bactéries pathogènes, elles sont conservées sur une gélose nutritive inclinées à pH7, à -20°C.

#### **1.2-Conservation de courte durée**

Durand les manipulations, les souches lactiques testées sont conservées à 4°C à partir de cultures pures et jeunes dans un bouillon MRS ou M17 à pH 6.8, après une incubation à 30°C pendant 18heures (**Champagne et al, 2000**).

La conservation à courte durée des bactéries pathogènes se fait aussi à 4°C, à partir de cultures pures jeunes sur bouillon Trypticase soja (pH7), après une incubation de 24 heures à 37°C.

Cette conservation à court terme peut durer 4 semaines, au-delà desquelles un renouvellement est nécessaire.

#### **1.3- Revivification et purification des souches bactériennes**

Les souches de bactéries lactiques conservées à -20 ont été revivifiées par ensemencement de 100µl de la culture conservée dans 10ml de bouillon Man Rogosa& Sharpe (MRS) (**De Manet al.1960**) à pH= 6.8 et, ainsi que dans un bouillon M17 (**Terzaghi et Sandine, 1975**) à pH= 7 et incubés à 30 °C pendant 24h.Pour les souches de bactéries pathogènes, la revivification a été faite par l'ensemencement de 100µl de chaque culture dans du bouillon trypticase soja à pH= 7 suivi par une incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Par la suite, une purification de chaque souche a été effectuée afin de s'assurer de la pureté des cultures. Un ensemencement sur des milieux gélosés a été effectué et cela par méthode d'épuisement (des stries), des repiquages successifs sont effectués jusqu'à obtention de colonies de même forme, taille et couleur.

La purification des souches lactiques a été effectuée sur une gélose PCA additionnée de 0,1 % de poudre de lait écrémé suivie d'une incubation à 30 °C pendant 24h. La purification des souches pathogène a été faite sur milieux spécifiques à chaque espèce testée, suivie d'une incubation à 37°C pendant 48h.

### **1.4- Tests de confirmation de l'identification des souches**

Après purification des différentes cultures, on a procédé à des tests de confirmation de l'identification des souches et cela d'abord par une observation macroscopique et microscopique, essentielles pour l'identification des bactéries pathogènes sur leurs milieux sélectifs, puis par le test de la catalase, la coloration de Gram et le test d'oxydase.

#### **a-Examen macroscopique**

C'est l'observation à l'œil nue des colonies Pour déterminer leurs caractères morphologiques : la taille, la couleur, les contours, la texture, la forme et son relief.

#### **b-Examen microscopique**

Cette observation s'effectue à l'état frais : en observant au microscope optique (grossissement 40) une goutte d'eau distillée, dans laquelle un frotti d'une colonie a été déposé entre une lame et une lamelle, mais aussi à la suite de la coloration de Gram. Elle permet d'observer d'abord la mobilité des bactéries, la forme la taille et le mode d'association des cellules.

#### **c- La coloration de Gram**

Elle permet de différencier sur la base de la composition de la paroi cellulaire entre les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif (**Benbou, 2012**). La coloration est effectuée pour chaque colonie isolée et l'observation des cellules est réalisée à Grossissement x100 en utilisant l'huile à immersion.

#### **d- La recherche de la catalase**

Ce test consiste à mettre en contact une colonie de la bactérie à tester en présence d'une goutte d'eau oxygénée. Un dégagement gazeux abondant (dû à un dégagement de dioxygène) sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (**Belyagoubi, 2014; Kassas, 2017**). Cette activité a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par **Prescott et al. (2003)**.

### **e-Le test de l'oxydase :**

Les oxydases, sont des enzymes qui interviennent à la fin des étapes de déshydrogénation des chaînes de cytochromes. Il en existe plusieurs types. Elles sont mises en évidence par leur propriété à catalyser la réaction d'oxydation d'un substrat organique par l'oxygène de l'air. Un disque « OX » (contenant du tetraméthyl-p-phenylenediamine) est placé sur une lame et imbibé d'une goutte d'eau distillée puis une colonie est déposée à la surface. Une coloration rose se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive.

### **2- Etude des interactions bactériennes**

La recherche d'un éventuel effet antagoniste par les souches lactiques envers les bactéries pathogènes est réalisée selon deux méthodes :

#### **2.1- Méthode directe de culture en touche (Spot agar test)**

L'activité antimicrobienne de nos souches a été évaluée sur milieu solide selon la méthode de culture en touche (**Fleming et al. 1975**). A partir des pré-cultures de souches lactiques sélectionnées obtenues après 18 heures d'incubation à 37°C, 5µl sont ensemencées sous forme de spots sur gélose MRS. La boîte Pétri est laissée à sécher, à moitié ouverte, devant un bec bunsen pendant 30 minutes. L'incubation se fait à 30°C durant 24 heures.

Après incubation, la surface de la gélose est recouverte par 10ml de gélose nutritive semi solide (0.75% d'agar) inoculée par 1ml d'une pré-culture de 18h de chaque souche pathogène testée. L'incubation se fait pendant 24h à 37°C.

L'observation se fait en vue de détecter les zones d'inhibition autour des spots et leur diamètre est mesuré.

#### **2-2 la méthode indirecte des puits**

Selon Barefoot et Klaenhammer (1983), la méthode consiste à mettre le surnageant de la souche lactique en contact avec la souche indicatrice pathogène. Les bactéries lactiques sont repiquées dans le milieu MRS liquide et incubées pendant une période de 18h à 30°C. Après incubation une centrifugation réfrigérée (4°C) est réalisée à 4000 tr/min pendant 15min.

Les souches indicatrices (pathogènes) sont inoculées en masse dans une gélose Mueller-Hinton. Des puits de 5mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide de pipette de Pasteur sur la gélose inoculé par la souche inductrice (pathogène).

Les puits sont ensuite rempli par 100µl du surnageant de la culture lactique. Les boîtes de pétri sont mises à une température de + 4 °C /4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antimicrobienne (**DOUMADJI et al. 2010**), puis incubées à 37 °C. La présence de

zone inhibition formées autour des puits est examinée après 24h à 48h d'incubation (HWANHLEM *et al.* 2011).

Mesure de diamètre des zones d'inhibition :

L'effet antibactérien des souches lactiques mis en évidence par l'apparition d'une zone d'inhibition (zone claire) autour du puits. La lecture de l'activité inhibitrice se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour du puits ( $Z_i$ ), exprimée en mm (ALLOUACHE *et al.* 2010). Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 2 mm THOMPSON *et al.*, (1996) cité par DOUMANDJI *et al.* (2010). La mesure du diamètre d'inhibition ( $Z_i$ ) est effectuée selon la formule suivante:

$$Z_i \text{ en (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre de puits}$$

### **3- Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur**

L'agent inhibiteur est recherché par élimination des possibilités. Les tests sont réalisés un par un et les résultats sont comparés à ceux obtenu par la méthode des puits non modifiée.

#### **3-1- Inhibition due au peroxyde d'hydrogène**

Pour écarter l'effet du peroxyde d'hydrogène dans l'inhibition des souches indicatrices pathogènes, les surnageant des cultures des bactéries lactiques sont traités par 1mg/ml de catalase puis incubées à 37°C pendant 1h. Le surnageant est stérilisé par filtration et testé par la méthode des puits sur les souches pathogènes ; le résultat est comparé avec celui obtenu sur un milieu sans catalase (Cogan *et al.* 1981 et Julliard *et al.* 1987).

#### **3-2 Inhibition due à la production d'acides organiques**

L'étude de l'effet des acides organiques sur la croissance des souches pathogènes est réalisée en milieu solide (MRS ou Mueller Hinton) tamponné (le pH est ajusté à 7 par l'emploi d'un tampon phosphate de 0.1 M). la méthode des puits est ensuite réalisée sur ce milieu selon la technique de Barefoot et Klaenhammer(1983) et la lecture est réalisée par comparaison avec le milieu témoin non tamponné on notant la présence ou l'absence des zones d'inhibition.

### **3-3- Recherche de substances inhibitrices de nature protéique**

#### **3-3-1- Action de protéase**

Un volume de 500µl de surnageant de chaque souche lactique est traité par ajout de 250µl de pepsine. Le surnageant traité est utilisé pour réaliser le test de Barefoot et Klaenhammer (1983). Après 24h d'incubation à 37°C, l'observation de la présence ou l'absence des zones d'inhibition est noté.

#### **3-3-2- Stabilité thermique**

## Matériel et Méthodes

---

L'effet de température sur l'activité antibactérienne des surnageant est testé après chauffage du surnageant à 100°C pendant 30min au bain marie. L'activité résiduelle est testée par la technique des puits



# Discussion



### Discussion

La hausse continue des taux de morbidité et de mortalité des patients due aux infections microbiennes est due essentiellement au phénomène de résistance aux antibiotiques et autres agents antimicrobiens largement utilisés en milieu clinique. Cette situation pousse les scientifiques à développer des méthodes d'investigations rapides afin de trouver de nouveaux inhibiteurs de germes efficaces et disponibles. Les méthodes élémentaires sont toujours indispensables à cette recherche. Cependant, lors du test de produits naturels, certaines modifications des protocoles standardisés sont souvent demandées, comme la dilution de l'inoculum, le milieu de culture et utilisé. Parfois on est amené à utiliser des solvants qui peuvent affecter la croissance du microorganisme testé. On peut dire que faire des adaptations méthodologiques mineures aux protocoles standardisés peut être une solution pour garantir une approche expérimentale précise et d'avoir des résultats comparables et exploitables (Belouiri et al. 2016).

L'activité antibactérienne des bactéries lactiques a été rapportée depuis des décennies, et plus récemment dans les travaux de Homrani et al (2018) qui a démontré l'activité inhibitrice de souches de lactobacilles isolées à partir de quatre miels algériens (provenant des régions de Médéa, Mostaganem, M'sila et Souk-ahras) contre les espèces à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*). L'activité antimicrobienne in vitro de 11 souches du genre *Lactobacillus* testées sur des souches à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) par la méthode de Fleming et al (1975) a été testée. Les résultats de la mesure des zones d'inhibition confirment cette activité inhibitrice par différents diamètres allant de  $12,5 \pm 0,71$  -  $17,5 \pm 0,71$  mm (*E. coli*) et  $11 \pm 1,41$  -  $15 \pm 0,82$  mm (*P. aeruginosa*). Cette méthode d'évaluation du potentiel antimicrobien des bactéries lactiques a été retrouvée aussi dans les travaux de Tahlaiti (2019), dans lesquels on observe une activité inhibitrice de souches lactiques isolées du blé fermenté (le Hammoum) vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *E. coli* ATCC 25922.



**Figure 13** : Activité inhibitrice de 4 souches lactiques vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*(**Tahlaiti, 2019**).

Ces souches appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Pediococcus*, et présentent des diamètres de zones claires allant de 5 à 24 mm.



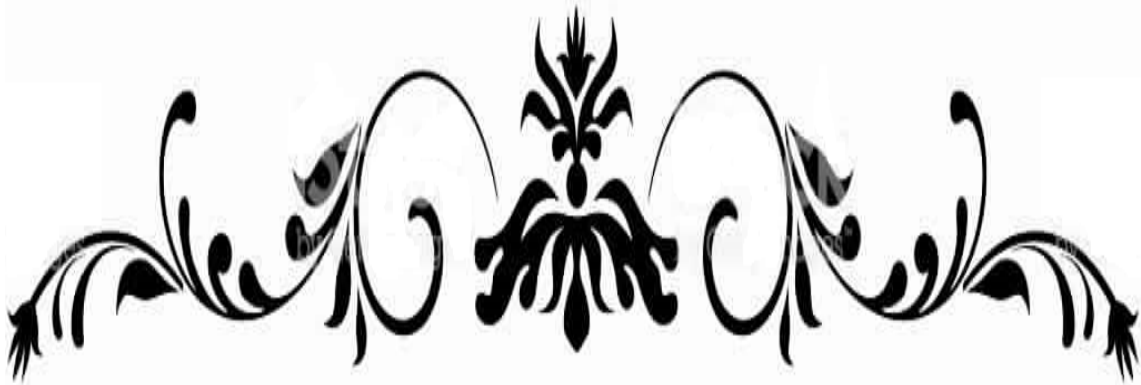
**Figure 14** : Zones d'inhibition des souches lactiques vis-à-vis de la souche *Pseudomonas aeruginosa* (**Tahlaiti, 2019**).

La méthode de Barefoot et Klaenhammer 1983, utilisée pour tester le potentiel inhibiteur des surnageants des 6 lactobacilles parmi les 11 isolés du miel algérien cités précédemment, a démontré une activité inhibitrice contre *E. coli* et *P. aeruginosa*. Les diamètres moyens des zones d'inhibition varient de  $6 \pm 1,73$  à  $11 \pm 1,41$  mm pour *E. coli* et de  $5,5 \pm 0,71$  à  $11 \pm 1,41$  mm pour *P. aeruginosa*. L'activité antibactérienne la plus élevée a été obtenue pour 2 souches, une isolée d'un miel de Médéa ( $11 \pm 1,41$  mm) et de l'autre d'un miel de M'sila ( $11 \pm 1,15$  mm) contre *E. coli*. Cette dernière souche montre une plus grande inhibition contre *P. aeruginosa* avec une zone d'inhibition de  $11 \pm 1,4$  mm (**Homrani et al. 2018**)

L'origine de l'activité inhibitrice de 4 bactéries isolées du blé fermenté a été recherchée, il s'agit des souches exprimant un fort potentiel inhibiteur pour les bactéries pathogènes (*E.coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*) avec des diamètres de zones d'inhibition allant de 10 à 23mm. Ce sont des souches identifiées au MALDI TOF/MS appartenant aux espèces suivantes : *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis*. Il est possible d'avoir plusieurs origines combiné à une activité d'inhibition.

L'utilisation d'un milieu tamponné a permis de constater des levées d'inhibitions pour 1 souche *Lactobacillus plantarum* vis-à-vis d'*E.coli* et d'une autre *Pediococcus acidilactici* vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* (Tahlaiti, 2019). Cela confirme l'effet de l'acidification du milieu. L'abaissement du pH peut être dû à la production de l'acide lactique seul ou bien à l'effet d'autres acides organiques produits par les souches. Les inhibitions dues à la production de peroxyde d'hydrogène, a été mise en évidence par traitement à la catalase sont présentes chez les 4 souches lactiques testées.

Le traitement des surnageant avec des enzymes protéolytiques (trypsine et  $\alpha$ -chymotrypsine) a permis d'observer l'absence d'inhibition contre les souches pathogènes pour les 4 souches testées, cela nous permet de conclure que les inhibitions produites vis-à-vis des bactéries pathogènes sont dues à la production de substance protéiques, probablement des bactériocine (Tahlaiti, 2019)



# Conclusion



### Conclusion

Actuellement, les infections microbiennes sont devenues une menace clinique, cela est principalement dû au développement de la résistance aux agents antimicrobiens existants. Par conséquent, il est essentiel que de nouvelles molécules ayant un effet inhibiteur microbien à large spectre continuent d'être recherchées.

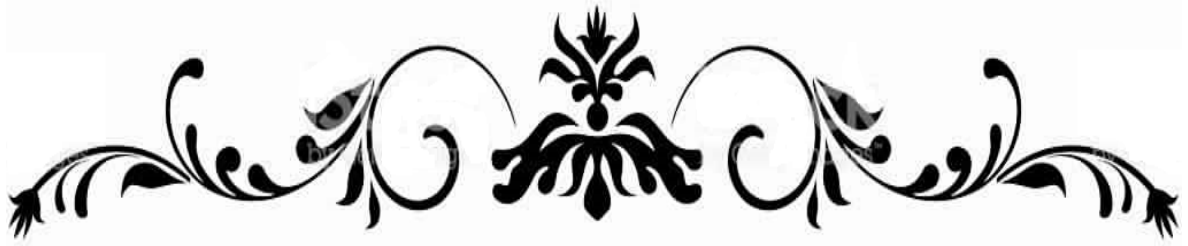
La recherche de nouveaux agents antimicrobiens d'origine naturelle est largement développée, et plus précisément les études sur potentiel inhibiteurs des bactéries lactiques. Ces microorganismes que l'on retrouve dans le lait, les produits laitiers et les végétaux, sont très utilisés en industrie agroalimentaire pour leurs propriétés technologiques mais aussi leur potentiel de conservation des aliments par des métabolites antimicrobiens. Ce potentiel inhibiteur est un atout à exploiter, car il permet l'inhibition de germes aussi bien à Gram-positif que Gram-négatif souvent responsables d'infections humaines.

Les agents antimicrobiens produits par les bactéries lactiques peuvent constituer une solution alternative aux antibiotiques.

Il est important d'exploiter les bactéries lactiques locales de diverses origines et rentabiliser leurs atouts. Des souches lactiques du genre *Lactobacillus* isolées de miels algériens de 4 différentes régions expriment une bonne activité antibactérienne contre des bactéries à Gram négatif.

D'autres souches lactiques, cette fois isolées du blé fermenté algérien ont aussi exprimé leur fort potentiel inhibiteur contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 97853. Il s'agit de deux souches appartenant aux espèces *Lactobacillus plantarum*, d'une souche à *Lactobacillus brevis* et une souche à *Pediococcus acidilactici*. L'investigation de l'agent inhibiteur de ces souches permet de suspecter l'effet combiné de plusieurs métabolites dont la production d'acides organiques, la production de bactériocines.

Ces résultats sont prometteurs, car ces souches pourraient être utilisées comme probiotiques. Il serait intéressant de les tester contre un plus grand nombre de bactéries pathogènes responsables d'infection humaines mais aussi d'autres pathologies animales comme les mammites. Et dans l'avenir purifier les bactériocines produites et étudier leurs propriétés et les employer dans des traitements médicaux.



# Références bibliographiques



## Références bibliographiques

---

**Abee T., Krockel L., Hill C. (1995)** - Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J. Food. Microbiol*

**Axelsson,L.(2004).**Classification and physiology. In: *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York.

**Alakomi, H.L., Skytta, E., Saarela, M.,Mattila-Sandholm,M.T., Katva-Kala, K., and Helander,I.M. (2000).** Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane.*Appl. Environ. Microbiol.* 66 (5): 2001-2005.

**Ammor, S., Tauveron,G., Duffour, E., and Chevallier,I. (2006).** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same small-scale facility producing traditional dry sausages: 1- Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17 (6), pp. 454-461

**Axelsson, L :( 1998).** Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: *Lactic acid bacteria*. Ed.S.Salminen and Avon Wright, Marcel Dece

**BEAL C; MARIN M ; FONTAINE E ; FONSECA F ; OBERT J.P.( 2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. Dans : *CORRIEU G., LUQUET F.M. Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*, Paris : Tec & Doc, Lavoisier, p. 661-765.

**Bourgeois,C. M et Larpent J, P. (1996) :** *Microbiologie alimentaire, Tome 2, Aliments fermentés* et fermentation alimentaires, 2ème édition. Tech et doc. Lavoisier Paris, P523

**BEKHOUCHE F. (2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état : Institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro- alimentaires (INATAA) : Constantine, Algérie

**Benmechernene, Z., H.F. Chentouf, B. Yahia, F. Ghazi, M. Quintela-Baluja, J. Calomata and Barros-Velázquez,J.(2013).** Technological aptitude and applications of *Leuconostocmesenteroide* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. *Bio Med ReseardInternational*.Volume 2013, Article ID 418132

## Références bibliographiques

---

**BENABBOU, A. (2012).** Antibiorésistance des bactéries lactiques isolées de produits artisanaux Oran algériens. Magister.

**Bocquien c.Y; Corrieu G; Desmazeaud M;** Effect of fermentation conditions on growth of *Streptococcus cremoris* AM2 and *Let/conostoc lactis* CNRZ 1091 in pure and mixed cultures, Ap.

**Boudjema k. (2008).** Essai d'optention de la production d'acide lactique sur lactosérum par streptococcus thermophilus, mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en biologie;option:biochimie et microbiologie appliqueés ; université M'hamed Bougara ,boumerdès.

**Babel, D. J. (1997).** Elie Metchnikoff's bacillus of long life. ASM News,

**Cholet, O. (2006).** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire des procédés alimentaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole doctorale ABIES.UMR de génie et microbiologie des procédés alimentaires INRA.

**Caplice , E, Fitzgerald, G. (1999).** Food fermentation: role of microorganisms in food productionand preservation. Int. J. Microbiol

**Corrieu G. and Luquet F. M ;(2008).** Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Editions TEC & DOC, Lavoisier, P271-415 ; 441-442

**Corrieu, F.-M. Luquet,** Bactéries Lactiques. De la génétique aux ferments, Lavoisier/Tec et• Doc (2008)

**Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (200)** Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. Curr Protein Pept Sci.6: 61-75

**Condon, J.B., Pradel, P. and Verdier, I. (1987).** Effect of forage type on milk yield, chemical composition and clotting properties of milk. Lait, 75: 513–521 Jasniewski J.

**Champagne C.P., Gardner N.J., Soullignac L. and Innocent J.P., 2000.**The production of freeze-dried immobilized cultures of *Streptococcus thermophilus*and their acidification properties in milk.*Journal of AppliedMicrobiology*, **88**:124-131.

**De Man J., Rogosa M. And Sharpe E., 1960.**A medium for the cultivation of lactobacilli.*Journal of AppliedBacteriology*, **23**:130-135.

## Références bibliographiques

---

**Delves-Broughton J. (1990):** Nisin and its uses as a preservative. Food Technol., 11, 100-112.

**Dellagio F., de Roissard H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D., ( 1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). Lorica, Uriage. 1

**Donkor ON, Henriksson A, Vasiljevic T et Shaha NP. (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

**Giraffa. G (2003).** Functionality of enterococci in dairy products. Int.J.Food Microbiol, 88: 215–222.

**Guiraud, JP. (2003) .** Microbiologie alimentaire. Dunod-RIA; 696

**Gerrit, S., A.S. Bart and J.M.E. Win, (2005).** Flavour formation by acid lactic bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products. FEMS. Microbiol. Rev.29:591-610.

**Hughenoltz,J., 1993.** Citrate metabolism in lactic acid bacteria. FEMS Microbiological Review 12:165-178.

**HWANHLEM N., BURADALENG S., WATTANACHANT S., BENJAKUL S., TANI A., MANEERAT S., 2011.** Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. Food Control, 22:

**Ho T.N.T., Taun N., Deschamps A., Cauber, T. (2007).** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam: Workshop on Food Safety and Processing Technology 401-407

**Homrani et al 2018:** Homrani Mounia, Dalache Fatiha, Bouzouina Mohammed, Nemmiche Said, Homrani Abdelkader.

Antibacterial activity of *Lactobacilli* detected in Algerian raw honeys against gram-negative bacteria South asian Journal of Experimental Biology; 8 (3): 83 - 90; 2018

**Klaenhammer T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid• bacteria.FEMS Microbiol. Rev., 12(1-3):39 – 85

**KASSAS, Z. (2017).** Croissance de souches de bactéries lactiques d'intérêts technologiques et/ou probiotiques sur MRS végétal modifié université de badji mokhtar – Annaba, 158 .

## Références bibliographiques

---

**Khalid, N.M., et Marth, E.H. (1990).** Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening spoilage of cheese. Rev.DairySc, 73:158-167

**Larpent J.P. (1997).** Microbiologie alimentaire. Tec & doc, Lavoisier. Paris

**Law J. and Haandrikman A. (1997).** Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. Int. Dairy J

**Labioui H., Elmoualdi L., El Yachoui M. et Ouhssine M., 2005.** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 144 : 237- 250.

**Mathot, A. G., Kihal, M., Prévost, H., et Diviés, C. (1994).** Selective enumeration of *Leuconostoc* on Vancomycin Agar Medium. International Daily Journal. 4: 459-469

**Mehidi N., 2015.** Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques isolées du lait de chamelle. Mémoire du Diplôme Master en Agronomie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou Bekr Belkaib Tlemcen Algérie.

**Monnet V, Latrille E, Béal C et Corrieu G. (2008).** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc. Lavoisier. Paris, 512-592

**Nehem Nancy. (2008).** Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni* impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes. . Thèse pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse.

**Robert,H.,V. Gabriel, D. Lefebre, P. Rabier, Y. Vayssier and C. Fontagné-Faucher, (2006).** Study of the behaviour of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* starters during a complete wheatsourdough breadmaking process. LWT Food Sci. Technol, 39,256-265

**Robertson, A., Tirado, C., Lobstein, T., Jermini, M., Knai, C., Jensen, J. H., Ferro-Luzzi, A., and James, W. P. (2004)** Food and health in Europe: a new basis for action. WHO Reg Publ Eur Ser: ixvi, 1-385, back cover

**Rothe M et Blaut M.(2013).** Evolution of the gut microbiota and the influence of diet. Benef Microbe.

## Références bibliographiques

---

**Stiles, M.E. and W.H. (Holzapfel, 1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food. Microbiol*

**Šramková Z., Gregová E. and Šturdíka E. (2009).** Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, vol. 2, pp 115 – 138

**Swain, M.R., Anandharaj, M., Ray, R.C., et Rani, R.P.(2014).** Fermented fruits and vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics. *Biotchnology Research International*, Hindawi Publishing Corporation, Volume 2014, Article ID 250424,

**Terzaghi B. E. and Sandine W. E., 1975.** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, **29**: 807-813.

**Tahlaiti Hafida 2019 :** Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté Université de Mostaganem filière sciences agronomiques ,

**Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. (1976).** Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 40, 3: 722-756

**Twomey, D., Ross, R. P., Ryan, M., Meaney, B., and Hill, C. (2002)** Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82: 165-185

**Upadhyay, V.K., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A., et Fox, P.F., 2004.** Proteolysis in cheese during ripening. In Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. and Guinee, T.P. (eds), *General Aspects. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol 1, 3ème édition pp 391-434. Elsevier, London, England.

**Ugenholtz J; Veldkamp H. (1985).** Competition between different strains of *Streptococcus cremoris*, F.E.M.S. *Microbi. Eco.* 31

**Vasiljevic T., Shah N. P. (2008).** « Probiotics - From Metchnikoff to bioactives ». *International Dairy Journal*. juillet 2008. Vol. 18, n°7, p. 714-728.

**Wilson, A. R., Sigeo, D. and Epton, H. (2005).** Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1516-1522

## Références bibliographiques

---



# Annexes



### **Milieu Tryptica-Soja Liquide:**

Peptone De Caséine	17g
Peptone De Farine De Soja	3 G
Glucose	2,5 G
Chlorure De Sodium	5 G
Phosphate Dipotassique	2,5 G
Eau	1000 MI

### **Milieu Tryptica-Soja Semi Solide**

Tryptica-Soja Liquide	1000ml
Agar-Agar	8.2g

### **Milieu PCA- Lait:** (PH =7 ,2)

Tryptone	5g
Extrait de levure	2.5g
Glucose	1g
Agar- agar	15g
Poudre de lait écrémé (0%)	1g
Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 115°C pendant 20min (**Gemelas et al ,2013**)

### **Milieu MRS :** PH = 6,5

Peptone	10g
Extrait de viande	10g

## Annexes

---

Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7 H <sub>2</sub> O	0,2g
Sulfate de magnésium, 4 H <sub>2</sub> O	0,5g
Pour obtenir un milieu solide on ajoute l'Agar-agar	
Agar- agar	15g
Eau distillée	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15min (**De Man, Ragosa et Sharp, 1960**)

### **Milieu M 17 :**

Tryptone	5g
Peptone papainique	2,5g
Poptone pepsique de viande	5g
Acide ascorbique	0,5g
Lactose	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Mg SO <sub>4</sub>	0,25g
Extrait de viande	5g
Extrait de levure	2,5g

Pour obtenir un milieu solide on ajoute l'Agar-agar

Agar- agar 15g

Eau distillée 1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15min (**Terzaghi et Sandine ,1975**) .

### **Coloration de Gram :**

1-déposer une goutte d'eau de physiologique stérile sur une lame bien propre.

2-prélever un échantillon de colonie et mélangé avec la goutte d'eau.

Strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.

3-Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincez à l'eau.

4-Mordantage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étalez le lugol et laissez agir le même temps que le violet de gentiane ; rincez à l'eau déminéralisée.

5-Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone)est l'étape la plus importante de la coloration : versez goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveillez la décoloration qui doit être rapide. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincez abondamment avec de l'eau déminéralisée pour stopper la décoloration.

6-Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Mettez de l'eau distillée sur la lame et quelques gouttes de fuchsine. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute. Lavez doucement à l'eau déminéralisée. Séchez la lame sur une platine chauffante à 50°C.

7-Observez avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement ×1000)