

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie Appliquée
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie Alimentaire et Santé



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

*Etude de l'activité antibactérienne de quelques souches
des bactéries lactiques isolées du l'ben traditionnel à
l'égard des souches pathogènes responsables des infections
urinaires*

Présenté par :
SAHED Djamila
Soutenu le : 13 Juin 2016

Devant le jury composé de :

Mr MOUSSAOUI. B
Mme FERADJI-HAMMA.S
Mlle YANAT. B

MAA Président
MCB Encadreur
MAA Examineur

Année universitaire : 2015 / 2016 .

Remerciements

Au terme de ce modeste travail, je rends louanges à Allah le tout puissant de m'avoir donné le courage et la volonté de l'avoir accompli.

Je tiens à remercier ma promotrice Madame Faradji-Hamma pour ses conseils chaleureux, son soutien et son bon encadrement afin de réaliser ce modeste travail.

Mes vifs remerciements vont également aux membres de jury qui ont bien voulu accepter d'examiner mon travail :

Monsieur Moussaoui d'avoir accepté de présider le jury

M^{elle} Yanat Betitera d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail

Je remercie tout le personnel du laboratoire de microbiologie appliqué

Et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la concrétisation de ce travail.

Dédicace

Chaque jour qui passe je remercie Allah, et je le pris tout le temps de me donner la force de suivre le chemin qu'il m'a tracé afin de mener à bien le destin qu'il m'a prévu.

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents que j'aime et qui m'ont soutenu tout au long de ma vie et de mes années d'études.

A mes sœurs : Aichouche, Lélia, Meriem, Mbarka et mon frère Amir

A ma famille paternelle : Ma grand-mère Saliha, Mes chers oncles : Dada Rabah, Smail, Mouloud, Djamel, Mustapha et leurs femmes Saïda, Nora, Zahra, Saïdia et ma famille maternelle : Ma grand-mère Randja et mes oncles : Djelloul , Djamel, Bachir, Hafid , Djilali et mes tantes Lynda , Rosa et sa fille Maryliss.

Mes dédicaces ne seront pas complètes sans citer ma belle-famille ; ma belle-mère Ndjima , mon beau-père Rachid, ma deuxième grand-mère Djidjiga ; mes deux beaux frères Kamel et Anis.

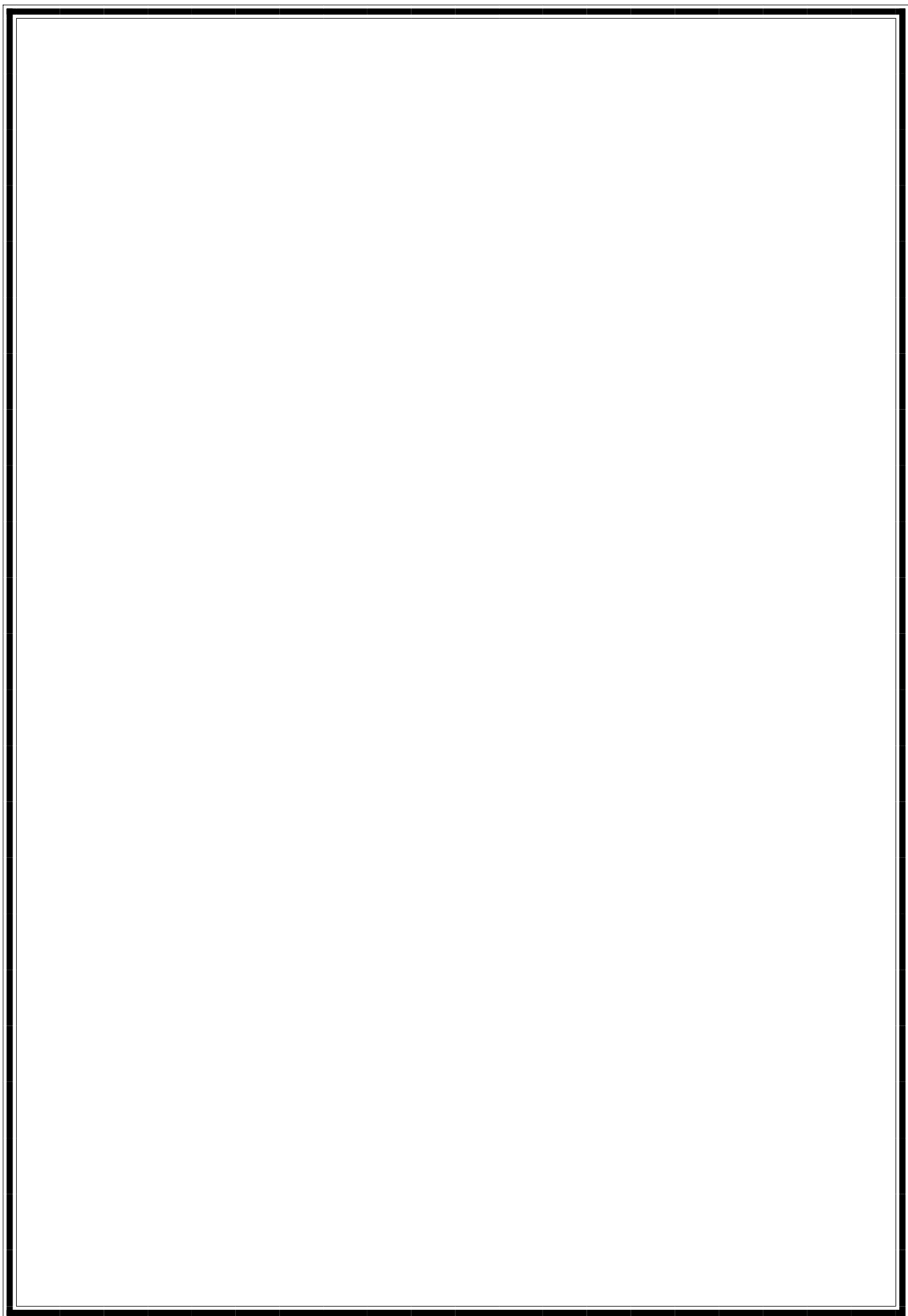
A mon confident qui est mon fiancé Khelaf qui m'a beaucoup soutenu et encouragé.

A mes très chères cousines : Yasmine, Koukou, Massiva, Fariza, Célia, Karima, Samira, Radia, Ryma, Thiziri, Inas, Racha, Dalia et Iman Et mes très chers cousins : Ghiles et sa femme Zahra, Kouceila, Lyes, Walid, Youba, Kiki le petit islam, Abdelhak, Hacen, Adel, Bitouh, Imad , Salas , Mohamed et Said avec qui j'ai partagé toute ma vie, je leurs adresse un grand merci, pour leur confiance et leurs qualités humaines, que dieu me les garde jusqu'à la fin de nos jours.

A mes très chères copines : Amina, Thinhinane, Binouh , Céline, Samira, Nouara, Lédia, Meriem, Hania, Lédia, Kenza, Kaissa et Wafa.

A mes très chères amis : Cherif et Younes.

A mes amis de la promotion de Microbiologie Alimentaire Santé ; Samira, Assia , Sara, Assia , Lamia, Widad, Nadine et Thinhinane.



Liste des figures

Figure 1 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques.....	Annexe I
Figure 2 : Mécanismes mis en jeu par les lactobacilles vaginaux pour inhiber les pathogènes.....	Annexe II
Figure 3 : Protocole de la revivification de la pureté des souches lactiques.....	17
Figure 4 : Protocole de standardisation des inocula lactiques.....	19
Figure 5 : Schéma de réalisation du test des spots.....	21
Figure 6 : Protocole de récupération du surnageant de culture de bactéries lactiques.....	Annexe II
Figure 7 : Schéma représentatif du test des puits.....	23
Figure 8 : Résultat du test de catalase réalisé sur les bactéries lactiques et les souches cibles.....	28
Figure 9 : Résultat du test d'antagonisme vis-à-vis SARM.....	29
Figure 10 : Résultat du test d'antagonisme vis-à-vis <i>E.coli</i> ATCC 25922.....	29
Figure 11 : Diamètres des zones d'inhibition des 30 souches lactiques sélectionnées à l'égard de <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méthicilline.....	30
Figure 12 : Diamètres des zones d'inhibition des 30 souches lactiques sélectionnées à l'égard d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	31
Figure 13 : Exemples de résultats d'antagonisme vis-à-vis des souches pathogènes Utilisées.....	32
Figure 14 : Résultats du test des puits avec le surnageant natif.....	35
Figure 15 : Résultats du test des puits avec le surnageant neutralisé.....	38
Figure 16 : Résultats du test des puits avec les surnageants neutralisé après traitement avec la pepsine.....	41

Figure 17 : Quelques résultats du test de la détermination de la sensibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques..... 42

Liste des tableaux

Tableau I : Les différentes classes des bactériocines.....	Annexe II
Tableau II : Origine des souches lactiques utilisées.....	Annexe II
Tableau III : Les souches pathogènes responsable des infections urinaires utilisées.....	15
Tableau IV : Indications à suivre pour la préparation du tampon phosphate.....	Annexe II
Tableau V : Les antibiotiques utilisés pour définir la sensibilité de nos souches Lactiques.....	Annexe II
Tableau VI : Résultats d'observations macroscopiques des souches cibles.....	24
Tableau VII : Résumé de l'observation microscopique des souches lactiques.....	25
Tableau VIII : Résumé de l'observation microscopique des souches cibles.....	Annexe II
Tableau IX : Résultats de standardisation des souches lactiques isolées du l'ben Traditionnel.....	Annexe II
Tableau X : Résultats de standardisation des souches cibles utilisée.....	Annexe II
Tableau XI : Les résultats de la sélection des bactéries lactiques ayant une importante activité antimicrobienne à l'égard de SARM et <i>E.coli</i> AT CC 25922.....	Annexe II
Tableau XII : Résultats d'effet antibactérien des bactéries lactiques sélectionnées à l'égard des souches pathogènes responsables des infections urinaires (Test des Spots)...	Annexe II
Tableau XIII : Résultats d'effet antibactérien des bactéries lactiques sélectionnées à l'égard des souches pathogènes responsables des infections urinaires (Test des Spots)....	Annexe II
Tableau XIV : Résultats d'effet antibactérien des bactéries lactiques sélectionnés ; obtenus a partir du test des puits avec un surnageant natif et ajusté	Annexe II
Tableau XV : Résultat de l'effet inhibiteur des surnageants des 6 souches lactiques vis-à-vis des souches pathogènes après traitement avec la pepsine.....	Annexe II
Tableau XVI : Résultats de la résistance des 30 souches lactiques aux antibiotiques.....	40

SOMMAIRE

Introduction	1
---------------------------	----------

Synthèse bibliographique

Partie I : Les bactéries lactiques

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

II. Caractéristiques des principaux genres

II.1. <i>Lactobacillus</i>	4
II.2. <i>Lactococcus</i>	5
II.3. <i>Streptococcus</i>	4
II.4. <i>Leuconostoc</i>	6
II.5. <i>Pediococcus</i>	6

Partie II : Antagonisme des bactéries lactiques

III. Pouvoir antagonisme des bactéries lactique.....	7
---	----------

III.1.Substances antibactériennes produites par les bactéries lactiques.....	7
---	----------

III.I.1. Acides organiques	7
III.I.2. Peroxyde d'hydrogène	7
III.I.3. Reutéline.....	8
III.I.4. Diacétyl.....	9
III.I.5. Dioxyde de carbone.....	9
III.I.6. Acétaldéhyde.....	9
III.I.7. Bactériocines.....	9

IV. Infection urinaire.....	10
------------------------------------	-----------

IV.1. Les bactéries impliquées dans les infections urinaires	11
---	-----------

IV.1.1. Les entérobactéries.....	11
---	-----------

IV.1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	11
---	----

IV.1.1.2. <i>Proteus sp</i>	12
-----------------------------------	----

IV.1.1.3. Autres Entérobactériacae impliquées dans l'infection urinaire.....	12
--	----

Partie pratique

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1. Les souches utilisées	14
I.1.1. Les souches tests.....	14
I.1.2. Les souches cibles.....	14
I.2. Revivification des souches utilisées	15
I.2.1. Les souches tests.....	15
I.2.2. Les souches cibles.....	16
I.3. Vérification de la pureté des souches utilisées	16
I.4. Standardisation des inocula	18
I.5. Recherche de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques	20
I.5.1. Test de spots	20
I.5.2. Test de puits	22
I.5.3. Traitement avec les protéases.....	22
I.6. Détermination de la sensibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques	23

Chapitre II : Résultats et Discussions

II.1. Revivifications des souches utilisées	24
II.2. Vérification de la pureté des souches utilisées	24
II.2.1. Observation macroscopique.....	24
II.2.2. Observation microscopique.....	26
II.2.3. Test de catalase.....	28
II.3. Standardisation des inocula	28
II.4. Etude de l'activité antibactérienne	28
II.4.1. Test de spots	29
II.4.1.1.L'effet antibactérien des bactéries lactiques sélectionnées à l'égard des bactéries pathogènes responsables des infections	

urinaires.....31

II.4.1.1.1. Antagonisme des bactéries lactiques à l'égard de *Klebsiella pneumoniae*..... 33

II.4.1.1.2. Antagonisme des bactéries lactiques à l'égard de *Proteus sp*..... 33

II.4.1.1.3. Antagonisme des bactéries lactiques à l'égard d'*Enterobacter cloacae*.....33

II.4.1.1.4. Antagonisme des bactéries lactique à l'égard d'*Escherichia coli*.....34

II.4.2. Test de puits..... 34

II.4.2.1. Effet des acides organiques 37

II.4.3. Traitements avec les protéases..... 40

II.5. La détermination de la sensibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques..... 41

Introduction

L'hypothèse d'Elie Metchnikoff sur l'effet bénéfique des bactéries lactiques et leur capacité d'inhiber certains pathogènes a stimulée la recherche sur ces bactéries (**Rezgui, 2002**).

Les bactéries lactiques sont utilisées pour leurs différentes propriétés. Elles ont la capacité de produire lors de leurs croissance des composés actifs à savoir les acides organiques, des dérivés du métabolisme de l'oxygène (H₂O₂) et des substances naturelles de nature protéique douées d'activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération (**Vinod Kumar et al., 2006**). Parmi ces substances synthétisées, des peptides dénommés bactériocines, sont produits puis excrétés à l'extérieur des cellules productrices. Ils présentent une activité bactéricide ou bactériostatique (**Ammor et al., 2006**).

L'infection urinaire occupe la deuxième place après l'infection respiratoire, elle est l'une des infections les plus communes et constitue un fardeau important pour les ressources du système de santé. En milieu communautaire, elle touche principalement les femmes actives sexuellement mais également les gens de tout âge. En milieu hospitalier, les personnes âgées et les porteurs de sondes urinaires sont les principaux patients touchés (**Thirion et Williamson, 2003**). Elles sont causées par les bactéries à Gram négatif tels que les entérobactéries, ou par les bactéries à Gram positif tel que les cocci (*Enterococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*) (**Bidet et Bingen, 2007**)

Les infections urinaires sont couramment traitées par des antibiotiques. Cependant, de plus en plus de chercheurs pensent que l'utilisation d'antibiotiques peut rompre l'équilibre naturel des flores bactériennes de l'organisme (flore digestive mais aussi vaginale), ce qui augmente le risque de récurrence. Ainsi, afin de lutter contre ces pathogènes, il semble intéressant de rééquilibrer la flore par apport de souches lactiques exogènes probiotiques ; Les probiotiques permettent en effet de rééquilibrer et renforcer la zone vaginale pour prévenir l'apparition et aider à l'évacuation de certaines bactéries (**Barrons et Tassone, 2008**)

En vu de tous ces intérêts portés aux bactéries lactiques, Ce travail consiste à étudier *in vitro* l'activité antibactérienne de quelques souches de bactéries lactiques isolées du l'ben traditionnel et appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* , *Streptococcus* et *Pediococcus* à l'égard de souches pathogènes responsables des infections urinaires. Pour cette raison, notre travail est structuré comme suit :

Une partie bibliographique où des informations générales sur les bactéries lactiques et leurs pouvoirs antibactériens, et sur les infections urinaires sont données suivie d'une partie pratique où nous avons en premier lieu exposé la méthodologie suivie pour l'étude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes responsables des infections urinaires. En deuxième lieu, nous avons illustré et discuté les résultats obtenus. En dernier, nous avons achevé notre travail par une conclusion et perspectives.

I- Généralités sur les bactéries lactiques

La première définition de bactéries lactiques (BL), basée sur la capacité des bactéries à fermenter et à coaguler le lait, englobait des bactéries coliformes et lactiques (**Stiles et Holzapfel, 1997**).

Les bactéries lactiques sont des microorganismes hétérotrophe et chimio-organotrophes. Elles sont Gram positives, immobiles, asporulés, anaérobies mais aérotolérantes, et ne possédant pas de catalase (certaines souches possèdent une pseudocatalase), de nitrate réductase, et sont oxydase négatif. Elles ont des exigences nutritionnelles nombreuses (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) (**Holzapfel et al., 2001 ; Gevers, 2002**). Elles appartiennent au phylum des Firmicute, la classe des Bacilli et à l'ordre des Lactobacillales (**Ammor, 2004**).

Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement glucidique qui, en utilisant les glucides, elles peuvent produire soit de :

- L'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes)
- L'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives).
- L'acide lactique, et de l'acide acétique ou de l'éthanol et de CO₂ (bactéries hétérolactique strictes) (**Vandamme et al., 1996**).

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires retrouvées. Elles sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères ou des canaux galactophores. Ainsi que dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromage) (**Dellaglio et al., 1994**).

Depuis quelques années, des études génétiques se sont développées autour des bactéries lactiques et notamment sur *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* (**Drouault et Corthier, 2000**). Ces études ont montré que la plupart des propriétés technologiques des bactéries lactiques ne sont pas conférées par le chromosome mais par des éléments génétiques plus petits, extérieurs au chromosome, se divisant de manière autonome dans la cellule, ce qu'on appelle les plasmides (**Larpent, 1997**).

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par **Orla-Jensen**. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés

morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimiotaxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (**Krieg, 2001**). Cependant, les études basées sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S ont montré que certains taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne concordent pas avec les relations phylogénétiques suggérées. Ainsi, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par des caractéristiques phénotypiques (**Gevers., 2002**). Par conséquent, les méthodes de typage moléculaire telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la réaction de polymérisation en chaîne utilisant des éléments répétés (rep-PCR), ainsi que la méthode de (RFLP) sont extrêmement précieuses pour la caractérisation et la détection des bactéries lactiques (**Holzappel et al., 2001**).

Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents :

Lactobacillus, Bifidobacterium, Leuconostoc, Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus, Carnobacterium, Oenococcus Weissella, Aerococcus, Tetragenococcus, Vagococcus. (**Carine et al., 2009**).

Ces bactéries sont recherchées pour d'autres qualités nutritionnelles et thérapeutiques dans des préparations appelées Probiotiques (**Leveau et Rouix, 1993**). Les bénéfices potentiels des probiotiques (**Figure 1, Annexe I**) vont de la Suppression de l'activité de certains pathogènes à l'amélioration de l'utilisation du lactose, de la réduction du cholestérol sanguin et du niveau de substances carcinogènes. et de l'inactivation de composés toxiques à la stimulation du système immunitaire (**Bottazzi, 1994**).

Taranto et al. en **1998** ont mis en évidence l'effet hypocholestérolémiant de *Lb. reuteri* CRL1098 consommé à 10^4 cellules par jour pendant 7 jours par des souris hypercholestérolémiques dont la teneur totale en cholestérol a diminué de près de 40 % à la fin du traitement.

Les lactobacilles vaginaux ont été découverts dans les années 1890 par **Doderlein** qui décrit la flore vaginale comme homogène et constituée de bacilles Gram positif. Par la suite, dans les années 1900, **Metchnikoff** fut le précurseur de l'utilisation de lactobacilles dans le but de restaurer la microflore intestinale via la consommation de laits fermentés. Puis, dans les années 1930, **Molher et Brown** furent les premiers à proposer un traitement des vaginites

et de la vaginose par l'application d'une culture de bacilles de Doderlein. L'idée de la bactériothérapie contre les infections vaginales est ainsi née.

Depuis, différentes études ont montré l'efficacité de l'application de souches de lactobacilles exogènes au niveau vaginal pour lutter contre les infections urinaires ; **Bruce et al.** en 1992 ont administré une ovule à 2.10^9 cellules de souches de *Lb. casei* GR-1 et *Lb. fermentum* B-54 par semaine pendant 1 an à 10 patientes souffrant d'infections urinaires récidivantes. A la suite de ce traitement, la moitié de ces femmes n'ont plus déclaré de récurrences. Les suppositoires vaginaux (Vivag, Pharma-Vinci, Dannemark) ont été utilisés dans la thérapie contre ces infections.

De ce fait, la définition originelle des probiotiques proposée par **Fuller en 1989** dans laquelle l'application probiotique était réservée au côlon, s'est généralisée à divers compartiments de l'hôte dont le vagin (**FAO/WHO, 2001**).

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques grâce à leur structure et physiologie. Les travaux de **Temmerman et al. (2003)** ont montré que 68.4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. En règle générale un organisme probiotique ne doit pas être résistant aux antibiotiques, s'il est résistant le gène de la résistance devrait être situé sur le chromosome (**Chesson, 2001**). Par conséquent, avant de lancer une culture probiotique, il est important de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne comportent pas de gènes transmissibles de résistance aux antibiotiques (**Ammor et Mayo, 2007**).

II. Caractéristiques des principaux genres

II.1. *Lactobacillus*

Lactobacillus est le principal genre de la famille des *Lactobacillaceae*. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés ou gros) souvent groupés en chaînes, immobile, se développant à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Le genre *Lactobacillus* contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses fabrications ou qui sont rencontrées comme contaminants (**Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994**). Ce genre a été subdivisé par Orlan-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (**Guiraud et Rosec, 2004**) :

- **Groupe I « *Thermobacterium* »** : Comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 40°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans les aliments (lait, yaourt, fromage...) sont *Lb. Helveticus*, *Lb. delbrueckii* et *Lb. acidophilus*.
- **Groupe II « *Streptobacterium* »** : Regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans les aliments sont : *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* et *Lb. plantarum*.
- **Groupe III « *Betabacterium* »** : Ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. sanfransisco*.

Les espèces de *Lactobacillus* ont une grande affinité d'adhésion aux cellules épithéliales. Ainsi les lactobacilles vont saturer les récepteurs et exercer un effet barrière vis-à-vis des pathogènes impliqués dans les infections urogénitales chez la femme comme les streptocoques du groupe B « SGB », *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) (**Figure 2 , Annexe I**)(Za'rat et al., 2006).

II.2. *Lactococcus*

Les lactocoques appartiennent à la famille des *Streptococcaceae*. Ils se présentent sous forme de coques en paires ou en chaînes de longueur variable. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, ils sont capables de se développer à 10°C mais pas à 45°C. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar *diacetylactis* produit le diacétyle. (Tamime, 2002). Le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces dont *Lactococcus lactis* qui est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. Lactis* ssp. *lactis*, *Lc.lactis* ssp. *cremoris* et *Lc.lactis* ssp. *hordniae* (Pot, 2008).

II.3. *Streptococcus*

Comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *S. pyogenes* et *S. agalactiae* d'autres sont impliquées dans la formation de la plaque dentaire (*S. mutans*). L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène. Du fait de

ses propriétés technologiques, c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique (Laurent et al., 1998)

II.4. *Leuconostoc*

La famille des *Leuconostocaceae*, contient des coques ovoïdes, pouvant être allongés ou elliptiques. Ce sont des cellules sphériques disposent en paire ou en chaîne, elles sont caractérisées par un métabolisme hétérofermentaire en convertissant le glucose en D-lactate et éthanol ou en acide acétique (Gonzalez et al., 2007). On range habituellement les leuconostocs dans les anaérobies facultatifs, mais certains les considèrent comme des anaérobies aérotolérants. Ils sont exigeants et présentent souvent une auxotrophie pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et les glucides (Dellaglio et al., 1994). Ce genre comprend les espèces suivantes : *Ln. mesenteroides* avec ces sous espèces *mesenteroides cremoris* et *dextranicum* et *Ln. lactis* et *Ln. Pseudomesenteroides* et *Ln. paramesenteroides* (Collins et al., 1993 ; Laease, 2005).

II.5. *Pediococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005) .

III. Pouvoir antibactérien des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont d'une grande importance dans l'inhibition des micro-organismes pathogènes et des micro-organismes d'altération au niveau des aliments et dans la thérapie humaine et animale, grâce au pouvoir antagonisme qu'elles possèdent. Selon **de Roissard et Luquet, (1994)** et **Oh *al.*, (2006)**.

III.1. Substances antibactériennes produites par les bactéries lactiques

III.1.1. Acides organique

Les bactéries probiotiques produisent l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide propionique ainsi qu'une faible quantité d'acide formique, d'acide succinique, et d'éthanol (**kostinek et *al.*,2006**).

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques (**Brul et Coote, 1999**). L'acide lactique est le métabolite principal des bactéries lactiques causant la réduction du pH qui inhibe largement les microorganismes (**Eklund, 1989 et Schnürer et Magnusson, 2005**). La principale molécule responsable de l'acidification du vagin est l'acide lactique. Elle est synthétisée via la fermentation lactique du glycogène présent dans le fluide vaginal par les lactobacilles et par l'épithélium (**Boskey et *al.*, 2001**).

Les acides organiques produits peuvent diffuser passivement à travers la membrane sous leur forme non dissociée. Ils acidifient le cytoplasme après dissociation et inhibent l'activité enzymatique cellulaire des pathogènes acidosensibles (**Boskey et *al.*, 2001**). En milieu acide, les bactéries doivent dépenser de l'énergie pour maintenir leur pH intracellulaire, ce qui affecte leur viabilité (**Dacosta, 2000 ; Gauthier, 2002 ; Rousseau, 2004**).

Selon **Praag, 2009**, il a été démontré qu'une concentration en acide lactique de 3,2 mM a été nécessaire pour inhiber le développement d'*E.coli*.

III.1.2. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de cytochrome pour assurer la phosphorylation oxydative (réduisant O₂ en H₂O) mais utilisent des flavoprotéines pour l'oxydation terminale (convertissant O₂ en H₂O₂) (**McGroarty, 1988**). Ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques généralement en présence d'un substrat à oxyder. Ces enzymes ont été

retrouvées chez des souches de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Condon, 1987)

La toxicité du peroxyde d'hydrogène est due au pouvoir oxydant de la molécule elle-même ou de ses métabolites OH[·] (radical hydroxyle) et O₂⁻ (anion superoxyde) produits par des agents réducteurs (ions halogénures du type Cl⁻) et des enzymes peroxydases qui sont présentes dans le fluide vaginal. Ces molécules peuvent agir sur les protéines (inactivation des enzymes cytoplasmiques), les lipides membranaires (augmentation de la perméabilité membranaire) et les acides nucléiques (induction de mutations de l'ADN). Par contre, l'autodestruction des lactobacilles et les lactocoques est évitée pour ceux possédant une NADH peroxydase qui transforme le peroxyde d'hydrogène (Miyoshi et al. 2003 ; Rousseau, 2004).

Il a été montré que la production de peroxyde d'hydrogène par des souches de *Lactobacillus* ou *Lactococcus* lors de cultures mixtes inhibait la croissance de *S. aureus*. (Ocaña et al., 1998)

III.1.3. La Reutéline

La reutéline ou (β-hydroxypropionaldehyde) est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* (El-Ziney et al, 1998). La fermentation du glycérol se déroule en deux étapes. Le glycérol sera tout d'abord déshydraté par une « glycérol déshydratase » pour former la reutéline qui sera ensuite réduite en 1,3-propanediol par une oxydoréductase. Cette deuxième étape est inhibée en l'absence de glucose. La reutéline s'accumule alors dans le microorganisme producteur. A haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme : *Lactobacillus reuteri* y sont plus résistantes (Vollenweider, 2004).

Il a été observé que la reutéline augmente le temps de génération de cellules cibles, en plus lorsqu'il y a une forte production son rôle s'amplifie et empêche complètement la division cellulaire. La reutéline combinée à un pH bas conduit au blocage de la division cellulaire et on peut avoir un meilleur effet en la combinant avec du chlorure de sodium (Rash et al., 2007)

III.1.4. Le diacétyl (2,3-butanedione)

C'est un métabolite du citrate ou du pyruvate produit par des bactéries lactiques. Il confère aux produits un arôme de beurre, possède une activité antimicrobienne, qui est plus grande à l'égard des bactéries à Gram négatif, des moisissures et des levures qu'à l'égard des bactéries à Gram positif (**Dacosta, 2000**)

Le diacétyl empêche la croissance des bactéries à Gram négatif en réagissant avec une protéine fixatrice d'arginine, affectant l'utilisation de cet acide aminé (**Ammor et al., 2006**)

Dans l'étude de **Vinderola et al. (2002)**, à la concentration de 50ppm, le diacétyl a inhibé la croissance d'*Escherichia coli*.

III.1.5. Le dioxyde de carbone

Celui-ci est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Dortu et Thonart, 2009**)

III.1.6. L'acétaldéhyde (CH₃-CHO)

Il est produit au cours du métabolisme des glucides par les bactéries lactiques hétérofermentaires. Il est estimé qu'à des concentrations de 10 à 100 ppm, il inhibe certains agents pathogènes

III.1.7. Les bactériocines

Les bactériocines sont des composées de nature protéique (30 à 60 acides aminés), synthétisées par voie ribosomale (**Ammor et al., 2006**), Elles sont généralement actives à faible concentration contre des bactéries phylogénétiquement proches de la souche productrice (**Cotter et al., 2005**). Leur activité antimicrobienne est soit bactéricide, provoquant la mort de la bactérie cible, ou bactériostatique inhibant la croissance bactérienne (**Cotter et al., 2005**). Les bactéries productrices sont protégées de l'action de leurs propres bactériocines par l'action d'une ou de plusieurs protéines d'immunité (**Heng et al., 2007**).

Les bactériocines sont généralement hydrophobes et thermostables ou hydrophiles et thermolabiles (**de Vuyst et al., 2004**). Sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être

dégradées par les protéases produites par la bactérie productrice (**Savijoki et al., 2006**). Le siège de l'activité des bactériocines est la membrane cellulaire (**Dortu et Thonart, 2009**).

La charge positive des bactériocines est habituellement à pH neutre, ce qui leur permet d'interagir de façon électrostatique avec les membranes et/ou avec la partie acide des parois cellulaires des bactéries cibles. L'hydrophobicité des bactériocines est habituellement de nature amphiphile ; ces propriétés biochimiques leur permettent de perméabiliser la membrane des bactéries sensibles, ce qui provoque une perte d'ions et de molécules à faible poids moléculaire et éventuellement la mort de la cellule (**Lechance, 2000 ; Oscariz et Pisabarro, 2001**). Selon leurs poids moléculaire, propriétés biochimiques, spectre et mode d'action, les bactériocines sont divisées en 3 classes (**Dortu et Thonart, 2009**).

Les différentes classes de bactériocine sont résumées dans le **tableau II (Annexe 1)**

IV. Infections urinaire

La survenue d'infection urinaire est liée soit à un déficit des défenses de l'hôte, soit au développement dans la flore urétrale d'une bactérie uropathogène. Les voies urinaires représenteraient le second site d'infection bactérienne communautaire après l'appareil respiratoire (**Caron, 2010**).

Généralement l'infection débute par la colonisation du tube digestif avec une souche uropathogène qui, grâce à la présence de facteurs de virulences, va coloniser l'aire péri-urétrale et migre le long de l'urètre vers la vessie, puis le long de l'urètre vers le rein (**Mariani-Kukdjian, 2004**).

Il existe une relation étroite entre les infections vaginales et les infections urinaires (le plus souvent dues à *Escherichia coli*). En effet, la plupart des infections vaginales sont dues à la migration de pathogènes du rectum vers le vagin, qui peut aussi se déplacer vers le système urinaire induisant des infections du tractus urinaire (**Reid and Bruce, 2003**).

Une étude de **Foxman et al** en **2002**, a montré que quasiment une femme sur trois connaîtrait un épisode d'infection urinaire nécessitant un traitement antibiotique avant d'avoir atteint l'âge de 24 ans. Une autre étude estime qu'environ la moitié des femmes ayant été atteintes d'infection urinaire subiraient une récurrence dans les 12 mois (**Ikäheimo et al.1996**)

La flore vaginale (appelée aussi flore de Döderlein) et les lactobacilles qui la composent jouent un rôle protecteur vis-à-vis des germes pathogènes. Cependant, l'équilibre

de la flore vaginale peut être fragilisé par les traitements antibiotiques, la prise des contraceptifs oraux ou encore en période de grossesse et peut conduire au développement d'une cystite par contamination à partir des bactéries fécales. L'utilisation de probiotiques sélectionnés, permet de restaurer et de maintenir l'équilibre de la flore vaginale, en cas d'infections urinaires à répétition. De nombreuses études ont montré l'effet bénéfique dans la prévention des cystites (**Barrons et Tassone, 2008**).

Il y a des preuves, y compris des données randomisées et contrôlées, qui indiquent que les gélules vaginales de souches de *Lactobacillus* GR-1 et B-54 lyophilisées appliquées une fois par semaine préparées avec adjonction de lait écrémé (**Reid et al., 1998**) et l'ingestion une fois par jour par voie orale d'une capsule de souches de *Lactobacillus* GR-1 et RC-14 peuvent restaurer une flore vaginale dominée par les *lactobacillus* et réduire le risque de réapparition des infections urinaires (**Reid et al., 2001**)

IV.1. Les bactéries impliquées dans les infections urinaires

Les bactéries les plus fréquemment isolées appartiennent à la famille des entérobactéries mais cela n'exclue pas les autres bacilles à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*) ou cocci à Gram positif (*Staphylococcus sp.* Et *Enterococcus sp.*) qui peuvent être également impliquées (**Ben Abdallah et al., 2008**)

IV.1.1. Les entérobactéries

Sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, le plus souvent mobiles grâce à une ciliature péritriche, Elles sont aérobies-anaérobies facultatives et cultivent sur les milieux ordinaires, elles n'ont pas d'oxydases mais possèdent plutôt une catalase

4.1.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli uropathogène est la cause principale de ces infections (**Bower et al., 2005 ; Chassin et al., 2007 ; Wiles et al., 2008**). Elle est responsable de plus de 80 % des infections urinaires (**Thirion et Williamson 2003**).

Les facteurs de virulence d'UPEC sont de deux types, ceux produits sur la surface de la cellule ; favorisant l'adhérence, l'invasion des cellules hôte et les tissus du tractus urinaire, et ceux dans la cellule et exporter aux sites d'action (**Em dy et al., 2003 ; Wiles et al., 2008**).

Dans le premier type on rencontre les adhésines de type fimbriales tel que le fimbriae type 1 qui reconnaît les résidus D-mannose qui tapissent les cellules vaginales, les cellules périnéales et les cellules vésicales, et les fimbriae P et S qui identifient le digalactoside présent sur les érythrocytes du groupe sanguin et la surface des cellules épithéliales urinaires (Em dy et al., 2003 ; Mainil, 2003).

D'autres facteurs de virulence situés sur la surface bactérienne incluent les molécules endotoxines de LPS et le matériel capsulaire, ce dernier fournit la protection contre la phagocytose phagocytaire et l'effet bactéricide de la cellule hôte (Em dy et al., 2003).

Le second type est une série d'expression d'exotoxines comme la α -hémolysine et facteur cytotoxique nécrosant 1 (CNF1) (Doye 2004 ; Wiles et al., 2008), ces derniers fournissent à UPEC les moyens d'infliger des lésions de tissu infecté, facilitant la diffusion bactérienne aussi bien que libérer des éléments nutritifs des cellules hôtes et de désactiver les cellules immunitaires (Wiles et al., 2008).

Escherichia coli type séquence ST131 (O25: H4), associé à la CTX-M-15 à spectre étendu β -lactamase, a émergé internationalement comme un pathogène virulente multirésistante, cette *E. coli* extra-intestinale, responsable d'infections urinaires pourrait bien créer un «tsunami d'infections». En effet, trois infections urinaires sur quatre sont en effet liées à cette redoutable souche. (Yumuk et al., 2008).

4.1.1.2. *Proteus sp*

Ce genre est une cause fréquente d'infection urinaire, du fait qu'elle produit différents fimbriae dont le plus retrouvé est *ATF fimbriae* (ambient température fimbriae), il est appelé ainsi car est exprimé à 23°C. Son implication dans les infections urinaires reste inconnue, une étude a démontré seulement qu'il est à l'origine d'infection du bas appareil urinaire (Zunino et al., 2000 ; Raffi et al., 2009). *Proteus mirabilis*, possède aussi un système d'adhésines mannose résistantes qui est surtout observée pour les souches isolées de pyélonéphrites (Riegel, 2003).

4.1.1.3. Autres *Enterobacteriaceae* impliquées dans les infections urinaires

Les infections urinaires peuvent-être aussi causées par d'autres pathogènes, telles que : *Klebsiella sp*, *enterobacter sp* et ça par expression de différents fimbriae, dont les plus communs sont : type 1 fimbriae, type 3 fimbriae et aérobactine. Pour *K.pneumoniae*, la

présence d'une capsule, d'aérobactine (chez certaines souches), de type 1 *fimbriae*, type 3 *fimbriae* et de mucus peuvent être parmi les facteurs de pathogénéicité, par contre chez les souches non capsulées ces facteurs sont plutôt la présence de type 1 *fimbriae*, type 3 *fimbriae*, type 1,3 *fimbriae* ou un autre type de *fimbriae P-like-fimbriae* qui confèrent cette pathogénéicité à ces souches (**Przondo-Mordarska et al., 1996**). Pour le genre *Enterobacter*, certains espèces possèdent les propriétés d'adhésion de type 1 (10% d'*enterobacter aerogenes*) et d'autres possèdent le type 3 *fimbriae* (14% d'*E. cloacae*). L'aérobactine est présente seulement chez 7% des espèces d'*E.aerogenes* (**Riegel, 2003**).

IV.1.2. *Staphylococcus aureus*:

Est une coccobactérie Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*. Il a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5 μm , est immobile, asporulé et facultativement anaérobique (**Becker et al., 2004 ; Murray et al., 2003**) est présent à plusieurs endroits chez les humains : nez, aine, aisselles, région périnéale (hommes), muqueuses, bouche, glandes mammaires, cheveux, tractus intestinal, appareil génito- urinaire et voies respiratoires supérieures (**Murray et al., 2003**).

La colonisation de l'hôte est un préalable important avant la diffusion des souches de staphylocoques dans l'organisme, Le pouvoir pathogène de *S.aureus* est lié à l'expression de facteurs de virulence. Il a été décrit des protéines de surfaces (adhésines : protéine A, protéine de liaison au collagène, à la fibronectine, au fibrinogène/clumping factor) qui permettent la colonisation de l'hôte, des facteurs qui conduisent au développement et à l'extension de l'infection (coagulase, hémolysine, protéase, élastase, hyaluronidase, staphylokinase) (**Gillet et al., 2002**).

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie N°1 (Bloc 9) de l'Université Abderrahmane Mira sous la direction de Docteur Faradji-Hamma dans une période allant de 31 janvier à 7 avril 2016 dans le but d'étudier l'activité antibactérienne de quelques souches des bactéries lactiques isolées du l'ben traditionnel à l'égard des souches pathogène hospitalières responsables des infections urinaires.

I.1. Les souches utilisées

I.1.1. Les souches tests

58 souches de bactéries lactiques isolées au niveau de Laboratoire de Microbiologie du Lait et des Probiotiques à partir du l'ben traditionnel par le Docteur Faradji-Hamma ont été utilisées dans cette étude. Les 58 souches testées appartiennent aux genres : *Lactobacillus* (28 souches), *Leuconostoc* (13 souches), *Lactococcus* (6 souches), *Streptococcus* (une souche) et *Pediococcus* (12 souches).

Le milieu de culture utilisé est MRS (bouillon et gélose) (**Annexe III**), la température de croissance et l'origine de ces souches sont données dans le tableau II (**Annexe II**).

I.1.2. Les souches cibles :

Les deux souches pathogènes utilisées pour la première étape de cette étude qui est la sélection de souches lactiques les plus performantes (activité antibactérienne) sont 2 souches référencées :

- ✓ *Staphylococcus* résistante à la méthicilline ;
- ✓ *Escherichia coli* AT CC 25922 ;

Pour la deuxième étape qui est l'étude de l'activité antibactérienne des souches lactiques sélectionnées vis-à-vis des souches responsables des infections urinaires. En effet, 30 souches pathogènes hospitalières responsables des infections urinaires sont utilisées, elles font partie de la collection des souches bactériennes du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (L.M.A) de l'université Abderrahmane Mira de Béjaia ; elles sont représentées dans le **tableau III**

Tableau III: Les souches pathogènes responsables des infections urinaires utilisées

Bactéries	Code
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11616 BK
	31 BB
	790 BK
	11724
	6587 TT
	3458 TT
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (CTX-M-15; résistante à la β - lactamine)	12 71
	68 71
	6060 TT
	51 60
<i>Enterobacter cloacae</i>	15 47 TT
	4279 TT
	73 22 BK
	214 BK
	1417 TT
	1242 TT
<i>Enterobacter cloacae</i> (CTX-M-15; résistante à la β - lactamine)	51 68 TT
	93 15
	69 56
	65 58
<i>Proteus sp</i>	146 BB
	11272 BK
<i>Escherichia coli</i>	157 BB
	6862 TT
	87 39 TT
<i>Escherichia coli</i> (CTX-M-15; résistante à la β - lactamine)	99 61 TT
	55 37 TT
	35 51 TT
	8313 TT
	33 67

I.2. Revivification des souches utilisées

I.2.1. Les souches tests

Les souches lactiques étaient conservées sur bouillon MRS (ouM17) à -20 °C. Leur revivification consiste à transférer 1 ml des cultures décongelées de souches lactiques dans des tubes de 5 ml du bouillon MRS. Ces bouillons sont incubés à 37°C ou à 30°C (selon la température de croissance de la souche lactique) dans une durée qui s'étend entre 24h et 48 h.

Cette opération est répétée au minimum deux fois, afin d'avoir des cultures fraîches.

I.2.2. Les souches cibles

Les souches hospitalières pathogènes étaient conservées sur gélose inclinée nutritive à 4°C. Leur revivification consiste à transférer une colonie bien distincte de chaque une de ces souches dans 5 ml du bouillon nutritif. Ces bouillons sont incubés à 37°C/24 h.

Cette opération est répétée au minimum deux fois, afin d'avoir des cultures fraîches.

I.3. Vérification de la pureté des souches utilisées

Avant toute utilisation des souches, une vérification de leurs puretés est indispensable. Après le repiquage, la pureté est vérifiée en réalisant quelques tests rapides et simples (**Figure 3**)

- Observation de l'aspect des colonies après isolement sur gélose MRS pour les souches lactiques à 37°C ou à 30°C (selon la souche) pendant 48 h et sur gélose nutritive pour les souches pathogènes à 37°C pendant 24h ;
- Réalisation de la coloration de Gram ;
- Réalisation du test de catalase ; une goutte d'eau oxygénée à 10V était déposée sur une colonie développée pendant 24h à 48h sur le milieu gélosé, le résultat est immédiat et se caractérise par un dégagement gazeux (O₂) si la catalase est présente (**Devoyod et Muller, 1969**).

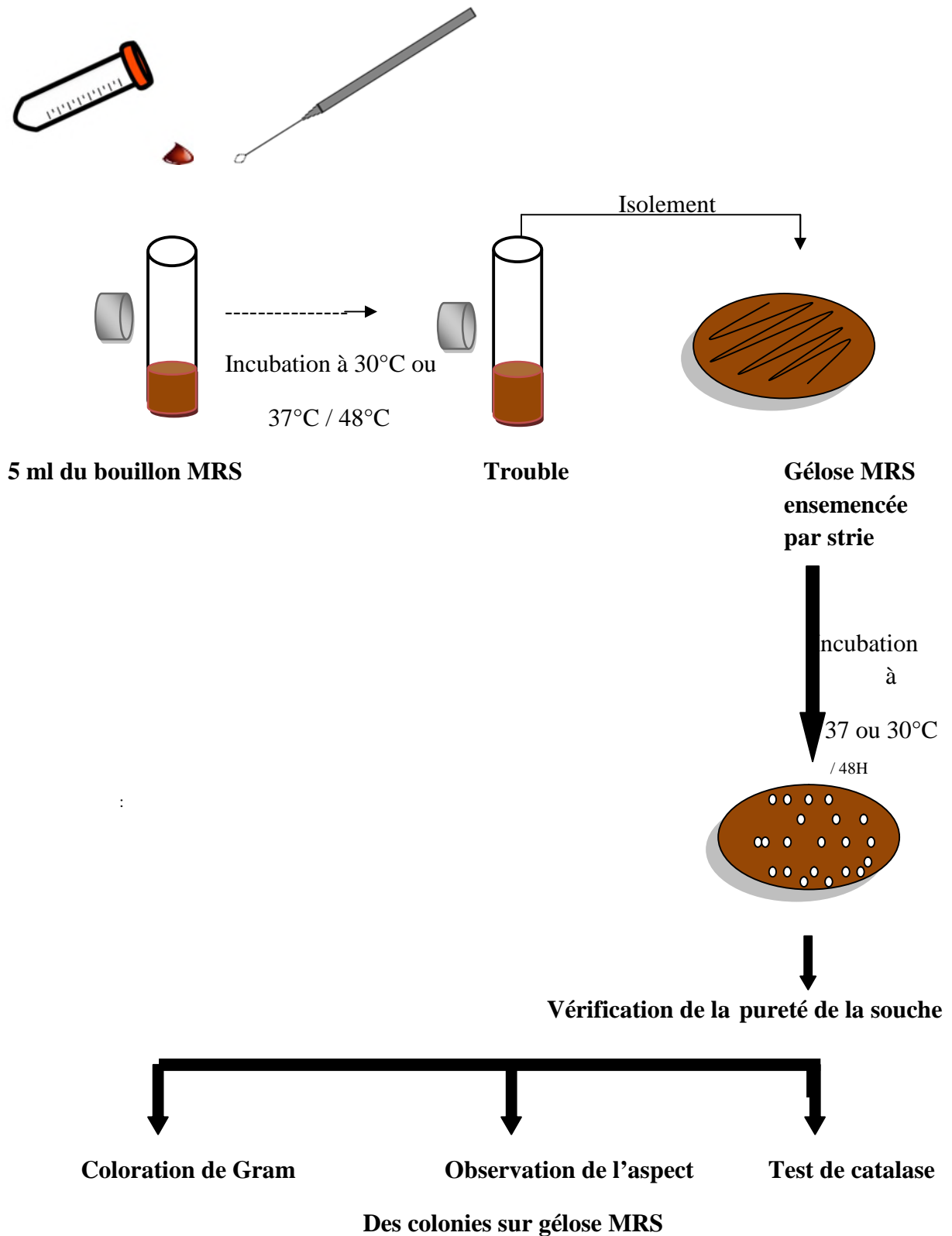


Figure 3: Protocole de la revivification et vérification de la pureté des souches lactiques.

- **NB :** Pour la vérification de la pureté du pathogène, le protocole est le même que celui des souches lactiques juste : Milieu de culture = bouillon et gélose nutritive

Température d'incubation = 37°C.

Une fois la souche revivifiée, purifiée on procède à la standardisation des *inocula*

I.4. Standardisation des inocula

Du fait que l'activité de tout agent antimicrobien est dépendante de la densité de la suspension cellulaire de la souche cible, une standardisation des *inocula* des souches est indispensable.

Après la revivification des souches, un isolement des souches lactiques sur gélose MRS et des souches cibles sur gélose nutritive est effectué. Après incubation à 37°C ou à 30°C des souches lactiques durant 48 heures, 6 ou 8 colonies identiques et bien isolées (selon ta taille des colonies) sont repiquées dans 9 ml du bouillon MRS et incubées à 37°C ou à 30°C (selon la souche lactique) pendant 18 heures. La même procédure est répétée avec les souches cibles en repiquant une colonie de chaque souche dans 9 ml du bouillon nutritif. Après la réalisation d'une série de dilutions décimales pour les souches lactiques et les souches cibles allant jusqu'à 10^{-9} , des dénombrements sont effectués sur les géloses MRS et gélose nutritive après incubation à 37°C ou 30°C pendant 48 heures et à 37°C pendant 24 heures respectivement. **(Figure 4)**

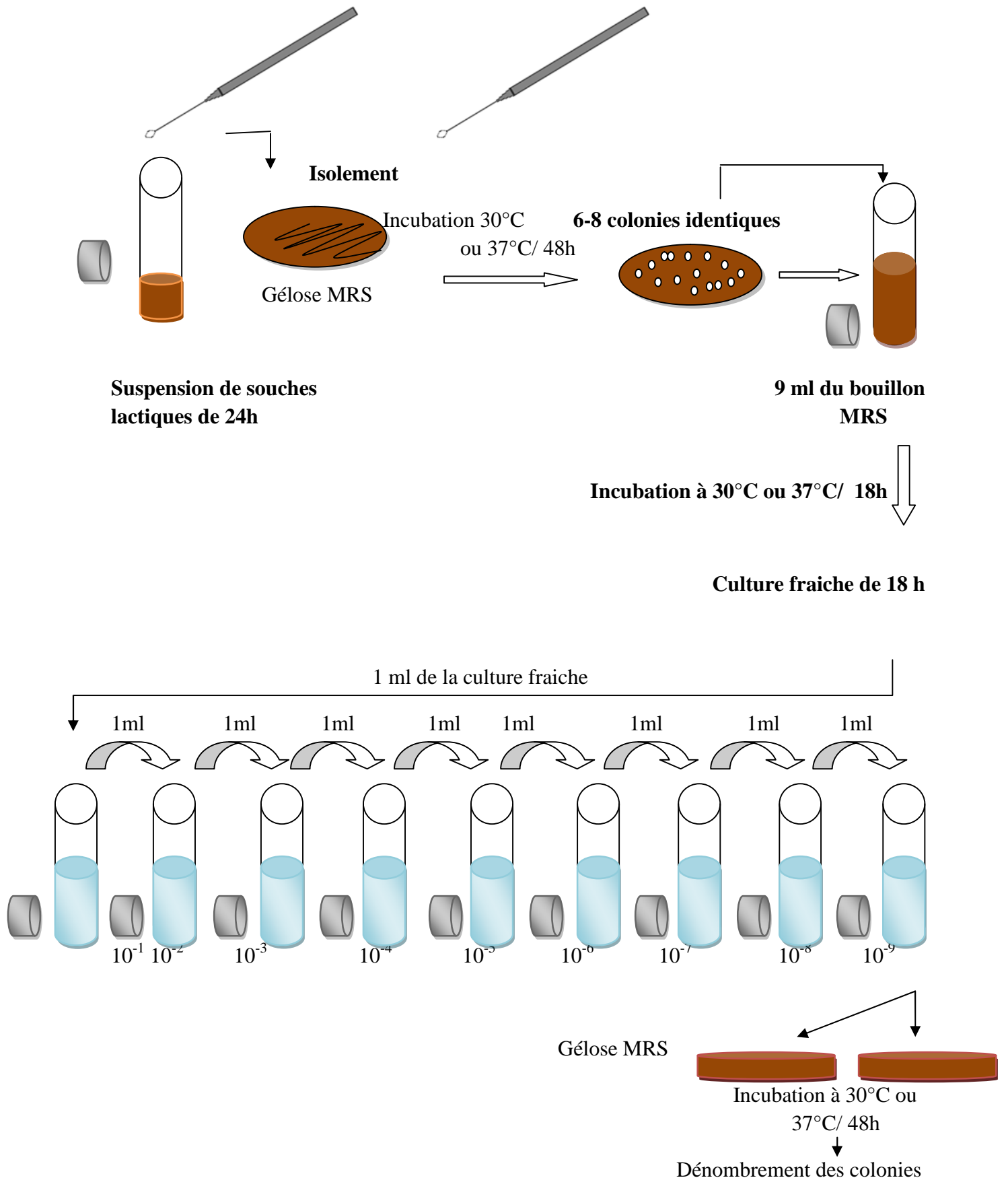


Figure 4:Protocole de standardisation des *inocula* lactiques.

I.5. Recherche de l'activité antibactérienne des souches lactiques

Avant de tester le pouvoir antibactérien des souches lactiques à l'égard des souches pathogènes responsables des infections urinaires, une sélection des souches lactiques a été effectuée dans le but d'avoir des souches plus performantes.

Cette sélection a été faite par la recherche de l'activité antibactérien des 58 souches lactiques à l'égard de deux souches pathogènes référenciées; *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline et *Escherichia coli* ATCC 25922 par le test des spots.

I.5.1. Test des spots

Selon **Fleming et al. (1975)**, ce test consiste à cultiver les deux souches dans le même milieu en double couche.

Après avoir rempli les boîtes de Pétri avec la gélose MRS (solidifiée et séchée), 5µl d'une concentration de (10^8 UFC/ml) de la culture bactérienne de chaque souche lactique obtenue après 18 heures d'incubation à des températures de croissance de chaque bactérie (37°C ou 30°C) est déposée en spots. Les boîtes sont séchées près du bec benzün pendant quelques minutes puis incubées à 37°C ou à 30°C pendant 18 heures.

Au terme de l'incubation, les spots sont recouverts par une couche de 9 ml de gélose semi-molle de Muller-Hinton (**Annexe III**) qui contient 1 ml (approximativement 10^6 UFC/ml) de la suspension de bactérie cible (obtenue après 18 h d'incubation à 37°C) puis incubés pendant 18heures. Les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés.(**Figure 5**)

La même procédure (test des spots) est répétée avec les 30 souches lactiques sélectionnées ayant une forte activité antimicrobienne à l'égard de 30 souches hospitalières responsables des infections urinaires.

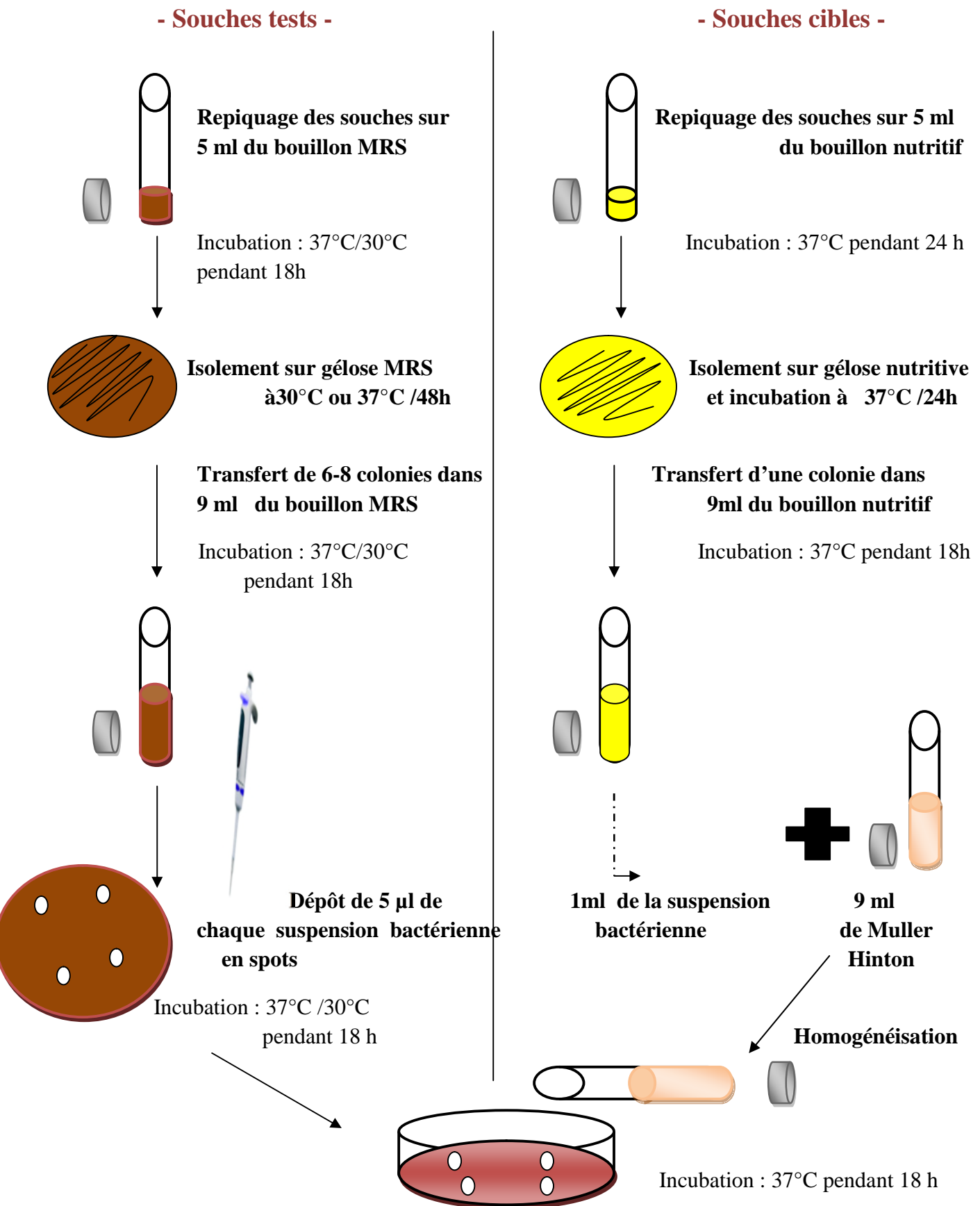


Figure 5: Schéma de réalisation du test des spots (Fleming et al., 1975)

I.5.2. Test des puits

Afin de déterminer l'origine de l'activité antibactérienne des 30 souches des bactéries lactiques sélectionnées, un test des puits est réalisé.

Ce test permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique productrice de substances antimicrobiennes avec la souche test. Les souches précédemment sélectionnées pour leur production de substances antimicrobiennes sont concernées par ce test.

Dans ce test 10 ml de gélose Mueller Hinton (MH) inoculée avec 1 ml d'une culture d'*Escherichia coli* (approximativement 10^6 cellules/ml) sont coulés à la surface d'une gélose nutritive préalablement coulée dans la boîte de pétri et solidifiée.

Des puits de 6 mm de diamètre et de 4 mm de profondeur sont creusés à l'aide d'un cône de micropipette dans la gélose et scellés du fond avec une goutte de gélose Mueller Hinton. 100 μ l du surnageant obtenu après la centrifugation de la culture fraîche (**Figure 6, Annexe II**) sont introduites dans chaque puit. Le surnageant est testé soit à pH natif ou après ajustement de son pH à 7 par le soude (NaOH stérile) 1N afin d'éliminer l'effet de l'acide lactique. Avant incubation à 37°C pendant 18 h, les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 heures afin de permettre la diffusion du surnageant de culture dans la gélose.

I.5.3. Traitement avec les protéases

Les surnageants des cultures de 18h des souches lactiques incubées à 30°C ou 37°C sont utilisées pour la détermination de la nature protéique par la sensibilité des substances antibactériennes produites aux protéases.

Pour s'assurer de la nature protéique des substances inhibitrices, on utilise des enzymes protéolytiques : La pepsine. Cette enzyme est dissoute dans la solution Tampon phosphate pH 7 (Phosphate mono potassique (1/16M), phosphate dissodique (16M) (**Tableau IV, Annexe II**). La solution enzymatique (2mg Pepsine + 1ml du tampon phosphate) est filtrée (0,22 μ m pore-size acrodise Syringe-filters, PallGermanLaboratory, USA) ;

Ensuite, un volume de 2 ml de la solution enzymatique est additionnée stérilement à 2 ml du surnageant neutralisé.

La solution (Surnageant neutralisé / pepsine) est incubée pendant 2h à 37°C. Au terme de l'incubation, les échantillons sont testés pour leur activité antibactérienne vis-à-vis de chaque souche cible par la méthode des puits (**Figure 7**).

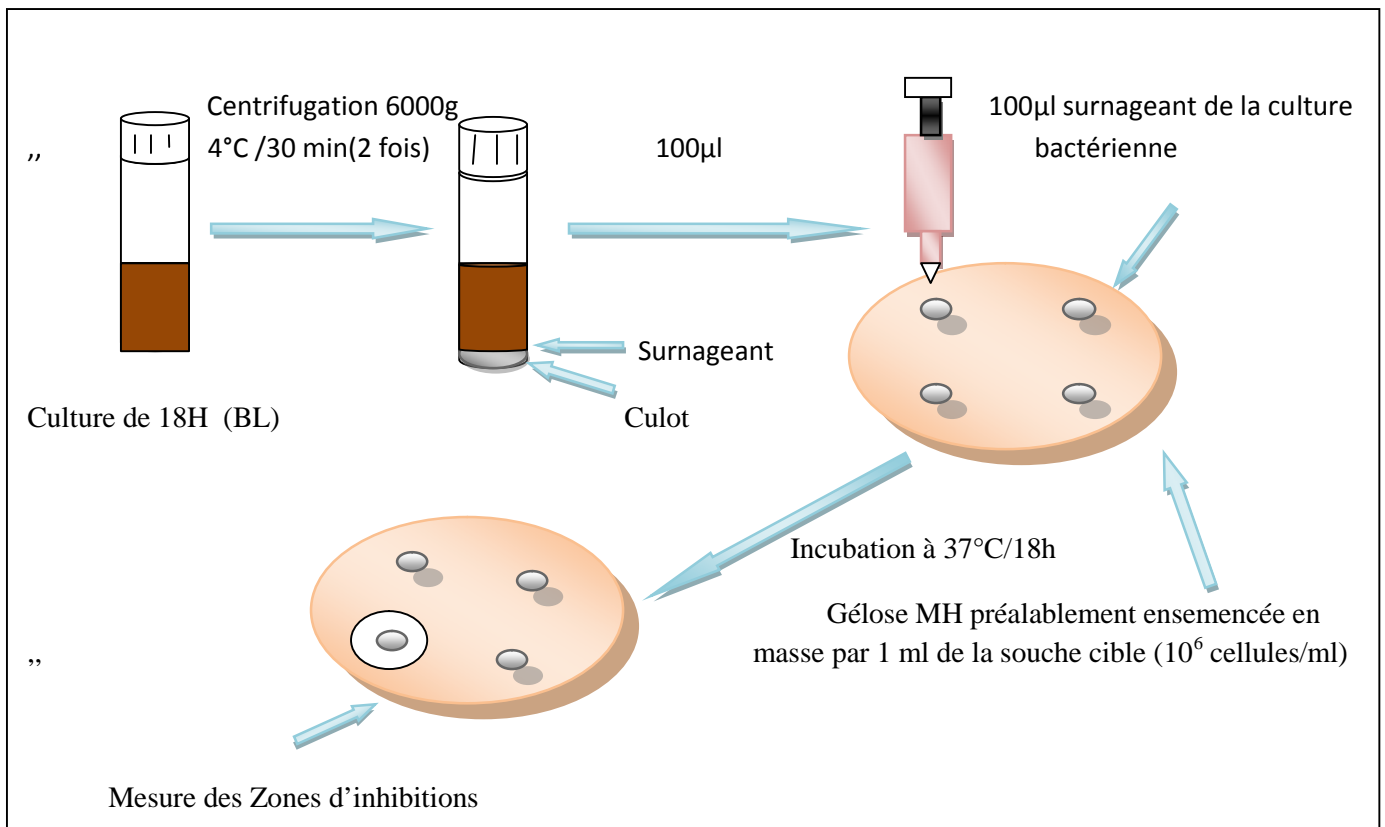


Figure 7: Schéma représentatif du test des puits

I.6. La détermination de la sensibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques :

Pour chaque souche testée (Les 30 souches sélectionnées), 6 colonies de morphologie typiques ont été sélectionnées et repiquées sur bouillon MRS, et incubées pendant 18 heures. Les souches sont étalées sur milieu MRS à l'aide d'un écouvillon, et 5 antibiotiques (**Tableau V : AnnexeII**) été testés qui sont : Pénicilline G (PG), Imipenème (IMP), Ofloxacine (OFX), Vancomycine (VA), Céfalexine (CN). Gélose avec disques d'antibiotiques ont été ensuite incubées pendant 18 h, les diamètres d'inhibition sont ensuite mesurés.

II.1. Revivification des souches utilisées

Les résultats obtenus de la revivification des 58 souches lactiques et 32 souches cibles utilisées ont présenté l'apparition de trouble au fond du tube avec une zone transparente à la surface du milieu liquide.

II.2. Vérification de la pureté des souches utilisées




II.2.1. Observation macroscopique

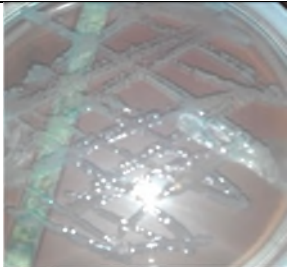
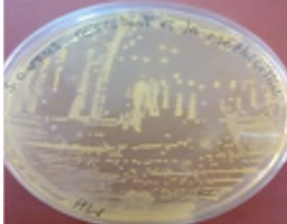
- Pour les souches lactiques, l'examen macroscopique sur gélose MRS montre des colonies circulaires bombées et de couleur blanche – crémeuse.

En anaérobiose après 18 d'incubation à 37°C et à 30°C sur gélose MRS les souches apparaissent sous forme de colonies blanches, lisses et rondes avec un diamètre de 2-3mm (Tabasco et al., 2007). Les cultures obtenues sur les boîtes de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies (Badis et al., 2006).

Pour les souches cibles, les résultats sont représentés dans le **tableau VI** suivant :

Tableau VI : Résultats d'observations macroscopiques des souches cibles.

Souche pathogène	Milieu de la culture	Observation macroscopique	Forme des colonies
<i>Escherichia coli</i>	Gélose nutritive		Colonies rondes, légèrement plates, d'aspect muqueux.
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	Gélose nutritive		Colonies rondes, volumineuses, bombées et brillantes d'aspect muqueux
<i>Enterobactercloacae</i>	Gélose nutritive		Colonies rondes et légèrement irrégulières, ou plates à bords irréguliers d'aspect assez gras.

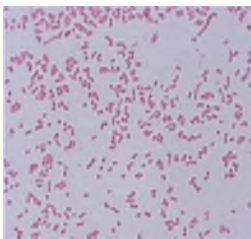
<i>Proteus sp</i>	Gélose nutritive		Colonies rondes peu bombées, d'aspect muqueux.
<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méthicilline	Gélose nutritive		Petites colonies de couleur jaune moutarde, légèrement bombées.

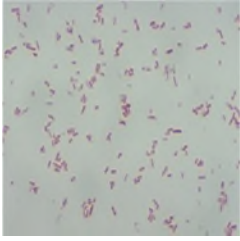

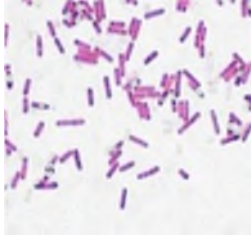
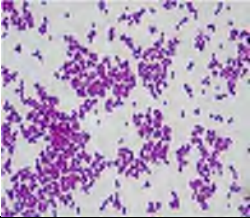
II.2.1. Observation microscopique

Pour les souches tests, L'aspect microscopique après coloration de Gram a révélé deux formes de cellules : Coques et Bâtonnets. Les coques de forme ovoïdes ou rondes sont disposées en paires (diplocoques) ou en chainettes (courtes ou longues). Pour les bâtonnets nous avons soit la forme bacille (moyennes ou longues) ou bien coccobacille. (**tableau VII, Annexe II**)

- Pour les souches cibles, l'observation microscopique est représentée dans le **tableau VIII** suivant :

Tableau VIII : Résultats d'observation microscopique des souches cibles

Résultats Souches cibles	Observation microscopique	Gram	Aspect microscopique
<i>Escherichia coli</i>		Négatif	Bacille , seules ou Diplocoques

<i>Klebsiellapneumoniae</i>		Négatif	Petit gros bacille, seules ou diplocoque
<i>Proteus sp</i>		Négatif	Bacille, seules ou en chaînette courtes
<i>Enterobactercloacae</i>		Négatif	Longues bacilles Seules ou Diplocoques
<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méthicilline		Positif	Coque en amas (grappes de raisin)

Ces résultats microscopique confirme que nos souches cibles appartiennent au Entérobactéries (Ben Abdallah et al., 2008) et au *Staphylococcus aureus* (Becker et al., 2004).

II.2.3. Test de Catalase :

- Le test de catalase n'a montré aucune effervescence, ce qui indique que ces souches appartiennent aux bactéries lactiques (**Figure 8**). En effet, ce résultat confirme que ces souches appartiennent aux bactéries lactiques (**Gevers, 2002**)
- Pour les souches cibles, les bulles de gaz observées sont issues de la dégradation de H_2O_2 et du dégagement de l'oxygène, ce indique qu'elles sont catalase positive. (**Figure 8**). En effet, ce résultat confirme que ces pathogènes appartiennent aux entérobactéries qui possèdent une catalase (**Joly et Reynaud, 2006**) et au *Staphylococcus aureus* (**Becker et al., 2004**)


Test	Souches tests	Souches cibles
	Négative	Positive
Catalase		

Figure 8 : Résultats du test de catalase réalisé sur les bactéries lactiques et les souches cibles.

II. 3. Standardisation des inocula

Les résultats de dénombrements des genres *Lactobacilles*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* isolés du l'ben et les souches cibles sont rassemblés dans le **tableau IX et X** respectivement. (**Annexe II**)

Les résultats de la standardisation des souches montrent qu'à partir de 6 colonies de chaque souche lactique utilisée, incubées à 30°C ou à 37°C/18h, donne un *inoculum* de 10^9 UFC /ml. En revanche, une colonie de SARM donne un *inoculum* de $2,5 \cdot 10^8$ UFC/ml, une colonie d'*E.coli* et de *Klebsiella pneumoniae* et de *Proteus sp* donnent des *inocula* de 10^9 UFC/ml, et une colonie d'*Enterobacter cloacae* donne un *inoculum* de 10^{10} .

Selon les travaux réalisés par (**Oudghiri, 2010**) sur la biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés (l'ben et Jben d'origine marocaine), le nombre de colonies dans les échantillons du l'ben ne dépasse pas 10^9 UFC/ml, donc cela coïncide avec nos résultats.

II.4. Etude de l'activité antibactérienne

II.4.1. Test de spots :

Un test de spots a été réalisé pour 58 isolats dans le but de sélectionner les souches qui ont une grande activité antibactérienne.

Les souches isolées ont été sélectionnées selon leurs activités antibactériennes à l'égard de *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline et *E.coli* AT CC 25922. Les résultats obtenus montrent que seule une souche qui appartenant à *Leuconostoc sp* (Ln₁₀) n'a pas d'effet antibactérien. Cependant, 30 souches présentent des activités antibactériennes très importantes d'un diamètre d'inhibition qui varie entre 20 et 40mm pour SARM, et entre 12 et 27mm pour *E.coli*. (Figure 9 et 10) et (Tableau XI, Annexe II). Ces dernières (30 souches) ont été sélectionnées afin d'étudier leur activité inhibitrice vis-à-vis de 30 souches pathogènes responsables des infections urinaires.

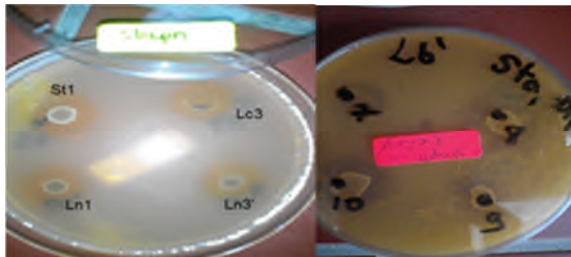


Figure 9: Résultats de test d'antagonisme vis-à-vis *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline



Figure 10: Résultats de test d'antagonisme vis-à-vis *E.coli* AT CC 25922

Parmi les 58 souches lactiques testées pour l'activité antagoniste, seules trente souches ont un pouvoir antibactérien très important d'une zone d'inhibition qui varie entre 12mm et 40mm à l'égard des SARM et *E.coli*. Les figures 11 et 12 illustrent les différents diamètres des zones d'inhibitions des souches lactiques à l'égard de SARM et *E.coli*.

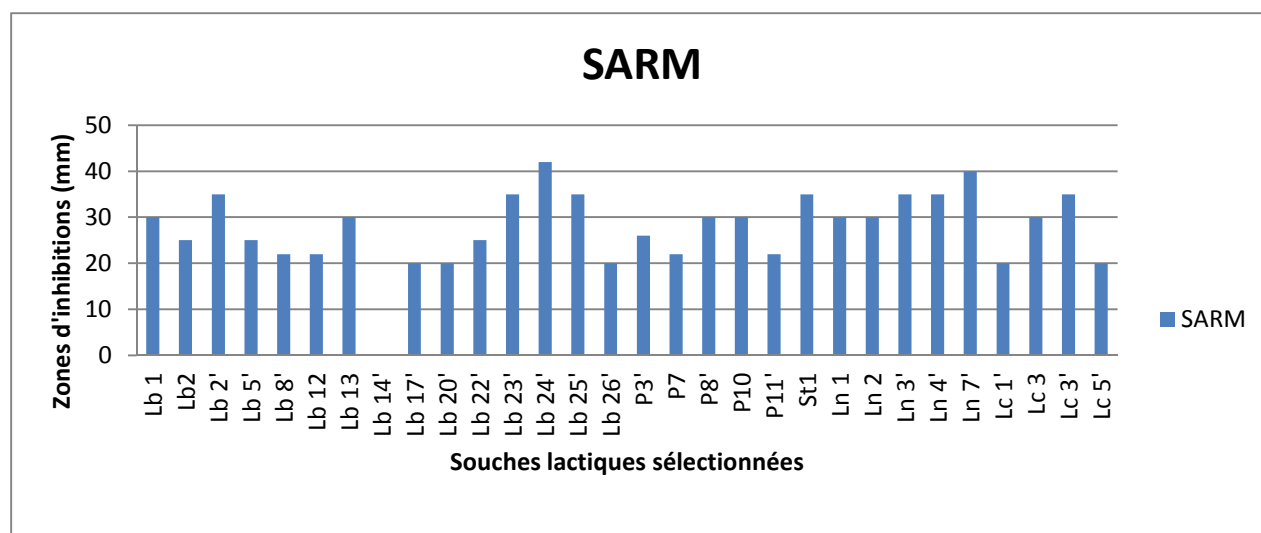


Figure 11 : Diamètres des zones d'inhibition des 30 souches lactiques sélectionnées à l'égard de *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline.

D'après ces résultats enregistrés, les interactions ont montré que les souches isolées possèdent un effet inhibiteur vis-à-vis SARM. En effet, la souche Lb₂₄' et Ln₇' présentent une grande activité inhibitrice maximale vis-à-vis SARM, d'un diamètre de 42mm et 40mm respectivement et un minimal de 20mm pour les souches Lb₁₇', Lb₂₀', Lb₂₆', Lc₁' et Lc₅'. Les souches de Lb₂', Lb₂₃', Lb₂₅' et St₁ présentent une activité inhibitrice importante d'un diamètre de 35mm et 30mm pour les souches Lb₁, Lb₁₃, P₈', P₁₀, Ln₁, Ln₂, et Lc₃.

Dal Bello. (2009) a rapporté que les bactéries lactiques sont connues pour leurs substances anti-*Staphylococcus aureus* ; par production de plusieurs métabolites tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, et les bactériocines.

Selon les travaux de **Labioui et al.,(2005)** la zone d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis *Staphylococcus aureus* varie entre 23,3 et 32,5 mm ce qui coïncide avec nos résultats.

Strahinić et al.(2007), ont isolé des souches de *Lactococcus lactis* BGSM1 productrices d'une bactériocine active vis-à-vis des bactéries à Gram positif et à Gram négatif

(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa*)

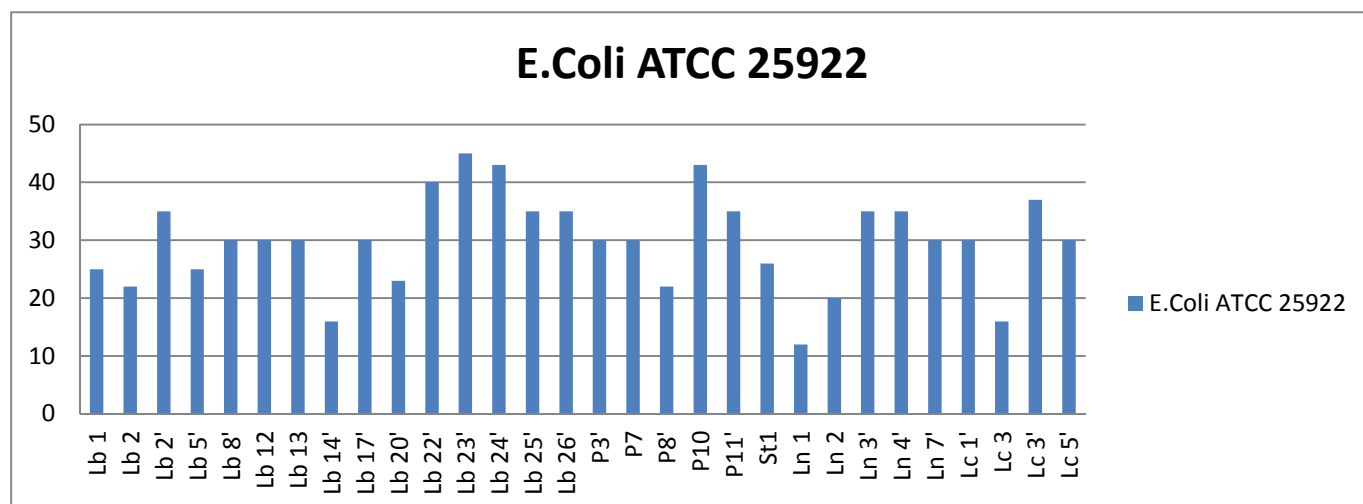


Figure 12: Diamètres des zones d'inhibition des 30 souches lactiques sélectionnées à l'égard d'*Escherichia coli* ATCC 25922

D'après ces résultats enregistrés (**Figure12**), les interactions ont montré que les souches isolées possèdent un effet inhibiteur à l'égard *E.coli*. En effet, La souche Lb_{23'}, Lb_{24'} et P₁₀ présentent une grande activité inhibitrice vis-à-vis *E.coli* ATCC 25922 d'un diamètre de 45mm, 43mm, 43mm respectivement. Cependant, des diamètres moins importants (12mm) sont notés pour Ln1.

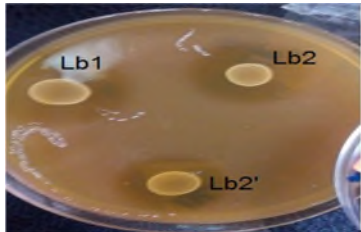
Les travaux de **Savado** *et al.*, (2004), ont reporté que les diamètres des zones d'inhibitions des bactéries lactiques isolées du lait fermenté sont de l'ordre de 9 à 10 mm vis-à-vis de *S. aureus* et de 8 à 9 mm vis-à-vis d'*E.coli*. Les résultats de ces travaux sont moins importants que les résultats obtenus dans notre étude.

En comparaison avec les travaux de **Benmammar et Hamsi** (2003), qui ont trouvé des zones d'inhibitions des souches de *Leuconostoc sp.* du lait cru de brebis vis-à-vis *S.aureus* de 6 à 10mm, et de 2 à 4 mm vis-à-vis *E. coli*. Cependant, nos souches de *Leuconostoc sp* présentent des zones d'inhibitions plus importantes de diamètre allant de 30 mm à 40mm vis-à-vis SARM et de 12mm à 35mm vis-à-vis *E.coli*.

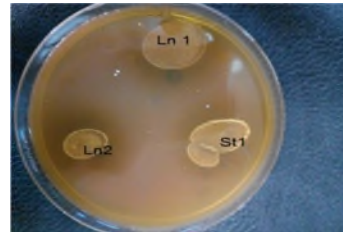
II.4.2. L'effet antibactérien des bactéries lactiques sélectionnées à l'égard des bactéries pathogènes responsables des infections urinaires :

Les résultats de l'activité inhibitrice des 30 souches lactiques du genre *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* sont résumés dans le **tableau XII et XIII** en **Annexe II** et la **figure 13**.

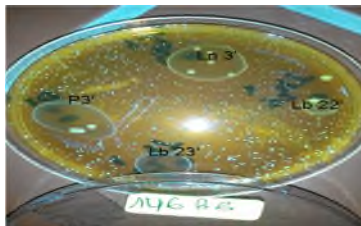
Les différentes souches lactiques sélectionnées présentent un spectre d'activité différent qui varie entre 0mm et 40mm vis-à-vis des bactéries pathogènes, Les zones d'inhibition sont claires avec des bordures bien distinctes. L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1mm (**Schillinger et Lucke, 1906**).



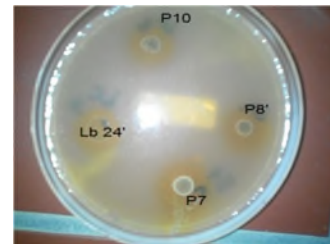
Exemple de résultats
d'antagonisme vis-à-vis
Enterobacter cloacae 7322BK



Exemple de résultats
d'antagonisme vis-à-vis
Proteus sp 11272 BK



Exemple de résultats
d'antagonisme vis-à-vis
Proteus sp 146 BB



Exemple de résultats d'antagonisme
vis-à-vis *Klebsiella*
pneumoniae 11722

Figure 13 : Exemples de résultats d'antagonisme vis-à-vis des souches pathogènes utilisées.

La capacité de compétition de bactéries lactiques résulte de leurs activités fermentaires associées à la production de divers composés antimicrobiens dans le but d'inhiber la prolifération des microorganismes. De nombreuses substances à activité antagoniste produites par les bactéries lactiques ont régulièrement été mises en évidence (**Rodrigues et al., 2002**).

II.4.2.1. Antagonisme des bactéries lactiques à l'égard de *Klebsiella pneumoniae*

Les 30 souches lactiques présentent une activité antibactérienne importante vis-à-vis *Klebsiella pneumoniae* 6871 et 5160 d'un diamètre qui varie entre 12mm et 34mm, et vis-à-vis *Klebsiella pneumoniae* 790BK d'un diamètre qui varie entre 10 et 40mm, et vis-à-vis *Klebsiella pneumoniae* 31BB d'un diamètre qui varie entre 24 et 40mm.

Nos résultats se rapprochent avec les travaux de **Labioui et al. (2005)**, qui ont trouvés des zones comprise entre 20,4 et 25,7 mm lorsqu'il a sélectionné des souches de bactéries lactiques antibactériennes à l'égard de *Klebsiella pneumoniae* prélevée des urines.

Néanmoins, les souches Lb₁₇' , Lb₂₂' et Lc₅' ne présentent aucune zone d'inhibition à l'égard de *Klebsiella pneumoniae* 3458TT, 1161BK, 11724, 6587TT. Et les souches Lb₂₆' et P₃' ne présente aussi aucune activité inhibitrice à l'égard de *Klebsiella pneumoniae* 3458TT et 1161BK.

Les souches Ln₇' et P₈' ne présentent aucune zone d'inhibition à l'égard de *Klebsiella pneumoniae* 3458TT, 1161BK, 1271. Et la souche Lb₂' ne présente aucune activité à l'égard de *Klebsiella pneumoniae* 3458TT, 1161BK, 6587TT et 6060TT.

II.4.2.2. Antagonisme des bactéries lactiques à l'égard de *Proteus sp*

Les souches lactiques présentent une activité inhibitrice à l'égard de *Proteus sp* 146BB d'un diamètre qui varie entre 16mm et 36mm à l'exception de 6 souches de *Lactobacillus sp* (Lb₂' , Lb₁₇' , Lb₂₂' , Lb₂₃' , Lb₂₄' , Lb₂₆'), deux souches de *Pediococcus sp* (P₃' , P₈'), une seule souche de *Leuconostoc sp* (Ln₃'), et enfin deux souches de *Lactococcus sp* (Lc₃' , Lc₅') qui ne présentent aucune activité inhibitrice vis-à-vis de cette dernière.

Cependant, 19 souches lactiques présentent une activité inhibitrice à l'égard du *Proteus sp* 11272BK d'un diamètre qui varie entre 10mm et 30mm, à l'exception de 2 souches de *Lactobacillus sp* (Lb₂₀' , Lb₂₆'), *Pediococcus* (P₈'), *Leuconostoc* (Ln₃'), et *Lactococcus sp* (Lc₅') qui ne présentent aucune zone d'inhibition.

II.4.2.3. Antagonisme des bactéries lactiques à l'égard d'*Enterobacter cloacae*

Les 30 souches lactiques testées présentent une activité antibactérienne d'un diamètre qui varie entre 14mm et 36mm à l'égard des 4 souches d'*Enterobacter cloacae* (5168TT, 9315, 6956 et 6558) , à l'exception de la souche Lb₂₂' du genre *lactobacillus* qui ne présente aucune zone d'inhibition à l'égard de cette souche pathogène.

Des diamètres avoisinant allant de 10 à 30mm sont obtenus à l'égard de 6 souches d'*Enterobacter cloacae* 1547TT, 4279TT, 7322BK, 214BK, 1417TT et 1242TT, à l'exception de :

- ✓ *Lactobacillus sp* Lb₂₀' à l'égard d'*Enterobacter cloacae* 1547TT, 1417TT

- ✓ *Pediococcus* P₁₁' à l'égard d'*Enterobacter cloacae* 4279TT, 7322BK
 - ✓ *Streptococcus* sp St₁ à l'égard d'*Enterobacter cloacae* 1242TT
 - ✓ *Leuconostoc* Ln₄' à l'égard d'*Enterobacter cloacae* 1547TT, 1417TT, 1242TT
- qui ne présentent aucun effet inhibiteur.

Il est noté que la sensibilité d'une souche dépend du genre, de l'espèce et même de la sous-espèce, Ces variations de sensibilité sont dues aux caractéristiques des souches (présence ou absence de sites récepteurs) et donc aux niveaux de lésions occasionnées par le facteur inhibiteur (Kalchayanand et al., 1992).

II.4.2.4. Antagonisme des bactéries lactiques à l'égard d'*Escherichia coli*

Les souches lactiques utilisées présentent presque une même activité antibactérienne à l'égard des 8 souches d'*Escherichia coli*. Un diamètre qui varie entre 17mm et 40,5mm est obtenu à l'exception de :

- ✓ La souche Lb₁₂ de *Lactobacillus* à l'égard d'*E.coli* 8739TT, 3367
- ✓ La souche Lb₂₀' de *Lactobacillus* à l'égard d'*E.coli* 9961TT
- ✓ La souche Lb₂₃' de *Lactobacillus* à l'égard d'*E.coli* 6862TT, 5537TT
- ✓ La souche P₃' de *Pediococcus* à l'égard d'*E.coli* 3367
- ✓ La souche P₈' de *Pediococcus* à l'égard d'*E.coli* 157 BB
- ✓ La souche St₁ de *Streptococcus* à l'égard d'*E.coli* 5537TT
- ✓ La souche Ln₁ de *Leuconostoc* à l'égard d'*E.coli* 8739 TT ,5537 TT
- ✓ La souche Ln₃' de *Leuconostoc* à l'égard d'*E.coli* 6862TT

Qui ne présentent aucune activité inhibitrice.

Selon les travaux de Labioui et al., (2005) la zone d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis ces microorganismes pathogènes varie entre 22,5 et 31,5 mm. Ces valeurs sont presque similaires aux valeurs obtenues dans notre étude.

A noter que l'effet des souches lactiques qui ne présentent aucune activité antibactérienne à l'égard des souches pathogènes utilisées (*E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*) dans le test des spot est dû soit à la concentration des substances, soit à la résistances de ces souches cibles à ces substances.

II.4.2. Test des puits :

L'effet antibactérien des surnageants des bactéries lactiques isolées est mis en évidence par l'apparition d'une zone d'inhibition (zone claire) autour du puit. La lecture de l'activité

inhibitrice se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour du puit (Zi), exprimée en mm (Allouche et al., 2010). La mesure du diamètre d'inhibition (Zi) est effectuée selon la formule suivante:

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

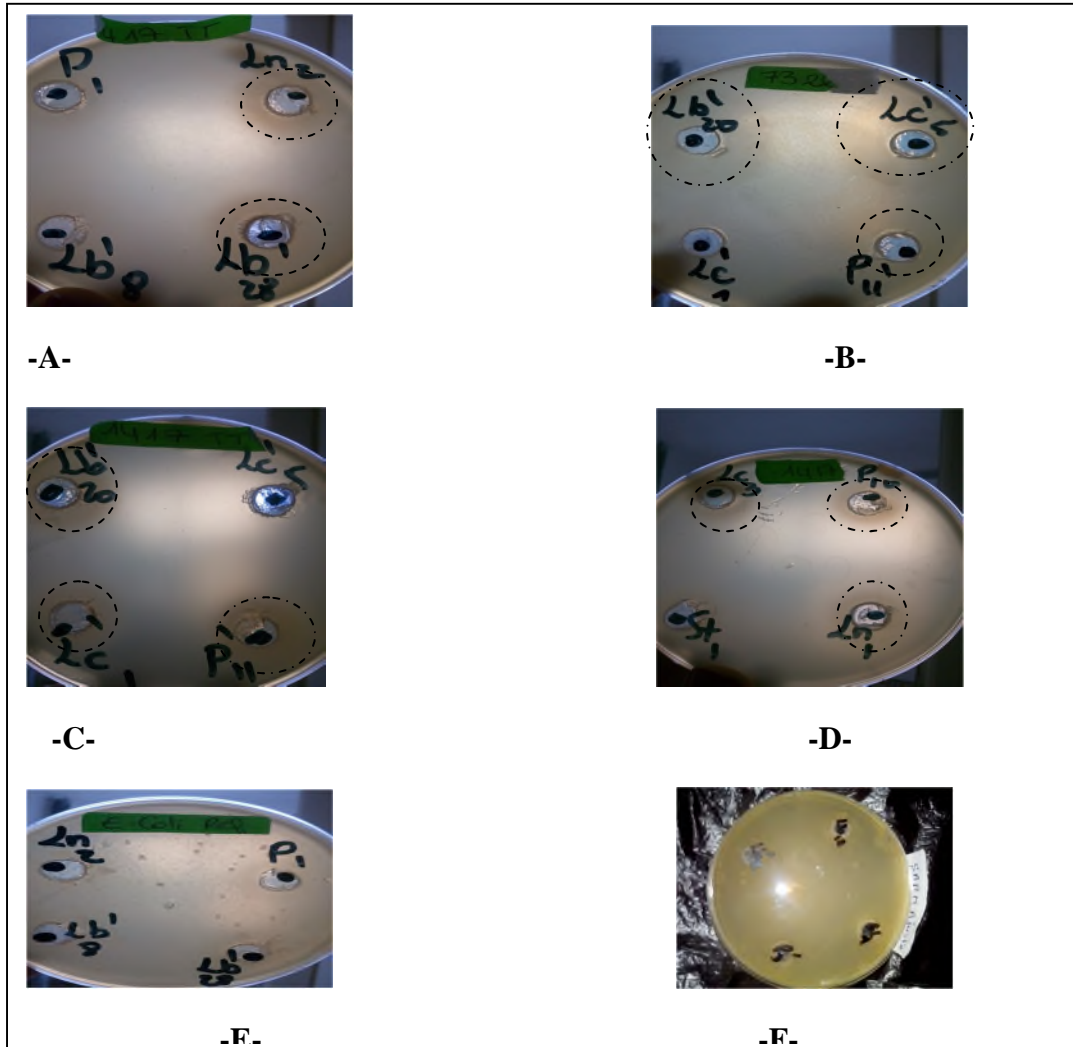


Figure 14 : Résultat du test des puits avec le surnageant natif. –A- : Antagonisme des Lb₂₈', Lb₈', Ln₂, P₁ à l'égard d'*Enterococcus cloacae*1417 TT. –B- : Antagonisme des Lb₂₀', Lc₁', Lc₅', P₁₁' à l'égard d'*Enterococcus cloacae*7322 BK. –C- : Antagonisme des Lb₂₀', Lc₁', Lc₅', P₁₁' à l'égard d'*Enterococcus cloacae*1417TT. –D- : Antagonisme des Lc₃, P₁₀, St₁, Ln₁ à l'égard d'*Enterococcus cloacae*1417TT. –E- : Antagonisme des Ln₂, P₁, Lb₈', Lb₂₈' à l'égard d'*Escherichia coli*. –F- : Antagonisme des Lb₁₂', P₁, Lb₈', Ln₁ à l'égard de SARM.

Les résultats enregistrés sont représentés dans le **tableau XIV en Annexe II**; d'après ces résultats d'inhibition on note que les surnageants natifs des :

- Souches *Lactobacillus sp* présentent une activité antibactérienne vis-à-vis *E.coli*, d'un diamètre d'inhibition qui varie entre 10 et 24mm. A l'exception de celui de la souche Lb₈' qui ne présente aucune activité antibactérienne à l'égard

de la d'*E.coli*. ainsi que des souches St₁ et Lc₁' qui ne présentent aucune activité antibactérienne à l'égard d'*E.coli*.

- Souches *Pediococcus sp* présentent une activité antibactérienne vis-à-vis *E.coli*, d'un diamètre d'inhibition qui varie entre 14 et 18 mm.
- Souches Lc₃, Lc₃', Lc₅' présentent une activité antibactérienne vis-à-vis *E.coli*, d'un diamètre de 18mm, 20mm, 24mm respectivement.

L'inhibition des souches d'*E.coli* par certaines souches du genre *Lactobacillus* a été déjà décrite par plusieurs travaux (**Todorov et al., 2004** et **Karthikyen et Santos, 2009**).

- A l'égard du SARM :

les souches *Lactobacillus sp* testées présentent une activité antibactérienne d'un diamètre qui varie entre 16 et 38mm donc ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par **Bazo en 2011** dans sa recherche des effets antibactériens des BL à l'égard du SARM lorsqu'il a testé des souches de *lactobacillus sp* à l'égard des SARM et il a obtenu des zones d'inhibition d'un diamètre qui varie entre 17mm et 29mm.

Un diamètre qui varie entre 14 et 30mm pour les souches *Pediococcus sp*. un diamètre qui varie entre 18mm et 32mm pour *Leuconostoc sp*. Par contre, Lb₁, Lb₅', Lb₁₃, Lb₁₄', Lb₁₇', Lb₂₂', Lb₂₅', Lb₂₆', Ln₄', Lc₃' ne présentent aucune activité antibactérienne, ce dernier résultat coïncide avec les résultats obtenus par **Bazo en 2011** lorsqu'il a testé une souche de *Lactococcus sp* à l'égard du SARM où il a obtenu aucune zone d'inhibition.

Ces résultats obtenus dans notre travail sont plus importants de ceux obtenus par **Belarabi en 2012** lorsqu'il a testé l'activité antibactérienne de *Lactobacillus* à l'égard de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* où il a obtenu un spectre d'activité important de diamètre de 10 mm. Néanmoins, aucune zone d'inhibition n'est obtenue avec les surnageants natifs de Lc₁', St₁, et Lb₈' et avec les surangeants natifs de Lb₁, Lb₅', Lb₁₃, Lb₁₄', Lb₁₇', Lb₂₂', Lb₂₅', Lb₂₆', Ln₄' et Lc₃' à l'égard d'*E.coli* et *Staphylococcus aureus* respectivement. Ces résultats sont incompatibles avec ceux obtenus par **Labaioui et al., (2005)** lorsqu'il a examiné le surnageant natif du *Streptococcus agalactae* isolée du jus de presse de la canne à sucre à l'égard d'*E.coli* et *Staphylococcus aureus* prélevée des urines, ces auteurs ont obtenu un résultat positif avec des zones d'inhibition de 31,5± 1,1 mm et 32,5±1,0 mm respectivement.

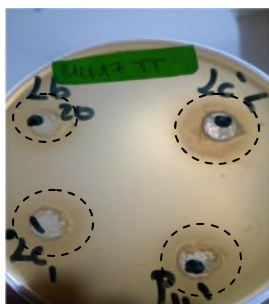
Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les souches utilisées qui n'ont aucune activité antibactérienne dans ce travail ne produisent pas ou peu d'H₂O₂ et que ce dernier a été éliminé par les souches cibles en utilisant leurs propre catalase, sachant qu'*E.coli* et

SARM sont catalase positive, et que l'acidité des surnageants n'a pas pu exercer un effet inhibiteur sur *E.coli* et SARM, cela peut s'expliquer par le fait que ces deux souches peuvent être résistantes à l'acidité produite par ces souches tests. La présence et la persistance d'*E.coli* et SARM dans le tractus urinaire laisse supposer que ces deux souches sont bien résistantes à l'acidité. Cela nous permet de supposer que l'activité antibactérienne de ces souches est due à des substances autre que le H₂O₂ et l'acidité, donc cela peut être dû aux bactériocines, qui n'ont peut être pas pu exprimer leur effet inhibiteur à cause du pH acide Ou par rapport à la concentration des substances antibactérienne produites.

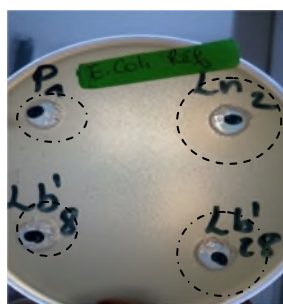
L'inhibition des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques peut avoir plusieurs origines parmi lesquelles, nous pouvons mentionner la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène, de bactériocines (Moreno et al., 1999; Navarro et al., 2000 ;Rodriguez et al., 2002 ; Maldonado et al., 2003; Guessas et al., 2005 ; Todorov et Dicks, 2005).

II.4.2.1.Effet des acides organiques

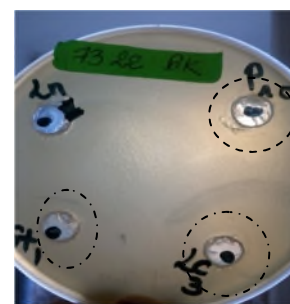
Pour vérifier la nature des substances antibactériennes produites par les 30 souches lactiques, un surnageant neutralisé de chaque souche utilisé doit être testé. A pH neutre certains bactériocines sont chargées positivement (Dortu et Thonart, 2009) ; Après avoir neutraliser le surnageant natif de chaque souche lactique utilisée, les résultats sont représentés dans le (tableau XIV, Annexe II)et la figure 15



-A-



-B-



-C-

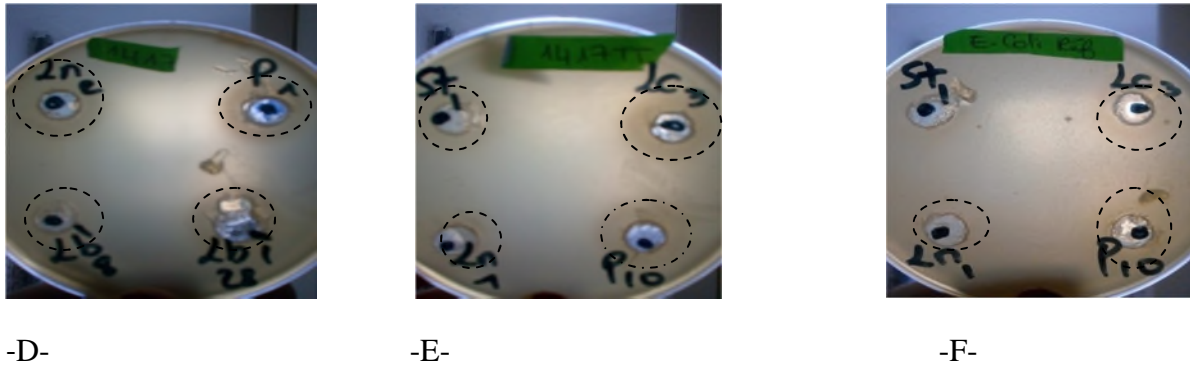


Figure 15 : Résultats du test des puits avec le surnageant neutralisé. –A- : Antagonisme des Lc₁' , Lc₅' , Lb₂₀, P₁₁' à l'égard d'*Enterococcus cloacae*1417TT. –B- : Antagonisme des P₁, Ln₂, Lb₈' et Lb₂₈' à l'égard d'*E.coli*. –C- : Antagonisme des P₁₀, Ln₁, St₁, Lc₃ à l'égard d'*Enterococcus cloacae*7322BK. - D- : Antagonisme des P₁, Ln₂, Lb₈' et Lb₂₈' à l'égard d'*Enterococcus cloacae*1417TT. - E - : Antagonisme des P₁₀, Ln₂, St₁, Lc₃ à l'égard d'*Enterococcus cloacae*1417TT. - F- : Antagonisme des P₁₀, Ln₂, St₁, Lc₃ à l'égard d'*E.coli*

- ✓ Les résultats de l'étude de l'effet des surnageants (natifs et neutralisés) à l'égard d'*E.coli* ont montré clairement que :
 - 8 souches de *Lactobacillus sp* (Lb₁, Lb₂, Lb₂' , Lb₁₄' , Lb₂₀' , Lb₂₂' , Lb₂₄' , Lb₂₆'), deux souches P₃' et P₇, la souche Ln₂, les deux souches Ln₃' , Ln₇' et Lc₃' inhibent la souche *E.coli* même après la neutralisation des surnageants. Néanmoins, une diminution des diamètres des zones d'inhibitions est notée par rapport aux surnageants natifs. ce qui témoigne de la présence d'autres substances inhibitrice autre que les acides organiques.
 - Les zones d'inhibitions obtenues par les surnageant natifs des souches Lb₅' , Lb₁₂, et Lb₂₅' de *Lactobacillus sp* et la souche Lc₃' de *Lactococcus sp* ont disparues après neutralisation, cela s'explique par le fait que les souches Lb₅' , Lb₁₂, Lb₂₅' , Lc₃' inhibent la souche *E.coli* uniquement par production des acides organiques. En effet, des résultats semblables ont été obtenus par **Aslim et al., (2005)**, lorsqu'ils ont examiné 19 surnageants de bactéries lactiques isolées à partir de produits laitiers Turcs, ou l'activité inhibitrice est perdue dans 15 d'entre eux après neutralisation.
 - Les surnageants natifs des souches Lb₈' , St₁, Lc₁' qui n'ont présenté aucune activité antibactérienne à l'égard de la souche *E.coli* , ont présenté des zones d'inhibitions de 14mm, 18mm et 18mm de diamètres respectivement après la neutralisation, ce résultat s'explique par le fait que les souches Lb₈' , St₁, Lc₁' inhibent la souche d'*E.coli* probablement par production des bactériocines qui n'ont pas pu exprimer leur effet inhibiteur à cause du pH acide et qui ont pu l'exprimer après neutralisation des

surnageants. D'après **Song et al., (1997)** l'élimination de l'effet des acides organiques favorise plutôt l'activité des substances antimicrobiennes telles que les bactériocines.

- Les souches Lb₁₃, Lb₂₃' , P₈' , P₁₀, P₁₁' , Ln₁, Ln₄' , Lc₃' inhibent la souche d'*E.coli* avec une même zone d'inhibition avec le surnageant natif et le surnageant neutralisé. Ce résultat nous mène à conclure que la production d'acide n'a aucun effet sur la souche d'*E.coli*.
- ✓ Les résultats de l'effet inhibiteur des surnageants (natifs et neutralisés) vis-à-vis SARM ont montré que :
 - Les souches Lb₂, Lb₂' , P₃' , P₇, P₁₀, St₁, Ln₁, Ln₂, Ln₃' , Ln₇' , Lc₁' , Lc₃, Lc₅' inhibent la souche SARM même en milieu neutralisé mais la zone d'inhibition obtenue par le surnageant natif est plus importante que celle obtenue par le neutralisé. Donc, cet effet inhibiteur n'est pas dû uniquement aux acides organiques mais à la présence d'autres substances.
 - Les zones d'inhibitions obtenues par les surnageants des souches Lb₂₀' , P₁₁' ont disparu après neutralisation, cela s'explique par le fait que les souches Lb₂₀' , P₁₁' inhibent la souche SARM uniquement par production des acides organiques.
 - Les surnageants natifs et neutralisés des souches Lb₂₃' , Lb₂₄' , P₈' présentent les mêmes diamètres des zones d'inhibitions de 28mm, 16mm et 14mm respectivement à l'égard de la souche SARM. Dans ce cas, la concentration d'acide organique produit n'a aucun effet sur la souche SARM.
 - Les surnageants natifs et neutralisés des souches Lb₁, Lb₅' , Lb₁₃, Lb₁₄' , Lb₁₇' , Lb₂₂' , Lb₂₅' , Lb₂₆' , Ln₄' et Lc₃' ne présentent aucune activité antibactérienne à l'égard du SARM.
- ✓ Les résultats de l'effet inhibiteur des surnageants (natifs et neutralisés) vis-à-vis les 2 souches d'*Enterobacter cloacae* ont montré une diminution des zones d'inhibition avec le surnageant neutralisé par rapport à celles obtenus par le surnageant natif. Donc cet effet inhibiteur est dû à d'autres substances autre que les acides organiques.

D'après **Ammor et al., (2006)**, l'activité antibactérienne de la bactériocine-like n'a pu être détectée dans le surnageant de culture de souches ayant présentées une activité antibactérienne avec le test des spots. Trois hypothèses ont pu être émises :

- La bactériocine-like est composée de deux domaines de N-terminal hydrophile et C-terminal hydrophobe et que ce dernier s'est absorbé sur le filtre ;

- La bactériocine-like s'est adhérent à la paroi bactérienne et que l'activité antibactérienne ne peut avoir lieu que lorsque il y'a contact directe entre les cellules ;
- L'incapacité apparente de manifester une activité inhibitrice dans les cultures liquides est déjà rapportée comme conséquences probable d'inactivation, de la protéine sous les conditions de croissance (constituants du milieu, pH)

D'après **Dortu et Thonar, (2009)**, cela est du à :

- Des faibles concentrations des bactériocines-like produites ;
- Dénaturation des bactériocines-like au cours de la centrifugation ;
- Ou bien l'activité antibactérienne déjà observée est due à la production des bactériocines-like, qui restent fixées sur la paroi bactérienne.

II.4.3.Traitement avec les protéases

Les bactériocines sont des peptides antibactériens qui présentent un spectre étroit envers des espèces pathogènes, elles sont inactivées par les protéases. Pour cela une enzyme protéolytique qui est la pepsine est testée pour savoir si ces souches (6 testées) produisent des bactériocines ou non.

La perte de l'activité antimicrobienne après traitement avec des enzymes indique la sensibilité des composés actifs sécrétés par les souches mises en culture vis-à-vis la pepsine. Puisque les bactériocines sont des substances protéines. Elles doivent être sensibles à au moins une enzyme. En conséquence, la sensibilité aux enzymes protéolytiques est le critère principal dans leur caractérisation (**Çon et Gökalp, 2000 ; El Shafei et al., 2000 et Cintas et al., 2001**).

L'effet de la pepsine utilisé est montré dans le tableau suivant et la **figure 16** :

Tableau XV : Résultats de l'effet inhibiteur des surnageants des 6 souches lactiques testées vis-à-vis des souches pathogènes après traitement avec la pepsine.

Souche Lactique	Zone d'inhibition en mm			
	SARM	<i>E.coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> 7322BK	<i>Enterobacter cloacae</i> 1417TT
Lb₂₃'	0	0	0	0
Lc₅'	0	0	0	0
Lc₃'	0	0	0	0
St₁	0	0	0	0
Ln₂	0	0	0	0
P₁₀	0	0	0	0

Les souches Lb₂₃' , Lc₅' , Lc₃' , St₁, Ln₂ et P₁₀ synthétisent probablement des substances de nature protéique sensible à l'action de la pepsine et qui agit fortement sur SARM, *E.coli* et *Enterobacter cloacae* 7322BK et 1417TT. Ce sont probablement des bactériocines.

Notre résultat montre clairement que les surnageants des souches Lc₅' et Lc₃' perdent leur activité inhibitrice contre SARM, *E.coli* et *Enterobacter cloacae* après traitement par la pepsine, ceci concorde avec les résultats de **Vinod Kumar et al.,(2006)** à savoir que la souche *Lactococcus lactis* isolée du radis possède une activité antibactérienne contre plusieurs espèces à Gram négative. Ces résultats permettent de suggérer que l'activité antagoniste de ces souches soit due à une substance de nature protéique ou peptidique.

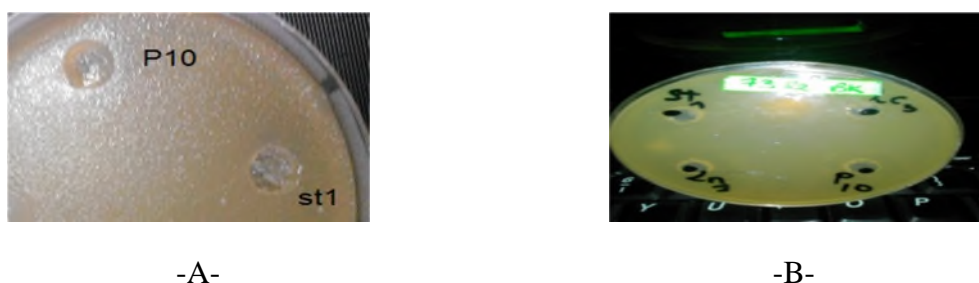


Figure 16 : Résultats d'effet inhibiteur : **-A-** :des surnageants des souches P₁₀ et St₁ après traitement avec la pepsine vis-à-vis SARM.

-B- :des surnageants des souches St₁, Lc₃' , Ln₂ après traitement avec la pepsine vis-à-vis *Enterobacter cloacae* 7322 BK .

I.5. La détermination de la sensibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques :

Les résultats de ce test sont présentés dans la **figure 21** et le **tableau XVI en Annexe II**. Le tableau montre les diamètres obtenus avec chaque antibiotique et chaque souche. Après l'application des recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie CASFEM 2012 , ce dernier donne la signification de chaque résultat, à savoir : R, bactérie résistante, S, bactérie sensible et I, bactérie intermédiaire. D'après les résultats du test,

- ✓ Les 30 souches lactiques utilisées résistent à la Vancomycine et la céfalexine.
- ✓ Les 8 souches Lb₁, Lb₂' , Lb₈' , Lb₁₇' , Lb₂₂' , Lb₂₃' , Lb₂₄' , Lb₂₅' de *Lactobacillus sp*, les 4 souches P₃' , P₈' , P₁₀, P₁₁' de *Pediococcus sp*, et les 3 souches Ln₁, Ln₄' , Ln₇' de

Leuconostoc sp., et les deux souches Lc₁' et Lc₃' sont sensibles à l'Imipinème sauf la souche St₁ qui résiste a cette antibiotique.

- ✓ Les deux souches Lb₈' et Ln₂ résistent à l'Ofloxacine.
- ✓ Les souches de *Lactobacillus sp* résistent tous à la Pénicilline G sauf Lb₁₄', ainsi que les souches de *Leuconostoc sp* qui résistent à cet antibiotique sauf Ln₇'. Toutes les souches de *Lactococcus sp* et *Streptococcus sp* utilisées résistent à cet antibiotique. Néanmoins, 2 souches de *Pediococcus sp* (P3' et P10) sont sensibles à ce dernier.

Nos résultats sont les mêmes obtenus par **Mami** en **2012** dans son travail sur des bactéries lactiques productrices des bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie où il a trouvé que les souches de *Lactobacillus sp* sont résistantes à la Vancomycine et à l'Ofloxacine et sensible à l'Imipenème.

Plusieurs études ont montré la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques (**Botes et al., 2008**). La résistance de souches de *Leuconostocsp* à la Vanomycine, a été bien élucidée (**Ogier et al., 2008**). De même que pour des espèces de *Lactococcus lactis* qui ont présenté une résistance à la Vanomycine (**Donohue, 2004**).

En effet, La résistance des probiotiques aux antibiotiques peut poser un problème si elle peut être transmise à des pathogènes chez lesquels la résistance thérapeutique pourrait avoir des conséquences néfastes. L'utilisation de différentes souches lactiques en tant que probiotiques doit faire l'objet de travaux extrêmement attentifs (**Marteau et al., 2004**). De même l'autorité Européenne de Sécurité Alimentaire, suggère que les probiotiques ne doivent pas avoir une résistance acquise aux antibiotiques (**Zago et al., 2011**).

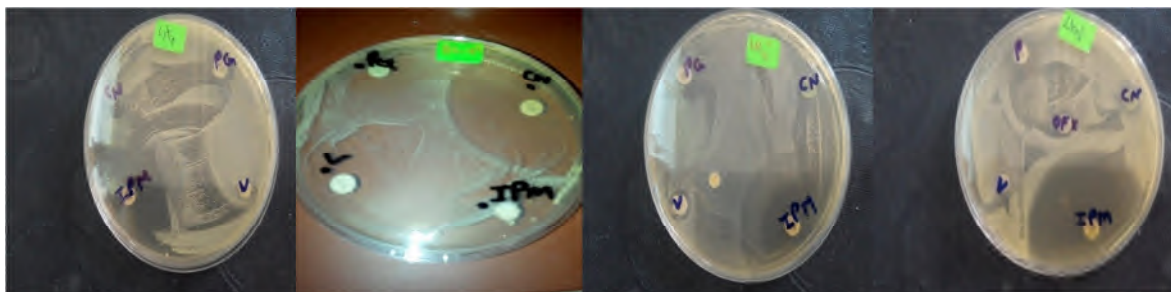


Figure 17 : Quelques résultats du test de la détermination de la sensibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques.

Références bibliographiques

A

- **Allouche FN, Hellal A et Laraba A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie*. **3**,13-20.
- **Ammor MS et Mayo B. (2007).** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science*. **76**, 138-146.
- **Ammor S, Tauveron G, Dufour E et Chevallier I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control*. **17**, 454-468.
- **Ammour MS. (2004).** Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison Identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse Doctorat de Biologie et Ecologie. Université d'Agrocampus Rennes.152p.
- **Aslim B, Yuksekdağa ZN, Sarıkayab E et Beyatlı Y. (2005).** Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT-Food and Technology*. **38**, 691-694.

B

- **Badis A. Geutarrni., Mossa Boudjema B et Hemmi Morsi. (2006).** Characterisation of lactic acid bacteria isolated from artisanal Egyptian Ras cheese. *Lait*. **86**, 317-331.
- **Barrons R et Tassone D. (2008).** Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in woman. *a review Clin Ther*. **30**, 453-468.

- **Bazo M, (2007).** L'effet de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques sur le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). Thèse de Doctorat de Biologie. Université de Québec. 124p.
- **Becker K, Harmsen D, Mellmann A, Meier C, Schumann P, Peters G Et von Eiff C. (2004).** Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **42** Suppl 11 : 4988-4995.
- **Belarabi F. (2012).** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes, Mémoire de Magistère, Université d'Oran Es Senia. 69p.
- **Ben Abdallah H, Sahnoun O, Ben Romdhane F, Loussaief C, Noomen S, Bouzouaia N, Chakroun M. (2008).** Profil de sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries uropathogènes isolées dans la région de Monastir. *Review Tunisian Infectiology*. **02** Suppl 11 : 5-8.
- **Benmammer F. et Hamsi S. (2003).** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73p.
- **Boskey E, Cone R, Whaley K et Moench T. (2001).** Origins of vaginal acidity : high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Human Reproduction*. **16** Suppl 9 :1809-1813
- **Bottazzi V, Mercenier A. (1994).** Propriétés prophylactiques et thérapeutiques des bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques. H De Roissart et F.M. Luquet. Eds, *Lorica-Uriage*. **2**, 409-418.
- **Botes M, van Reenen CA et Dicks LMT. (2008).** Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastro-

intestinal model with infant milk formulations as substrate. *Int. J. Food Microbiol.* **128**, 362-370.

- **Bower JM, Eto DS et Mulvey MA. (2005).**Covert Operations of Uropathogenic *Escherichia coli* within the Urinary Tract. Pathology Department, Division of cell Biology and Immunology. University of Utah School of Medicine. *Salt Lake City, USA.* **6**, 18-31.
- **Brul et Coote. (1999).** Preservative agents in foods : mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* **50**, 1-17.
- **Bruce A, Reid G, McGroarty J, Taylor M et Preston C. (1992).** Preliminary study on the prevention of recurrent urinary tract infection in adult women using intravaginal *lactobacilli*. *International Urogynecology Journal.* **3**, 22-25.

C

- **Cabo ML, Braber AF et Koenraad P. (2002).**Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *J.Food Prot.* **65**, 1309-1316.
- **Carine D et Tonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *BASE.* 13p.
- **Caron F. (2010).** Prise en charge des infections urinaires communautaires de l'adulte : ce qui a changé. A propos des recommandations 2008 de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. *Maladies infectieuses/Urologie.* **39**, 42-48.
- **CASFM.** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. *Edition janvier 2012.*

- **Chassin C, Goujon Jean-Michel, Le Bouguéneq C, Buzoni-Gatel D, Vandewalle A. (2007).** Une nouvelle fonction pour les cellules intercalaires du tubule collecteur rénal : La lutte contre les *Escherichia coli* uropathogènes. Centre de Recherche biomédicale Bichat-Beaujon (CRB3), Université Paris 7- Denis Diderot, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Paris.pp .23.
- **Chesson A. (2001).** Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. *European Commission, Health & Consumer Protection Directorate - General*.pp.24.
- **Collins MD, Samelis J, Metaxopoulos J Et Wallbanks S, 1993.** Taxonomic studies of some *Leuconostoc* like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.***75**, 595-603.
- **Condon S. (1987).** Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* **46** , 269-280.
- **Cotter PD , Hill C, Ross RP. (2005).** Bacterial antibiotics. Strategies to improve therapeutic potential. *Current Proteins and Peptides Science* .**6**, 61-75.
- **Cintas LM, Herranz C, Hernandez PE, Casaus MP, Nes IF et Hernandez PE. (2001).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* **7**, 281-305.
- **Çon AH et Gökalp HY. (2000).** Production of Bacteriocin-like metabolites by lactic-acid cultures isolated from sucuk samples. *Meat Sci.* **55**, 89-96.

D

- **Dacosta Y. (2000).** La Bio protection des aliments – L’antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologique. Edition : *Yves Dacosta. Paris.* pp.14-29.

- **Dal Bello B. (2009).** Genetic characterization of bioprotective strains isolated from Piedmont agri-food products. *Food Science Technology and Biotechnology*, pp.16-18.
- **Dellaglio F, de Roissard H, Torriani S, Curk MC et Janssens D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques. Ed. *Lorica Uriage* (Paris). **1**, 25-116.
- **De Man J.C., Rogosa M. et Sharpe M.E., 1960.** A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 130-135.
- **Denohue D.C. (2004).** Safety of novel probiotic bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Edition : *Marcel Dekker, Inc.* New York. pp. 531-546.
- **de Roissart H. et Luquet F. M., 1994.** Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques. (I) : Tome I : 25-590. Edition : *Lorica*. France. pp 142.
- **Devoyod et Muller., (1969).** Les leuconostocs propriétés. Leurs rôles en technologies laitière. *Le lait* .**68**, 249-280.
- **De Vuyst L, Avontsa L, Neysensa P, Hosteb B, Vancanneytb M, Swingsb J. et Callewaerta R.(2004).** The lactobin A and Amylovorin L471 encoding genes are identical, and their distribution seems to be restricted to the species *Lactobacillus amylovorus* that is of interest for cereal fermentations. *International Journal of Food Microbiology*.**90**, 93-106.
- **Doderlein A. (1894).** Die Scheidensekretersuchungen. *Centralblatt für Gynäkologie*. **18**, 1014.
- **Dortu C et Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13** Suppl 1 : 143-154.

- **Doye A. (2004).** Facteur cytotoxique nécrosant 1 (CNF1) des *Escherichia coli* uropathogènes : mise en évidence d'une nouvelle régulation des protéines rho par ubiquitinylation. Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Ecole pratique des hautes études, sciences de la vie et de la terre, 111p.
- **Drouault S et Corthier G. (2000).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits. *Food sci.* **7** Suppl 4 : 281-305.

E

- **Elegado FB, Kim WJ et Kwon DY. (1997).** Rapid purification partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, pediocin ACM. From *Pediococcus* from cucumber bunc. *Applied Environmental Microbiology.* **30**, 1040-1042.
- **El Shafei HA, abdel-Sabour H, Ibrahim N et Mostefa YA. (2000).** Isolation, screening and characterization of the bacteriocin-producing Lactic and Bacteria isolated from traditional fermented. *Food Microbiol. Res.* **154** Suppl 4 : 321-331.
- **El-Ziney MG, Uyttendaele M, Debevere J et Jakobsen M. (1998).** Characterization of growth and metabolite production of *Lb.reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol.Left.* **20** Suppl 10 :913-916.
- **Em dy L, Kerényi M et Nagy G. (2003).** Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. Part 1 of the International Symposium Hot Topics in Urinary Tract Infection. *International Journal of Antimicrobial Agents.* **2**, 29-33.
- **Eklund T. (1989).** Organic acids and esters. In: Gould, G.W. (Ed.), Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures, *Elsevier Applied Science*, London, pp. 161-200.

F

- **FAO/WHO.** Expert consultation on health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. American Córdoba Park Hotel, Córdoba, Argentina, 1-4 October 2001. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf (accessed 11.02.08).
- **Fleming HP, JL Etchells et Costilow RN. (1975).** Microbial inhibition by an isolate of *pediococcus* from cucumber Brins. *Appl. Microbiol.*, **30** Suppl 6 : 1040-1042.
- **Foxman B.(2002).** Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economic costs. *American Journal of Medicine.* **113**, 5S-13S.
- **Fuller R. (1989).** Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* . **66** Suppl 8 :365-378.

G

- **Gauthier R. (2002).** Le mode d'action des acidifiants et leur intérêt en engraissement. Association française de médecine vétérinaire porcine (a.f.m.v.p) St-Hyacinthe, Canada.17p.
- **Gevers D. (2002).** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. *Gent. Fac. Sci. Gent.* Belgium.pp. 112-120.
- **Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M. (2002).** Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* .**359**, 753-9.
- **Gonzalez. (2007).** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, *Institut de biologie*, Université de Tlemcen. 73 p.
- **Guessas B. et Kihal M. (2005).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goat's milk. *Afr.J. Biotechnol.* **3** Suppl 6 : 339-342.
- **Guiraud, J.P., Rosec, J.P. (2004).**Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Edition : *AFNOR*. 237-251p.
- **Guiraud J.P. (2003)** : Microbiologie alimentaire. Edition : *Dunod*, Paris. 652p.

H

- **Heng NC, Burtenshaw GA, Jack RW, Tagg JR. (2007).** Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Applied and Environmental Microbiology.* **73**, 7763-7766.

- **Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. 2001.** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73** suppl 4: 365–733.

I

- **Ikaheimo R, Siitonen A, Heiskanen T . (1996).** Recurrence of urinary tract infection in a primary care setting : analysis of 1-year follow-up of 179 woman. *Clin Infect Dis.* **22**, 91-99.

J

- **Jedidi H. (2007).** Effet du stress gastro-intestinal sur la physiologie et le métabolisme des bactéries lactiques et probiotiques. Québec.pp. 10-11.
- **Joffin J.N. et Leyral G. (1996).** Microbiologie technique. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine Bordeaux, *France*, pp. 219-223.
- **Joly B., Reynaud A. (2006).** Entérobactéries. *Edition* : Lavoisier. Médicales internationales. Paris. pp. 17-19.
- **Juarez M, Ocana V, Wiese B et Nader-Macias M. (2003).** Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of

uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*. **52** Suppl 12:1117-1124.

K

- **Kalchayanand N, Hanilin MB et Ray B. (1995).** Sublethal injury make Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**, 239-243.
- **Khalid NM et Marth EH. (1990).** *Lactobacilli*, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* **73** , 158-167.
- **Karthikeyan V et Santosh SW. (2009).** Isolation and partial characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. *Afr J Microbiol Res.* **3** Supp 15 : 233-239.
- **Kostinek M, Specht I, Vinod A, Edward, Ulrich Schillinger U, Hertel C, Wilhelm, H, Holzapfel, Charles M, Franza AP. (2006).** Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Systematic and Applied Microbiology.* **28**, 527–540.
- **Krieg NR. (2001).** The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria- Identification of procaryotes. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Garrity, G.M., Boone D.R., Castenholz, R.W. Willimas and Wilkins, *Baltimore.* **721**, 33-38.

L

- **Labioui H, Elmoualdi L, El Yachioui M et Ouhssine . (2005).** Selection de souches de bacteries lactique Antibacterienne. *Bull.Soc.Pharm,Bordeaux* .**144**, 237-250.
- **Lachance M .(2000).** Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lactococcus lactis ssp.lactis mjc15*. Mémoire de maître en sciences (MSc.). Université de Laval. 91p.
- **Laease. (2005)..** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73p.
- **Larpent JP. (1997).** Mémento technique de microbiologie .3eme Ed. *Technique et Documentation Lavoisier*. Paris.pp. 910 .
- **Laurent S. (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. *Poly technica* .Paris.pp. 307.
- **Lepargneur JP and Rousseau V .(2002) .** Rôle protecteur de la flore de Döderlin. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* , **31** Suppl 5 :485-494.
- **Leclerc H, Gaillard FL Et Simonet M .(1994).** Les grands groupes de bactéries. In : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. *DOIN*. Paris. 445p.
- **Leveau K. et Rouix M. 1983.** Milk coagulation and the development of Cheese Texture. In : *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Davis, F.L. and B.A. Law (Eds). *Elsevier Applied Science Publishers Ltd*, New York, USA .pp.418.

M

- **Maldonado A, Ruiz-Barba JL et Jiménez-Diaz R. (2003).** Purification and Genetic Characterization of Plantaricin NC8, a Novel Coculture-Inducible Two-Peptide Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl.Environ.Microbiol.***69** Suppl 1 :383-389.
- **Mami S. (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliquées dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de Doctorat de Microbiologie appliquée. Université d'Oran.121p.
- **Mainil J. (2003).** Facteurs de virulence et de propriétés spécifiques de souches invasives d'*Escherichia coli* : les adhésines et facteurs de colonisation. *Ann. Méd. Vét.***147**,105-126.
- **Mariani-Kurkdjian P.(2004).** Physiopathologie des infections urinaires. *Médecine thérapeutique/Pédiatrie.* **7** Suppl 3 : 167-72.
- **Marteau P et Seksik P. (2004).** Place des probiotiques dans la prévention et le traitement des diarrhées postantibiotiques. *Re. Fran. Lab.* pp 73-76.
- **McGroarty J, Reid G. , 1988.** Detection of a *Lactobacillus* substance that inhibits *Escherichia coli*. *Can J Microbiol.* **34**,974-8.
- **Metchnikoff E. (1907)** .Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In : The prolongation of life : optimistic studies. *Heinemann*, London .pp161-183.
- **Mercenier A, Pavan S et Pot B. (2003).**« Probiotics as biotherapeutic agents : Present Knowledge and future prospects » *Curr Pharmaceut Design* **2.** **9** Suppl 2 : 175-191.

- **Miyoshi A, Rochat T, Garatadoux JJ, Loi YL, Oliveira SC, Langella P et Azavedo V. (2003).** Oxidative Stress in *Lactococcus lactis*. Genetics and Molecular Research. 2 Suppl 4 : 348-359.
- **Mohler R et Brown C. (1933).** Doderlein's bacillus in the treatment of vaginitis. *American Journal of Obstretical Gynecology* .25,718-723.
- **Morena I, Lerayer ALS et de Freitas Leitao MF. (1999).** Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Rev.Microbiol.*30, 2-19
- **Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA et Yolken RH. (Eds.). (2003).** Manual of Clinical Microbiology (8th ed.). Herdon, VA, United States of America : *American Society for Microbiology*.pp. 273-268.

N

- **Navarro L, Zarazaga M, Saenz J, Ruiz-Larrea F et Torres C. (2000).** Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J. Appl. Microbiol.* **88** ,44-51.

O

- **Ocana V, Ruiz-Holgado A et Nader-Macias M. (1998).** Characterization of a bacteriocinlike substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain. *Applied and Environmental Microbiology*. **65** Suppl 12:5631-5635.
- **Ogier JC, Casalta E, Farrokh C et Saihi A. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 286-290.
- **Oh S , Kim S-H , Ko Y , Sim J-H , Kim K.S , Lee S-H, Park S et Kim Y.J. (2006).** Effect of bacteriocin produced by *Lactococcus sp.*HY 449 on skin-inflammatory bacteria. *Food and Chemical Toxicology*.**44** : 1184-1190.
- **Oscàriz JC et Pisabarro AG. (2001).** Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* **4**, 13-19.
- **Ouadghiri M. (2009)** .Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « lben » et « jben » d'origine marocaine. thèse de Doctorat. Université mohammed vagdal . 26-28p

P

- **Pilet MF, Magras C, Federigh M. (2005).** Bactéries lactiques. In : Bactériologie Alimentaire. *Ed. Economica* .Paris.pp. 249-240
- **POT B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique auxferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris.pp.1-106.
- **Praag EV. (2009).** Maladies gastro-intestinales *E.coli* et le rôle protecteur de *Lb. casei* chez les lapins nouveau-nés.pp. 1-5.
- **Przondo-Mordarka AD, Smutnicka K, Beuth J, Pulverer G, 1996.** Adhesive Properties of P-like Fimbriae in *Klebsiella*-species. *Zentralblatt für Bacteriologie*. **284** Suppl 3 :372-377.

R

- **Raffi HS, Bates JMJr, Laszik Z et Kumar S. (2009).** Tamm-Horsfall Protein Protects Against Urinary Tract Infection by *Proteus Mirabilis*. *The Journal of Urology*. **181** Suppl 5 : 2332-2338.
- **Rash SL et Kendall DL. (2007).** Interactions that drive Sec-dependant bacterial protein transport. *Biochemistry* 46, 9665-9673. Doi : 10.1021/bi7010064.Boston,pp.2736286
- **Rousseau V. (2004).** Evaluation d'oligosaccharides a effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale. Thèse de Doctorat. Institut National Des Sciences Appliquées de Toulouse 186p.

- **Roissard et Luquet. (1994).** Les bactéries lactiques. Edition : Lorisa, Luquet F.M, Lait et produits laitiers, *Tec et Doc* , édition Lavoisier, Paris.p362-400-402.
- **Reid G and Bruce A. (2003).** Urogenital infections in women : can probiotics help Postgraduate . *Medecine Journal.* **79** Suppl 934: 428-432.
- **Reid G, Beuerman D, Heinemann C and Bruce A. (2001).** Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **32** Suppl 1:37-41.
- **Reid G, Soboh F, Bruce A and Mittelman M. (1998).** Effect of nutrient composition on the in vitro growth of urogenital *lactobacilli* and uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology* **44**,866-871.
- **Riegel P. (2003).** Aspects bactériologiques des infections urinaires nosocomiales. *Médecine et Maladies Infectieuses.* 33 Suppl.4 : 255-265.
- **Rodriguez J.M., Martinez M.I et Kok J., 2002.** Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria . *Crit. Rev. Food Sci.Nutr* . **42**, 91-121.

S

- **Savadogo A, Ouattara1 CAT, Savadogo PW, Ouattara1 AS, Barro N et Traore AS. (2004).** Microorganisms Involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso. *Pakistan Journal of Nutrition.* **3** Suppl 2: 134-139.

- **Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P .(2006).** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology.***71**, 394-406.
- **Schillinger, U et Lucke, FK .(1989).** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**,1901.
- **Schnürer et Mangnusson J. (2005).** Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Food Sc. Technol.* **16**, 70-78.
- **Song HJ et Richard J.(1997).** Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *International Journal of food Microbiologie ;* **36** Suppl 2 : 155-161.
- **Stiles ME et Holzapfel WH. (1997).** Review article Lactic acid bacteria of foods andtheircurrent taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36**, 1-29.
- **Strahinić I, Cvetanovi D, Koji M, Fira DJ, Tolina KM et Topisirovi LJ. (2007).** Characterization and antimicrobial activity of natural isolate *lactococcus lactis subsp. Lactis* BGS. **19** Suppl 4 : S93-96.

T

- **Tabasco R, Paarup T, Janer C, Pelaez C, Requena T. (2007).** Selective enumeration and identification of mixed cultures of streptococcus thermophilus, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *L.paracasei subs. Paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal.* **17**, 1107-1114.
- **Tamime AY.(2002).** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (RobinsonR.K.). 3e Ed., *John Wiley and Sons, Inc., New York.*pp. 261-366.

- **Taranto M, Medici M, Perdigon G, RuizHolgado A et Valdez G. (1998).** vidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypocholesterolemic mice. *Journal of Dairy Science* .81 Suppl 9 :2336-2340.
- **Temmerman R, Pot B, Huys G et Swings J. (2003).** Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* **81**, 1-10.
- **Thirion DJG, Williamson D. (2003).** Les infections urinaires : une approche clinique. *Pharmacothérapie.* **36** Suppl 5 : 547-550.
- **Todorov SD et Dicks LMT. (2005).** Production of bacteriocin ST33LD, produced by *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*, as recorded in the presence of different medium components. *World J.Microbiol.Biotechnol.* **21**, 1585-1590
- **Todorov SD, van Reenen CA et Dicks LM. (2004).** Optimization of bactériocinproduction by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barely beer. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **50** , 149-157.

V

- **Vandamme P, Pot B, Gillis M, DeVos P, Kersters K et Swings J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**, 407.
- **Vignola C. (2002).** Science et technologie du lait éd. *Presses internationales polytechnique.***50**, 321-330.

- **Vinod Kumar J, Somesh S et Neerja S. (2006).** Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolated of Naturel Lactic and fermentation of vegetables. *Food Technology and Biotechnology*, **44** Suppl 3 :435-439.
- **Vollenweider S. (2004).** 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.* **64**, 16-27.

W

- **Wiles TJ, Kulesus RR et Mulvey MA . (2008).** Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and molecular pathology.* **85** , 11-19 .

Y

- **Yumuk Z, Afacan G, Nicolas-Chanoine MH, Sotto A, Lavigne JP. (2008).** A further country concerned by community acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.***62**,284-8

Z

- **Zago M, Fornasari ME, Carminati D, Burns P, Suàrez V, Vinderola G, Reinheimer J et Giraffa G, 2011.** Characterization and probiotic potential of

Lactobacillus plantarum strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* **28**, 1033-1040.

- **Za'rate G et Nader-Macias. (2006).** ME. Influence of probiotic vaginal *lactobacilli* on in vitro adhesion of urogenital pathogens o vaginal epithelial cells. *Lett Appl Microbiol.* **43** Suppl 2 :174-180.
- **Zunino P, Geymonat L, Allen A, Lenghani-Fajardo C, Maskell DJ. (2000).** Virulence of *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology.** **29** Suppl 2 : 137-143.

Annexe I

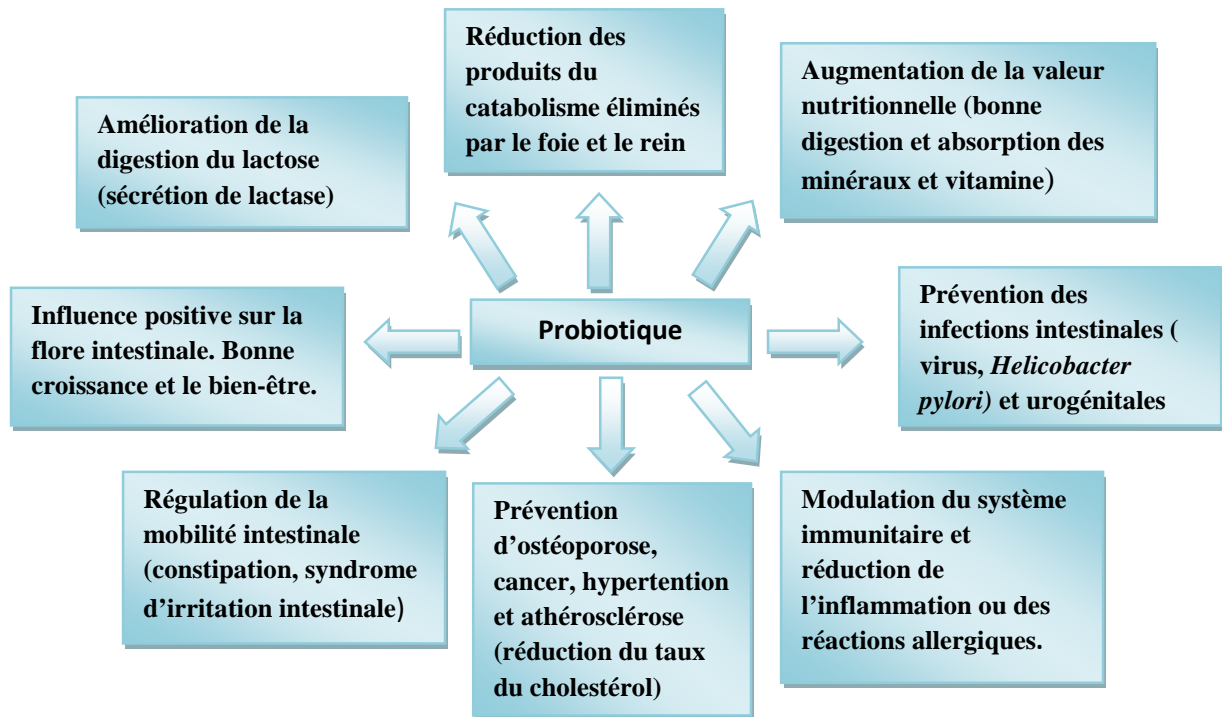


Figure 1 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques. (Mercenier *et al.*, 2003)

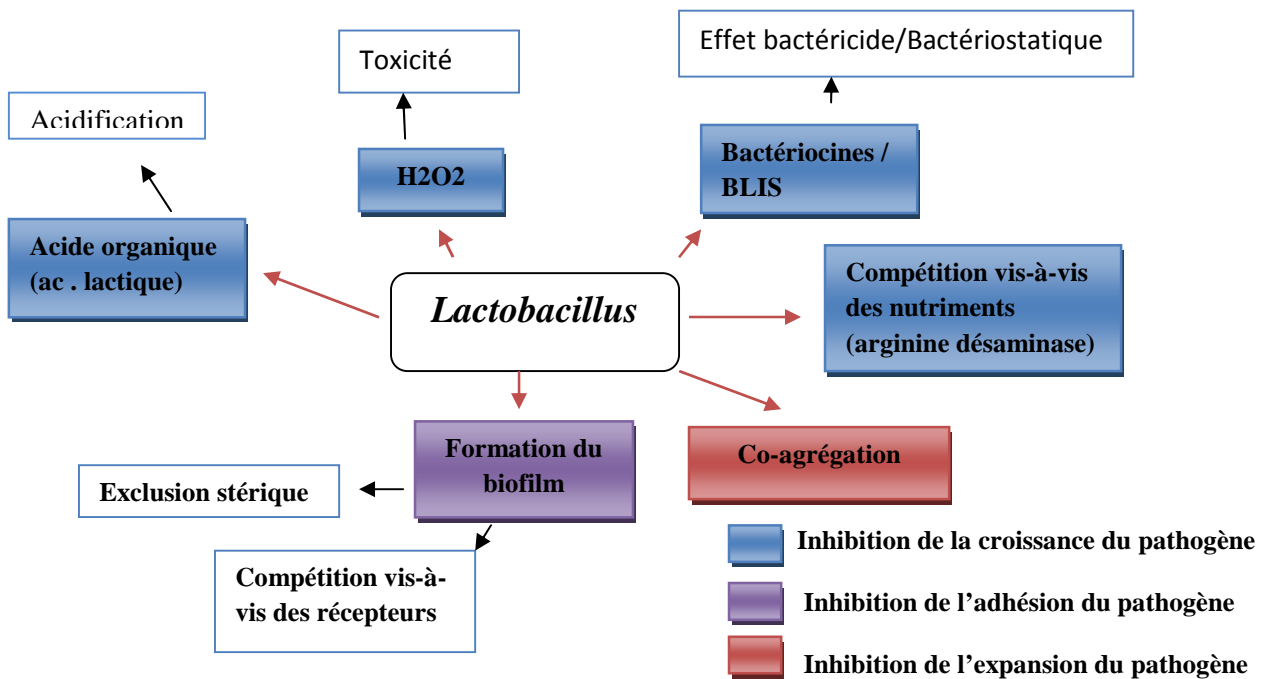


Figure 2 : Mécanismes mis en jeu par les lactobacilles vaginaux pour inhiber les pathogènes. (Lepargneur et Rousseau, 2002).

Tableau II : Origine des souches lactiques utilisées.

Souches	Origines	Genre et/ou Espèce	Code et Milieu de culture	Température de croissance	
Lb ₁	Tichy	<i>Lactobacillus</i>	S : 02 MRS	30°C	
Lb ₂	PK7		S : 04 MRS	30°C	
Lb _{2'}	Amizour		S : D MRS	37°C	
Lb _{4'}	TO		S : 09 MRS	37°C	
Lb _{5'}	Kendira		S : 03 MRS	37°C	
Lb _{6'}	Amizour		S : A MRS	37°C	
Lb _{7'}	Adekar		S : 03 MRS	37°C	
Lb _{8'}	Tichy		S : 09 MRS	37°C	
Lb _{9'}	Amizour		S : 01 MRS	37°C	
Lb _{10'}			S : C MRS	37°C	
Lb ₁₁	Adekar		S : A M17	30°C	
Lb ₁₂	Tichy		S : 01 MRS	30°C	
Lb ₁₃			S : 03 MRS	30°C	
Lb _{14'}			S : 04 MRS	37°C	
Lb _{15'}	Amizour		S : 02 MRS	37°C	
Lb _{16'}	Adekar		S : 02 MRS	37°C	
Lb _{17'}			S : 04 MRS	37°C	
Lb _{18'}			S : 06 MRS	37°C	
Lb ₁₉			S : 07 MRS	30°C	
Lb _{20'}	Amizour		S : B MRS	37°C	
Lb _{22'}	Adekar		S : 07 MRS	37°C	
Lb _{23'}	Tichy		S : 08 MRS	37°C	
Lb _{24'}			S : 02 MRS	37°C	
Lb _{25'}			S : 06 MRS	37°C	
Lb _{26'}			S : 01 MRS	37°C	
Lb _{27'}	PK7		S : 06 MRS	37°C	
Ln ₁	PK7		<i>Leuconostocmesenteroidessubspcremoris</i>	S : 05 MRS	30°C
Ln ₂	Kendira	<i>Ln oenos</i>	S : 01 MRS	30°C	
Ln _{3'}	Tizi	<i>Leuconostoc</i>	S : 02 MRS	37°C	
Ln _{4'}	LK		S : 02 MRS	37°C	
Ln ₅	LK		S : 03 M 17	30°C	
Ln ₆	Sétif		S : 01 MRS	30°C	
Ln _{7'}	BL		S : 01 MRS	37°C	
Ln _{8'}	Sétif		S : 07 MRS	37°C	
Ln ₉	Sétif		S : 02 MRS	30°C	
Ln ₁₀	Toudja		S : A MRS	37°C	
Ln _{11'}	LK		S : 01 MRS	37°C	
Ln _{12'}	LK		S : 05 MRS	37°C	
Ln _{13'}	Toudja		S : 03 MRS	37°C	
Lc _{1'}	Tizi		<i>Lactococcuslactissplactis</i>	S : 04 MRS	37°C
Lc ₃	PK7			S : 03 MRS	30°C

Lc₃'	Sétif	<i>Lactococcus</i>	S : 06 MRS	37°C	
Lc₄'	Ras-Elma	<i>Lactococcusraffino lactis</i>	S : 02 MRS	37°C	
Lc₅'	Tizi	<i>Lactococcuslactiss pcremoris</i>	S : 03 Tizi	37°C	
St₁	PK7	<i>Streptococcus agalactae</i>	S : 02 MRS	30°C	
P₁'	Fénaia	<i>Pediococcusalophilus</i>	S : 01 MRS	37°C	
P₂'			S : 02 MRS	37°C	
P₃'			S : 03 MRS	37°C	
P₄'	Timezrit		S : 01 M17	37°C	
P₅'			S : 05 M17	37°C	
P₆'	Amizour		S : 04 MRS	37°C	
P₇	Adekar		S : C M17	30°C	
P₈'			S : 01 MRS	37°C	
P₉'	Tichy		S : 07 MRS	37°C	
P₁₀	PK7		S : 01 M17	30°C	
P₁₁'	Bolimat		S : 04 MRS	37°C	
P₁₂'	Bolimat		<i>Pediococcus</i>	S : 03 MRS	37°C
P₁₃'	Timezrit			S : 02 M17	37°C

Tableau V: Les antibiotiques utilisés pour définir la sensibilité de nos souches lactiques

Antibiotiques	Charge de disque	Symbole
PENECILLINES		
Pénicilline G	10µg	PG
CARBAPENEME		
Imipenème	10µg	IPM
FLUOROQUINOLONES		
Ofloxacin	5 µg	OXF
GLYCOPEPTIDES		
Vancomycine	0,05g/ml	VA
CEPHALOSPORINES		
Céfalexine	30 µg	CN

Les cinq antibiotiques proviennent d'institut Pasteur.

Tableau XI : Résultats de la sélection des bactéries lactiques ayant une importante activité antimicrobienne à l'égard de SARM et *E.coli* AT CC 25922.

Souches Tests \ Souches cibles	Diamètre de la zone d'inhibition en mm	
	SARM	<i>E.coli</i> AT CC 25922
Lb ₁	30	25
Lb ₂	25	22
Lb _{2'}	35	35
Lb _{4'}	13	18
Lb _{5'}	25	25
Lb _{6'}	25	25
Lb _{7'}	12	30
Lb _{8'}	22	30
Lb _{9'}	20	28
Lb _{10'}	20	30
Lb ₁₁	20	28
Lb ₁₂	22	30
Lb ₁₃	30	30
Lb _{14'}	30	16
Lb _{15'}	25	13
Lb _{16'}	20	14
Lb _{17'}	20	30
Lb _{18'}	20	18
Lb _{19'}	10	20
Lb _{20'}	20	23
Lb _{22'}	25	40
Lb _{23'}	35	45
Lb _{24'}	42	43
Lb _{25'}	35	35
Lb _{26'}	20	35
Lb _{27'}	10	12
Lc _{1'}	20	30
Lc ₃	30	16
Lc _{3'}	35	37
Lc _{4'}	10	22
Lc _{5'}	20	30
Ln ₁	30	12
Ln ₂	30	20
Ln _{3'}	35	35
Ln _{4'}	35	35
Ln ₅	35	35
Ln ₆	35	35
Ln _{7'}	40	35
Ln _{8'}	40	30

Ln₉	25	20
Ln₁₀	0	0
Ln₁₁'	16	20
Ln₁₂'	20	23
Ln₁₃'	23	20
P₁'	35	23
P₂'	12	16
P₃'	26	30
P₄'	20	22
P₅'	12	28
P₆'	12	20
P₇	22	30
P₈'	30	22
P₉'	20	28
P₁₀	30	43
P₁₁'	22	35
P₁₂'	20	25
P₁₃'	22	20
St₁	35	26

Tableau IX : Résultats de standardisation des souches lactiques isolées du l'ben traditionnel

Souches lactiques	Lb1	Lb₂	Lb₂'	Lb₄'	Lb₅'	Lb₇'	Lb₈'	Lb₉'	Lb₁₀'	Lb₁₁	Lb₁₂
Inoculum standard 10⁹	2,6	1,8	3	2,3	2	3	2,6	3,5	3,2	5	2,6
Souches lactiques	Lb₁₃	Lb₁₄'	Lb₁₅'	Lb₁₆'	Lb₁₇'	Lb₁₈'	Lb₁₉	Lb₂₀'	Lb₂₂'	Lb₂₃'	Lb₂₄'
Inoculum standard 10⁹	4	3	2,3	2,6	2	2,1	1,3	1,5	1	1,3	3
Souches lactiques	Lb₂₅	Lb₂₆'	Lb₂₇'	St₁	P₁'	P₂'	P₃'	P₄'	P₅'	P₆'	P₇
Inoculum standard 10⁹	4	5,1	1	3,2	4,2	3,5	1,3	2,3	1,5	2,6	3,4
Souches lactiques	P₈'	P₉'	P₁₀	P₁₁'	P₁₂'	P₁₃'	Lc₁'	Lc₃	Lc₃'	Lc₄'	Lc₅'
Inoculum standard 10⁹	2,5	2,8	5	3,1	4,1	2,5	1,2	2,3	1,6	1,7	1,3
Souches lactiques	Ln₁	Ln₂	Ln₃'	Ln₄'	Ln₅	Ln₆	Ln₇'	Ln₈'	Ln₉	Ln₁₀	Ln₁₁'
Inoculum standard 10⁹	4	6,2	3,5	3	2,8	2	3	2,1	4,2	3,1	1,6
Souches lactiques	Ln₁₂	Ln₁₃'									
Inoculum standard 10⁹	2,5	1,3									

Tableau X : Résultats de standardisation des souches cibles utilisée

Souches cibles	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méthicilline	<i>Klebsiellapneumoniae</i>
Inoculum Standard	1,6.10 ⁹	2,5. 10 ⁸	1,2. 10 ⁹
Souches cibles	<i>Proteus sp</i>	<i>Enterobactercloacae</i>	
Inoculum Standard	3,2.10 ⁹	10 ¹⁰	

Tableau VII : Résumé de l'observation microscopique des souches lactiques.

Code de la souche	Gram	Forme	Mode d'association
Lb ₁	+	Petit bâtonnet	Chainettes
Lb ₂	+	Petit bâtonnet	Chainettes
Lb ₂ '	+	Coccobacille	Chainettes
Lb ₃ '	+	Petit bâtonnet	Chainettes
Lb ₄ '	+	Petit bâtonnet	Chainettes
Lb ₅	+	Petit bâtonnet	Chainettes
Lb ₆ '	+	Bacille	Chainettes
Lb ₇	+	Bacille	Chainettes
Lb ₈ '	+	Longue bacille	Isolées, petites chainettes
Lb ₉ '	+	Bacille	Chainettes
Lb ₁₀ '	+	Petit gros bacille	Chainettes
Lb ₁₁	+	Bacille	Chainettes
Lb ₁₂	+	Bacille	Chainettes
Lb ₁₃	+	Bacille	Chainettes
Lb ₁₄ '	+	Petit gros bacille	Chainettes
Lb ₁₅ '	+	Petit bâtonnet	Chainettes
Lb ₁₆ '	+	Coccobacille	Diplocoque, en amas
Lb ₁₇ '	+	Coccobacille	Chainettes
Lb ₁₈ '	+	Coccobacille	Chainettes, dispersé
Lb ₁₉ '	+	Coccobacille	Chainettes, dispersé
Lb ₂₀ '	+	Bacille	Chainettes
Lb ₂₁	+	Bacille	Chainettes
Lb ₂₂ '	+	Bacille	Chainettes
Lb ₂₃ '	+	Bacille	Chainettes
Lb ₂₄ '	+	Petit bâtonnet	Chainettes
Lb ₂₅ '	+	Petit bâtonnet	Chainettes
Lb ₂₆ '	+	Petit bâtonnet	Chainettes
Lb ₂₇ '	+	Coccobacille	Chainettes
Ln ₁	+	Cocci (ronde)	Diplocoques, chainettes
Ln ₂	+	Cocci	Diplocoques
Ln ₃ '	+	Cocci	Diplocoques, chainettes
Ln ₄ '	+	Cocci (ronde)	Diplocoques
Ln ₅	+	Cocci	Diplocoques
Ln ₆	+	Cocci	Diplocoques, petites chainettes
Ln ₇ '	+	Cocci (ovoïde)	Diplocoques
Ln ₈ '	+	Cocci	Petites chainettes
Ln ₉	+	Cocci	Petites chainettes
Ln ₁₀ '	+	Cocci	Diplocoques
Ln ₁₁ '	+	Cocci (ovoïde)	Diplocoques
Ln ₁₂ '	+	Cocci	Diplocoques
Ln ₁₃ '	+	Cocci	Diplocoques
Lc ₁ '	+	Cocci	Chainettes

Lc₂'	+	Cocci	Chainettes / Diplocoques
Lc₃	+	Cocci	Chainettes,Diplocoques
Lc₃'	+	Cocci	Chainettes
Lc₄'	+	Cocci	Chainettes
Lc₅'	+	Cocci	Chainettes
St₁	+	Cocci	Amas
P₁'	+	Cocci	Diplocoques,en chainette
P₂'	+	Cocci (ronde)	Isolées
P₃'	+	Cocci (ronde)	Diplocoques ,en tétrade
P₄'	+	Cocci (ronde)	Diplocoques
P₅ ‘	+	Cocci (ovoïde)	Isolées, en tétrade
P₆'	+	Cocci (ovoïde)	Isolées, en tétrade
P₇	+	Cocci	Diplocoques, en tétrade
P₈'	+	Cocci	Diplocoques, en tétrade
P₉'	+	Cocci	Diplocoques, en tétrade
P₁₀	+	Cocci	Diplocoques
P₁₁'	+	Cocci	Diplocoques
P₁₂'	+	Cocci	Diplocoques, en tétrade

Annexe II

Tableau I : Les différentes classes de bactériocines (Lachance ,2000 ; Jedidi, 2007 ; Dortu et Thonart, 2009).

Classe	Caractéristique	Sous classe	Mode d'action
Classe I Lantibiotiques	Moins de 5 kDa ; Thermostable ; Acides aminés soufrés.	-I a : Molécule linéaire ; peptides cationique hydrophobe ; de 34 acides aminés -I b : Molécule globulaire ; de charge négative, composé de 19 acides aminés.	-Dissipent la force proton-motrice par formation de pore et interfèrent avec la synthèse de peptidoglycane. -Inhibent la synthèse de peptidoglycane.
Classe II Pediocine	Moins de 10 kDa ; Thermostable ; Chargé négativement à pH neutre.	-II a : De 27 à 48 acides aminés ; possède une séquence consensus YGNGV et un pont disulfure sur la partie N- terminale ; large spectre -II b : Nécessite deux peptides pour avoir une activité antibactérienne -II c : Autre bactériocines	Interagit avec la mambrane ou un pécepteur, et forme des pores sur la membrane
Classe III	-Plus de 30 kDa ; thermolabiles ;	Nd	Hydrolyse des liens peptidiques de peptidoglycane
Classe IV	-Composées d'une partie non protéique nécessaire à l'activité inhibitrice (sucre ou lipide).	Nd	Nd

Nd : Non déterminé

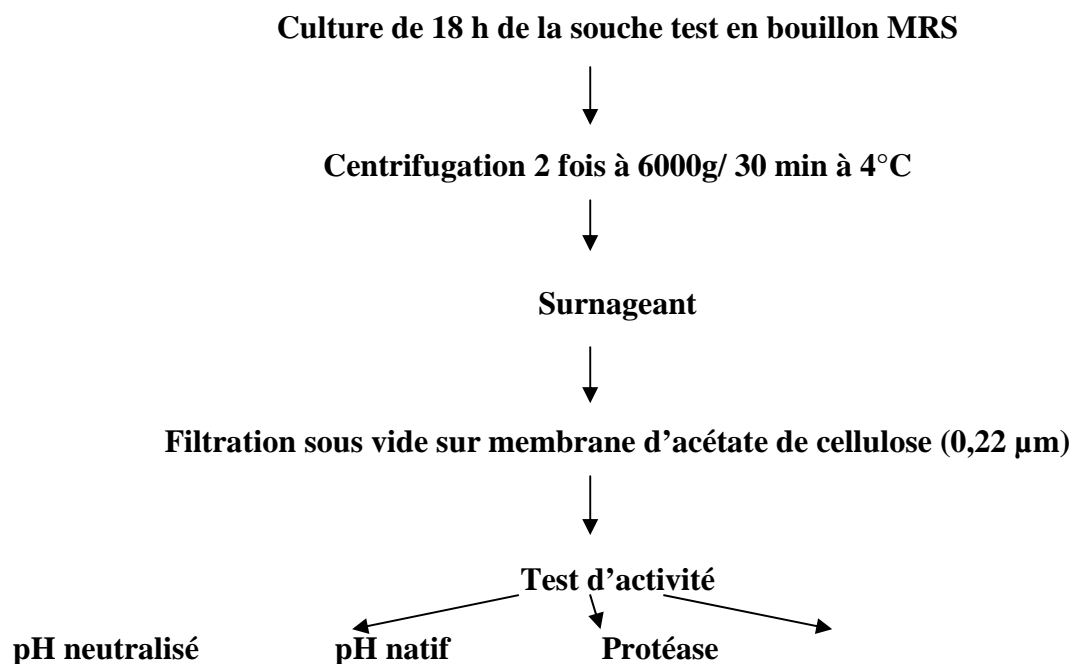


Figure 6 :Protocole de récupération du surnageant de culture de bactéries lactiques
« modifié » (**Data et al., 1994**)

Tampon phosphate (pH 5,6 – 8,0)

Préparer une solution de di-hydrogéo-phosphate de potassium à M/ 15(soit 9,08 g de KH_2PO_4 / Litre) et une solution de di-sodium hydrogénophosphate(9,47 g de Na_2HPO_4 / Litre)

Mélanger suivant les indications dans le tableau suivant :

Tableau IV : Indications à suivre pour la préparation du tampon phosphate

pH	Na_2HPO_4 à M/15	KH_2PO_4 à M/15
5,6	10,0 ml	190,0 ml
5,8	16,5 ml	183,5 ml
6	15 ml	175 ml
6,4	36 ml	164 ml
6,4	53,5 ml	146,5 ml
6,6	74,5 ml	125,5 ml
6,8	99 ml	101,0 ml
7	122 ml	78 ml
7,2	143 ml	57 ml
7,4	161 ml	39 ml
7,6	172,5 ml	27,5 ml
7,8	182,5 ml	17, 5 ml
8	189 ml	11 ml

Annexe III

Composition des milieux de culture

Tableau I : Bouillon MRS (De Man Rogosa et Sharpe) (Guiraud, 2003)

Composition	Quantité (Gramme/litre)
Peptone	10
Extrait de viande	8
Extrait de levure	4
Glucose	20
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Eau distillé	1000 ml
pH 6,5	
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes	

Tableau II : Gélose MRS (Guiraud, 2003)

Composition	Quantité (Gramme/Litre)
Peptone	10
Extrait de viande de bœuf	8
Extrait de levure	4
Glucose	20
Tween 80	1 ml
Phosphate dipotassique	2
Acétate de Sodium	5
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Agar	15
Eau distillé	1000 ml
pH 6,2 ± 0,2	
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes	

Tableau III : Bouillon nutritif (Guiraud, 2003)

Composition	Quantité (Gramme/Litre)
Peptone	10
Extrait de viande	5
NaCl	5
Eau distillé	1000 ml
pH 7,2	

Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes

Tableau IV : Gélose nutritive (Guiraud, 2003)

Composition	Quantité (Gramme/Litre)
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2,5
Peptone	5
Chlorure de sodium	5
Agar	15
Eau distillé	1000 ml
pH 7	
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes	

Tableau V : Gélose M17 (Milieu de Terzagui) (Guiraud, 2003)

Composition	Quantité (Gramme/Litre)
Tryptone	5
Peptone de soja	5
Infusion de viande	5
Extrait de levure	2,5
Acide ascorbique	0,5
Sulfate de magnésium	0,25
glycérophosphate de sodium	19
Agar	15
Eau distillé	1000 ml
pH 6,9 ± 0,2	
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes	

Tableau VI : Gélose Muller Hinton (Guiraud, 2003)

Composition	Quantité (Gramme/Litre)
Infusion de viande	300 ml
Peptone de caséine	17,5
Amidon de maïs	1,5
Agar	15
Eau distillé	1000ml
pH 7,4	
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes	

Annexe IV

Solutions

- Solution NaOH

Composition	Quantité
Eau distillée	1000 ml
NaOH	40 g
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes	

- Eau physiologique

Composition	Quantité
Eau distillé	1000 ml
NaCl	9
pH 7	
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes	

- Phénolphtaléine à 1 %

Composition	Quantité
Phénolphtaléine	1 g
Alcool	100 ml
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes	

- Solution Hcl à 1N

Composition	Quantité
Eau distillé	100 ml
Hcl	4ml
Autoclavage à 120°C pendant 20 minutes	

Tableau XIV : Résultats d'effet antibactérien des bactéries lactiques sélectionnés ; obtenus a partir du test des puits avec un surnageant natif et ajusté.

	Diamètre de la zone d'inhibition en mm							
	Surnageant natif				Surnageant ajusté (neutralisé)			
	<i>E.Coli</i>	SARM	<i>Enterobacter cloacae</i>		<i>E.Coli</i>	SARM	<i>Enterobacter cloacae</i>	
			7322 BK	1417 TT			7322 BK	1417 TT
Lb 1	18	0	28	26	16	0	18	16
Lb 2	20	18	28	18	18	6	26	12
Lb 2'	20	20	28	26	18	14	24	22
Lb 5'	16	0	32	26	0	0	12	20
Lb 8'	0	38	22	14	14	30	12	10
Lb 12	10	28	22	20	0	10	14	18
Lb 13	18	0	22	18	18	0	18	18
Lb 14'	18	0	22	14	16	0	14	10
Lb 17'	24	0	24	24	20	0	12	20
Lb 20'	20	32	32	0	16	0	30	0
Lb 22'	22	0	32	18	20	0	24	14
Lb 23'	18	28	38	18	18	28	24	14
Lb 24'	20	16	30	18	18	16	28	16
Lb 25'	18	0	38	18	0	0	24	0
Lb 26'	20	0	30	18	18	0	26	16
P 3'	18	22	26	18	12	14	26	16
P7	18	30	26	18	16	18	24	14
P8'	14	14	26	20	14	14	24	20
P 10	16	24	26	26	16	22	20	18
P 11'	18	30	0	20	18	0	0	18
St 1	0	26	26	26	18	24	24	18
Ln 1	14	26	28	26	14	12	26	16
Ln 2	24	32	0	20	16	30	30	16
Ln 3'	18	18	24	26	16	14	20	22
Ln 4'	12	0	26	0	12	0	24	0
Ln 7'	24	24	28	28	20	14	20	24
Lc 1'	0	34	0	20	18	14	14	18
Lc 3	18	30	30	30	18	26	18	18
Lc 3'	20	0	0	18	0	0	0	16
Lc 5'	24	34	34	0	22	26	28	0

Tableau XVI : Résultats de la résistance et la sensibilité des ferments lactiques aux antibiotiques

ATB BL	Pénicilline G	Céfalexine	Imipenème	Vancomycine	Ofloxacine
Lb ₁	R	R	S	R	--
Lb ₂	R	R	--	R	--
Lb _{2'}	R	R	S	R	--
Lb _{5'}	R	R	--	R	--
Lb _{8'}	R	R	S	R	R
Lb ₁₂	R	R	--	R	--
Lb ₁₃	R	R	--	R	--
Lb _{14'}	S	R	--	R	--
Lb _{17'}	R	R	S	R	--
Lb _{20'}	R	R	--	R	--
Lb _{22'}	R	R	S	R	--
Lb _{23'}	R	R	S	R	--
Lb _{24'}	R	R	S	R	--
Lb _{25'}	R	R	S	R	--
Lb _{26'}	R	R	--	R	--
P _{3'}	S	R	S	R	--
P ₇	R	R	--	R	--
P _{8'}	R	R	S	R	--
P ₁₀	S	R	S	R	--
P _{11'}	R	R	S	R	--
St ₁	R	R	R	R	--
Ln ₁	R	R	S	R	--
Ln ₂	R	R	--	R	R
Ln _{3'}	R	R	--	R	--
Ln _{4'}	R	R	S	R	--
Ln _{7'}	S	R	S	R	--
Lc _{1'}	R	R	S	R	--
Lc ₃	R	R	--	R	--
Lc _{3'}	R	R	S	R	--
Lc _{5'}	R	R	--	R	--

-- : Non-testée

Conclusion

Notre travail s'est porté essentiellement sur l'étude de l'activité antibactérienne de souches lactiques isolées du l'ben traditionnel à l'égard de souches pathogènes hospitalières responsable des infections urinaires.

Au cours de ce travail, deux souches référenciées (SARM et *E.coli* ATCC 25922) sont utilisées comme souches cibles dans le test des spots afin de sélectionner les souches lactiques les plus performantes en activité antibactérienne à partir des 58 souches lactiques utilisées préalablement revivifiées, purifiées et standardisées.

Les 30 souches lactiques sélectionnées sont testées pour leur capacité d'inhiber 30 souches hospitalières responsables des infections urinaires (*E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* et *Proteus sp*). Afin de déterminer l'activité antagoniste de ces 30 souches lactiques, 2 tests sont réalisés :

-Test des spots (contacte directe entre les cellules de la souche testé et la souche cible), ce test a révélé que les résultats obtenus montrent que toutes les souches lactiques testées sont douées l'activité antibactérienne.

-Test des puits a révélé que l'activité antibactérienne de quelque souches lactiques n'a pas pu être détecté dans le surnageant natif, cela peut indiquer que les souches cibles utilisées sont résistantes à l'acidité ; résistantes au peroxyde d'hydrogène ou bien les souches lactiques utilisées sont non ou faiblement productrice de H₂O₂. En effet, La disparition de l'effet inhibiteur (observé dans le test des spots), dans le test des puits peut indiquer que la synthèse des substances antibactériennes (Type bactériocine) sont synthétisées à de faibles concentrations, ou bien dénaturées au cours de la centrifugation, ou affectées par les pH du surnageant, ou bien par le fait que les bactériocines sont restées attacher à la paroi des bactéries productrices.

D'après notre étude, les bactéries lactiques isolées du l'ben ont un pouvoir inhibiteur important à l'égard d'un nombre de souches pathogènes responsable des infections urinaires. Pour cela, il est recommandé de consommer du l'ben pour traiter les cystites et rééquilibrer la flore vaginale pour prévenir l'apparition et aider à l'évacuation de certaines bactéries pathogènes.

En perspective, cette étude reste préliminaire et doit être complétée par d'autres études qui viseront, entre autre, la :

- Identification génétiques des bactéries lactiques utilisées et aussi l'utilisation d'autres souches dans ce but ;
- Répétition des tests afin de confirmer les résultats obtenus ;
- Elargir l'étude à d'autres souches hospitalières responsables des infections urinaires.
- Mise en évidence de la présence des substances antibactériennes et leur nature, ainsi, leurs purifications et caractérisation ;
- Vérification de l'hypothèse, que les bactériocines peuvent rester attachées sur la paroi des bactéries productrices ;

Résumé

58 souches de bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* isolées du l'ben traditionnel ont été testées dans cette étude pour leur pouvoir antibactérien afin de sélectionner les souches les plus performantes.

30 souches lactique douées d'activité antibactérienne ont été sélectionnées et testées vis-à-vis 30 souches hospitalières responsables des infections urinaires (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus sp*). L'activité antibactérienne est évaluée par deux méthodes : test des spots et des puits.

Le test des spots a révélé une activité antibactérienne de ces souches à l'égard de toutes les souches cibles. Les résultats du test des puits ont montré que cette activité est due à la synthèse de divers métabolites dont les principaux sont : les acides organiques (acide lactique), peroxyde d'hydrogène et les bactériocines. Les résultats obtenus suggèrent l'utilisation de ces dernières comme traitement curatif ou préventif des infections urinaires.

Mots clés : Bactéries lactiques, souches hospitalières, infections urinaires, activité antibactérienne.

Abstract

58 strains of lactic bacteria belonging to the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc* isolated from the l'ben were tested in this study for their antibacterial power to select the most effective strains.

30 endowed with antibacterial activity lactic strains were selected and tested toward 30 clinical strains causing urinary tract infections (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus sp*). The antibacterial activity was evaluated by two methods: test spots and wells.

The spots test showed antibacterial activity of these strains with toward all target strains. The results of the wells test have shown that this activity is due to the various metabolites synthesis, the main ones: organic acids (lactic acid), hydrogen peroxide and bacteriocins . The results obtained suggest the use of these as treatment or prevention of urinary tract infections.

Keys words: Lactic bacteria, Clinical strains, urinary tract infection, and antibacterial activity.