

Réf :.....

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

**MASTER**

*Thème*

**Evaluation de l'effet anti-adhésif de  
quelques bactéries lactiques**

Présenté par :

**AKKOUCHE Yasmina & AZZOUZ Siham**

Soutenu le : **30 Juin 2019**

Devant le jury composé de :

M. BENSALD K.

Mme. BENACHOUR K.

Melle. BENDALI F.

MAB

MAA

Professeur

Président

Encadreur

Examineur

**Année universitaire : 2018 / 2019**

## **Remerciements**

---

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements tout d'abord au bon Dieu le tout puissant de nous avoir accordé santé et courage pour accomplir ce travail.*

*Nous tenons à remercier très chaleureusement tout d'abord notre promotrice M<sup>me</sup> BENACHOUR Karima pour toutes ses conseils, ses encouragements et pour la qualité de son encadrement dont on a bénéficié lors de la préparation de ce mémoire. Soyez assurée, madame, de notre estime et de notre profond respect.*

*Nos profonds remerciements s'adressent aussi aux membres du jury : M<sup>lle</sup> BENDALI F. et Mr BENSALD K. pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger ce travail et pour le temps et l'attention qu'ils ont bien voulu lui consacrer.*

*Nous remercions également les techniciens du laboratoire de Microbiologie générale qui nous a permis de réaliser cette étude.*

*Enfin, nous adressons nos chaleureux remerciements à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation au sein de l'université de Bejaia et à tous ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre pour réaliser ce travail.*



## ***Dédicaces***

*Je dédie ce travail à*

Mes très chers parents :

Qui ont œuvré pour ma réussite, de par leur amour et leur soutien. En témoignage de tous les sacrifices consentis et de leurs précieux conseils, pour toute leur assistance et leur présence dans ma vie, qu'ils reçoivent à travers ce travail, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mes très chères sœurs Sabrina, Meriem et mon frère Mounir :

Qui n'ont cessé d'être pour moi source de réconfort, d'amour et de générosité.

Mon mari Yacine

Mes amies de proche et de loin et ma chère amie Chahinaz que j'aime énormément.

Ma chère amie et binôme Siham qui a partagé ce travail avec moi.

Ma petite famille de la biologie.

***Yasmina***



## ***Dédicaces***

*Je dédie ce travail*

*Tout d'abord et spécialement à mes parents pour leurs encouragements, tendresse, disponibilité et leurs sacrifices durant toutes mes années d'étude, c'est grâce à eux que je suis arrivée à cette étape de ma vie.*

*Ma chère sœur et mes chers frères  
Et à toute ma grande famille pour leur soutien moral.*

*A mon chér Kheiraddine qui a été à mes côtés durant ce travail et qui m'a vraiment aidé avec ses conseils.*

*Ma chère amie Loubna que j'aime énormément.*

*A tous mes amis (es).*

*A ma chère amie et binôme Yasmina qui a partagé ce travail avec moi.*

*A tous ceux qui nous ont aidé pour réaliser ce travail de près ou de loin.*

***Siham***

*Listes d'abréviations, figures  
et tableaux*

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

**A** : Absorbance

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN16S** : Acide Ribonucléique ribosomique 16 svedlug

**BN** : Bouillon nutritif

**Do** : Densité optique

***E. coli*** : *Escherichia coli*

**EHEC** : enterohémorragic *Escherichia coli*

**EPS** : exopolysaccharides

**GN** : Gélose Nutritive

**GC%** : pourcentage en guanine et cytosine

***Lb.*** : *Lactobacillus*

**LPS** : Lipopolysaccharides

**MRS** : de Man Rogosa et Sharpe

**MATS** : Microbial Adhésion To Solvants

**PBS** : Phosphate Buffered Saline

***S. aureus*** : *Staphylococcus aureus*

**UFC** : Unité formant colonies

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 01 :</b>	Les différents tests utilisés pour la recherche de l'activité antibactérienne .....	14
<b>Figure 02 :</b>	Téchnique d'adhésion sur microplaque de polystyrène .....	16
<b>Figure 03 :</b>	Aspect macroscopique des souches lactiques .....	19
<b>Figure 04 :</b>	Hydrophobicité des souches de bactéries lactiques et pathogènes .....	23
<b>Figure 05 :</b>	Capacité d'adhésion des bactéries lactiques et bactéries pathogènes sur les cuves en plastiques .....	24
<b>Figure 06 :</b>	Capacité d'adhésion des souches pathogènes et des souches de bactéries lactiques sur les microplaques en polystyrène .....	25
<b>Figure 08 :</b>	Résultats de l'inhibition de l'adhésion de <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> par les surnageants de culture de <i>Lactobacillus</i> 8LB et <i>Lactobacillus plantarum</i> sur les microplaques .....	27

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau I :</b>	Origine des souches utilisées.....	11
<b>Tableau II :</b>	Antibiogramme des souches de <i>Lactobacillus plantarum</i> et <i>Lactobacillus</i> 8LB .....	20
<b>Tableau III :</b>	Diamètres des zones d'inhibition obtenues avec le test des spots .....	20
<b>Tableau IV :</b>	Diamètres des zones d'inhibition obtenues avec le test des puits .....	21

# Sommaire

---

Introduction générale.....	01
Chapitre 01 : Synthèse bibliographique	
I. Les bactéries lactiques.....	02
I.1. Généralités .....	02
I.2. Habitat .....	02
I.3. Classification.....	02
I.4. Activité antimicrobienne .....	03
I.4.1. Acides organiques .....	04
I.4.2. Diacétyl et d'autres produits .....	04
I.4.3. Dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> ).....	04
I.4.4. Peroxyde d'hydrogène .....	04
I.4.5. Bactériocines.....	05
I.4.6. Production d'antibiotiques .....	05
II. Adhésion bactérienne.....	05
II.1. Facteurs influençant l'adhésion .....	06
II.1.1. Propriété de surface bactérienne.....	06
II.1.2. Facteurs environnementaux .....	07
II.1.3. Propriétés de supports.....	08
II.1.4. Le film de conditionnement.....	08
II.2. Adhésion aux cellules épithéliales .....	08
III. Activité antiadhésive .....	09

## Sommaire

---

III.1. Bactériocines .....	09
III.2. Biosurfactants .....	09
III.3. Exopolysaccharides .....	10

### Chapitre 02 : Matériels et méthodes

I. Origines des souches.....	11
II. Revivification et vérification de la pureté des souches.....	11
II.1. Revivification .....	11
II.2. Vérification de la pureté .....	11
II.2.1. Examen macroscopique.....	11
II.2.2. Examen microscopique.....	12
II.2.3. Test de catalase .....	12
III. Test d'antibiogramme.....	12
IV. Détermination de l'activité antimicrobienne.....	12
IV.1. Test des spots .....	12
IV.2. Test des puits.....	13
IV.2.1. Cas du surnageant natif .....	13
IV.2.2. Cas du surnagent neutralisé.....	14
V. Détermination de l'hydrophobicité de la surface bactérienne.....	15
VI. Test d'adhésion .....	15
VI.1. Adhésion sur microplaque en polystyrène et cuves en plastiques .....	15
VII. Test d'anti-adhésion.....	17
VII.1. Sur les microplaques.....	17

# Sommaire

---

## Chapitre 03 : Résultats et discussion

I. Revivification des souches .....	19
II. Vérification de la pureté .....	19
II.1. Examen macroscopique .....	19
II.2. Examen microscopique.....	19
II.3. Test de catalase .....	19
III. Test d'antibiogramme.....	20
IV. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques .....	20
IV.1. Test des spots .....	20
IV.2. Test des puits .....	21
V. Test d'hydrophobicité.....	23
VI. Test d'adhésion.....	24
VI.1. Adhésion sur les cuves en plastiques .....	24
VI.2. Adhésion sur les microplaques en polystyrène .....	25
VII. Etude de pouvoir antiadhésif des souches lactiques à l'égard des souches pathogènes.....	27
VII.1. Sur les microplaques en polystyrènes.....	27
Conclusion et perspectives .....	28
Références bibliographique	
Annexes	
Résumé	

# *Introduction générale*

Les bactéries lactiques sont des microorganismes très utiles pour l'Homme, et bénéficient de ce fait d'un statut bien particulier en tant que bactéries dites GRAS (Generally Recognized As Safe) (**Klaenhammer et al., 2005**). Elles ont principalement un rôle dans la fermentation des matières premières animales et végétales et occupent des niches écologiques extrêmement variées. (**Fernanda et al., 2010**).

Les lactobacilles sont des bactéries lactiques qui produisent par fermentation de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme énergétique. Ils sont représentatifs du microbiote intestinal bénéfique de l'Homme et par conséquent sont les microorganismes les plus en vue en tant que probiotiques (**Kesarcodi - Watson et al., 2008**). Les probiotiques sont définis comme « des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantités adéquates, confèrent des effets bénéfiques pour l'hôte » (FAO/OMS 2001).

Les scientifiques s'intéressent à l'utilisation de nouveaux agents antimicrobiens dans le traitement des maladies infectieuses, notamment des infections de système entérique. Les bactéries lactiques ont le potentiel de produire des composés antimicrobiens qui inhibent et contrôlent les bactéries pathogènes (**Dortu et al., 2009**).

Il existe des études qui ont montré que certains probiotiques peuvent inhiber les infections gastro-intestinales en bloquant l'adhérence des agents pathogènes aux cellules de l'épithélium intestinal (**Bernet et al., 1994**).

Afin d'éradiquer et/ou d'inhiber la formation des biofilms indésirables, les chercheurs ont opté pour de nouvelles approches telle que la recherche de molécules capables de bloquer la synthèse de la matrice, car elle constitue l'armure de la protection des micro-organismes. D'autres cherchent à développer des surfaces anti-biofilms par recouvrement des surfaces des matériaux avec des substances antimicrobiennes (**Dat et al., 2012**).

L'objectif de notre travail est de déterminer l'activité antiadhésive de souches de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*, vis-à-vis de deux souches pathogènes, une appartenant à *Escherichia coli* et l'autre à *Staphylococcus aureus*.

Cette étude est structurée en deux parties :

Une partie bibliographique comportant la définition, les caractéristiques, et les propriétés antiadhésives des bactéries lactiques.

Une partie pratique où nous avons exposé la méthodologie et les résultats obtenus étayés par une discussion.

***Chapitre 01:***

***Synthèse bibliographique***

### I. Les bactéries lactiques

#### I.1. Généralités

Le concept de bactérie lactique en tant que groupe de microorganismes, est développé au début des années 1900. En 1873 Joseph Lister a isolé la première culture bactérienne pure de *Bacterium lactis* maintenant connue sous le nom de *Lactococcus lactis* (**Azcarate-Peril et al., 2005**).

Les bactéries lactiques sont définies, historiquement, comme une famille de microorganismes omniprésents et hétérogènes (**Brooijmans et al., 2009**). Elles sont des chimioorganohétérotrophes, à Gram positif, de forme bacille, coccobacille ou cocci, ne produisent pas de catalase et de nitrate réductase. Ces bactéries sont asporulées, généralement non mobiles, anaérobies mais aérotolérantes, dépourvues de cytochrome-oxydase, et exigeantes en facteurs de croissances. En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni dihydrogène sulfureux (**Hogg, 2005 ; Dellaglio et al., 1994**).

Ces bactéries peuvent avoir un métabolisme homofermentaire (acide lactique supérieur à 95%) ou hétérofermentaire (produisant de l'acide acétique, de l'éthanol et du dioxyde de carbone en plus de l'acide lactique) (**Leveau et Bouix, 1993**).

#### I.2. Habitat

Les bactéries lactiques sont ubiquitaires, généralement, associées à un habitat riche en nutriments, tels que divers produits alimentaires (lait et ses dérivés) (**Cocolin et Ercolini, 2008**), les yaourts (**Zourari et al., 1992**), les viandes, et les poissons et les matières végétales (plantes, fruits). Elles peuvent être trouvées dans le sol, l'eau, le fumier, les eaux usées, et l'ensilage. Quelques espèces sont des habitants de la cavité buccale, de tractus intestinal et génital humain et animal, et peuvent avoir une influence bénéfique dans ces écosystèmes (**Holzappel et al., 2001**).

#### I.3. Classification

Depuis la description du *Bacterium lactis*, la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. D'après **Ludwig et al. (2008)**, ce groupe appartient au phylum des Firmicutes qui comprend trois classes : *Bacillus*, *Clostridium* et *Erysipelotrichs*. Les bactéries lactiques appartiennent à la classe des *Bacilli*, qui regroupe trois familles :

- Famille des *Lactobacillaceae* comportant les genres *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.
- Famille des *Leuconostocaceae* contenant les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- Famille des *Streptococcaceae* comprenant les genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dernières années. La première classification des bactéries lactiques a été établie par **Orla- Jencen (1919)** est fondait sur les propriétés phénotypiques : caractéristiques morphologiques et physiologiques, ainsi il les a classé en 4 genres : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. Les méthodes phénotypiques se sont ensuite étendues à la composition de la paroi, le type d'acides gras cellulaires, le type de quinones (accepteur d'électrons) et les caractéristiques moléculaires comme le pourcentage de GC de l'ADN, hybridation ADN – ADN, la structure et le séquençage des ARN16S. Cela a entraîné des changements notables dans la classification (**Schleifer, 1987**).

La classification actuelle fait apparaitre des nouveaux genres, les principaux se sont ceux associés aux aliments dont on cite : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* (**Axelsson, 2004**). Le genre *Lactobacillus* est parmi les plus importants des genres des bactéries lactiques et le plus large avec plus de 200 espèces reconnues. IL est découvert pour la première fois, par Beijerinck en 1901 (**Corrieu et Luquet, 2008**). Plusieurs espèces de *Lactobacillus* sont essentielles dans la production d'aliments fermentés, en outre, certaines souches d'origine humaine sont exploitées en tant que probiotiques (**Goh et al., 2009**). Ce genre comprend un nombre élevé des espèces GRAS (généralement reconnues comme sûres) (**Klaenhammer et al., 2005**).

#### I.4. Activité antimicrobienne

Ce sont essentiellement les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* et *Bifidobacterium* qui sont connus possédant de telles activités grâce à leur capacité à produire, lors de leur croissance, des composés actifs :

### I.4.1. Acides organiques

Parmi lesquels, l'acide lactique et l'acide acétique causent la diminution du pH qui induit une acidification du cytoplasme cellulaire ; en conséquence les flores acido-sensibles sont inhibées (**Annika et Marc, 2004**).

Au niveau de la bactérie cible, les premières structures touchées par l'acidification du milieu extracellulaire sont évidemment les macromolécules de surface (flagelle, pili, récepteur chimique, protéines périplasmiques, paroi). Ces bactéries ont peu de possibilités de protéger ces structures : soit elles modifient la structure des sites de fixation des composés acides au niveau de leurs membranes, soit elles évitent la perte de mobilité suite au stress acide en modulant ou en utilisant une voie métabolique alternative (**Metzner et al., 2004**). La baisse du pH intracellulaire provoquée par cet afflux de protons, entraîne des perturbations de flux métabolique et des dommages au niveau des macromolécules de surface (**Foster, 1999**) et favorisent aussi l'oxydation des lipides, modifiant ainsi leur état d'ionisation et leurs propriétés d'interaction avec les autres constituants cellulaires (**Cotter et al., 2003**).

### I.4.2. Diacétyl et d'autres produits

Le diacétyl est l'un des composants aromatiques essentiels du beurre synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*, il est produit suite à la dégradation du citrate, un composé inhibiteur à pH 5, plus actif contre les bactéries à Gram négatif, les levures et les champignons que contre les bactéries à Gram positif non lactiques (**Jay, 1982 ; Smaoui, 2010**).

### I.4.3. Dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>)

Il est principalement produit par des bactéries hétérofermentaires. Il peut jouer un rôle dans la création d'un environnement anaérobie qui peut inhiber les microorganismes aérobies. L'accumulation de CO<sub>2</sub> dans la bicouche lipidique de la membrane peut provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (**Dortu et Thonart., 2009**).

### I.4.4. Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est, depuis longtemps, reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier les lactobacilles. Ces dernières sont, généralement, catalases négatives mais certaines souches peuvent accumuler du

peroxyde d'hydrogène lorsqu'elles sont cultivées en aérobiose ou en microaérobiose (Juillard et al., 1987). L'effet antimicrobien du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut résulter de l'oxydation, entraînant la dénaturation d'un nombre d'enzymes, et de la peroxydation des lipides membranaires, donc l'augmentation de la perméabilité membranaire (Kong et Dvison, 1980). Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut également servir de précurseur à la production des radicaux libres bactéricides tels que le seperoxyde et hydroxyde, radicaux pouvant endommager l'ADN (Byczkowski et Gessner, 1988).

### I.4.5. Bactériocines

Les bactériocines sont des groupes hétérogènes de molécules de nature protéique produites par synthèse ribosomique, dotées d'un site actif et qui ont un pouvoir antimicrobien. Elles peuvent avoir une activité bactéricide ou bactériostatique contre les souches bactériennes phylogénétiquement proches à la souche productrice (Piard et Desmzeaud, 1991 ; Muriana et Klaenhammer, 1991 ; Tomomi et al., 2009).

Les bactériocines présentent des modes d'action similaires. Elles forment un pore dans la membrane cytoplasmique de la cellule cible, occasionnant une perméabilité de celle-ci et donc une dissipation de la force proton motrice, entraînant la mort cellulaire (Bauer et al., 2005). D'autres bactériocines ne forment pas de pores mais interfèrent avec l'activité d'enzymes des bactéries cibles (Diep et al., 2007).

### I.4.6. Production d'antibiotiques

Il existe aussi des antibactériens non peptidiques, parmi lesquels la reuterine produite par *Lactobacillus reuteri* : un antibiotique à large spectre, actif sur des bactéries Gram positives et Gram-négatives, des levures, des moisissures et des protozoaires. Il s'agit d'un dérivé du glycérol, le 3-hydroxypropionaldéhyde produit lors de la fermentation anaérobie de ce dernier (Piard et Desmazeaud, 1991).

## II. Adhésion bactérienne

L'adhésion des microorganismes, à une surface, est un processus complexe qui est affecté par les interactions physico-chimiques des surfaces de ces derniers et de contacte (Kachouri et al., 2016). Elle est généralement divisée en deux phases (Vallet et al., 2001) :

- Une adhésion réversible indépendante du temps, dans laquelle les bactéries adhèrent à la surface des supports par des liaisons physicochimique : (1) les forces d'attraction

de Van der Waals, (2) les forces électrostatiques, (3) les interactions hydrophobes pouvant conduire à une attraction ou à une répulsion, (4) les interactions stériques qui sont toujours répulsives.

- Une adhésion irréversible, dépendante du temps et faisant appel à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries permettant de renforcer leur fixation au support.

### II.1. Facteurs influençant l'adhésion

En plus du rôle actif que jouent les cellules bactériennes dans l'adhésion, les propriétés du fluide suspensé (pH, force ionique, température, nutriments) et la nature de la surface réceptrice sont également déterminantes dans les processus physico-chimiques et biologiques de ce phénomène (**Briandet et al., 2012**).

#### II.1.1. Propriétés de surface bactérienne

La charge et l'hydrophobicité de la surface des cellules, influencent l'adhésion. Ces deux propriétés varient suivant les espèces bactériennes et selon les souches d'une même espèce. Elles sont influencées par le milieu environnant, l'âge de la bactérie, ainsi que par sa structure (**Dankert, 1986 ; Krekeler et al., 1989**).

L'hydrophobicité de la surface des cellules bactériennes est l'un des facteurs les plus importants qui déterminent l'adhérence car les interactions hydrophobes ont tendance à s'amplifier avec l'augmentation de la nature non polaire de l'un ou des deux surfaces impliquées (**Donlan, 2002**). Habituellement, les bactéries hydrophobes préfèrent des surfaces hydrophobes et les bactéries hydrophiles, les surfaces hydrophiles (**Hogt et al., 1983; Satou et al., 1988**).

Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface. Ces structures varient selon le type de micro-organisme concerné :

- **Bactéries Gram-** : dont la structure est plus complexe, leur paroi est constituée d'une couche de faible épaisseur de peptidoglycane entourée d'une membrane externe formée d'une double couche de phospholipides dans laquelle des protéines sont ancrées. Le feuillet externe contient des lipopolysaccharides (**Coulibaly, 2010**).
- **Bactéries Gram+** : caractérisées par une paroi renfermant une épaisse couche de peptidoglycane, et dans laquelle différentes structures sont greffées tels que les acides teichoïques, acide lipoteichoïque, polysides et les protéines (**Delcour et al., 1999**).

- **Curli** : sont des fibres protéiques extracellulaires produites par des bactéries de la famille des Enterobacteriaceae (**Zogaj et al., 2003**). Les curli ont un rôle dans l'adhésion et la colonisation de surface inertes (acier, verre, polypropylène) et la formation de biofilm chez *E. coli* (**Vidal et al., 1998 ; Carter et al., 2016**).
- **Fimbriae, ou pili** : Les pili ou fimbriae sont des appendices extracellulaires plus minces et plus petits que les flagelles. Ils sont constitués de piline (protéine) et sont ancrés dans la membrane cytoplasmique. Ils sont également impliqués dans les mécanismes d'adhésion bactérienne. La majorité de fimbriae examinés contenaient une forte proportion de résidus d'acides aminés hydrophobes, et jouent un rôle dans l'hydrophobicité. Deux types de pili sont, à ce jour, décrits, les pili communs qui ont un rôle dans l'adhésion des bactéries (**Neu et al., 1996**).
- **Flagelles** : Ce sont des structures semi-rigides ancrées à la surface membranaire et permettant la mobilité chez certaines bactéries, jouent un rôle important dans l'interaction initiale avec la surface à coloniser en donnant l'énergie nécessaire pour passer outre les forces de répulsion (**Parte et al., 1998**). La disposition des flagelles peut être polaire (à une extrémité), amphitriche (aux deux extrémités) ou péritriche (tout autour de la bactérie). Les bactéries à flagellation polaire et amphitriche peuvent encore se subdiviser en bactéries monotriches (un seul flagelle à chaque point d'ancrage) et en bactéries lophotriches (**Oliveira et al., 1992**). Cependant elles n'ont pas de rôle dans l'adhésion puisque il y a des bactéries ne possèdent pas de flagelle alors quelle sont capables de former des biofilms par d'autres structures.

### II.1.2. Facteurs environnementaux

Le pH, la température, et la force ionique du milieu, ont une répercussion importante sur les propriétés de surface et / ou sur l'expression de structures extracellulaires des bactéries, donc sur l'adhésion aux supports.

Le pH du milieu conditionne la densité de charge des surfaces. La plupart des bactéries ont un point isoélectrique inférieur à 7, ce qui conduit à une charge globale négative à des pH neutres (**Lytle et al., 2004**). **Gaboriaud et al. (2006)** ont mis en évidence que l'accroissement du pH du milieu entraîne une augmentation des forces de répulsion associée à une augmentation de l'hydratation de l'enveloppe bactérienne.

### II.1. 3. Propriétés de supports

Certaines surfaces sont hydrophiles tel le verre sur lequel les gouttes d'eau s'étalent. D'autres en revanche sont hydrophobes comme le fond des poêles en téflon. Ces surfaces hydrophobes ont moins de possibilités d'interactions avec les bactéries. Il existe même des surfaces super-hydrophobes. Au niveau de la topographie, l'observation de matériaux contaminés au microscope permet de mettre en évidence que chaque rayure, chaque anfractuosité, chaque irrégularité sur une surface devient une zone privilégiée de colonisation microbienne (**Briandet et al., 2012**).

### II.1.4. Le film de conditionnement

Il constitue une base sur lesquelles les microorganismes poussent, par ce qu'il augmente la capacité de ces dernières à se fixer à une surface (**Branger, 2007**). Cependant la présence préalable de films protéiques comme le sang, les larmes, l'urine ...etc influencent l'attachement de bactéries à cette surface, et favorise la formation de biofilm (**Bellifa, 2014**).

### II.2. Adhésion aux cellules épithéliales

La capacité à adhérer aux épithéliums intestinaux est une propriété probiotique cruciale puisque la rétention de bactéries dans le grand intestin est importante pour la fonction probiotique. L'adhésion a été étudiée avec lignes cellulaires d'origine colique ou intestinale (Caco-2 et HT 29) humaine (**Pramod et al., 2000**).

La propriété d'adhésion aux cellules épithéliales est déterminée par la présence de structures adhésives localisées à la surface bactérienne. Au niveau de l'intestin sain, la cellule épithéliale permet de maintenir un état de tolérance vis-à-vis de la flore commensale. La reconnaissance des microorganismes du microbiote par les cellules épithéliales, est indispensable pour assurer l'homéostasie de la barrière intestinale et sa protection contre les agressions (**Macdonald et al., 2011**).

Les microorganismes saprophytes ou pathogènes sont capables de se fixer aux mucines sur des sites spécifiques au niveau de leurs chaînes glycaniques. Ainsi par un effet de compétition, le mucus jouerait un rôle dans la protection de la muqueuse intestinale envers les micro-organismes pathogènes (**Sudha et al., 2001**).

### III. Activité antiadhésive

Les bactéries lactiques sont caractérisées par des propriétés antiadhésives relatives à la production de certains métabolites tels que les bactériocines, les bio-surfactants et les polysaccharides.

#### III.1. Bactériocines

L'application de cultures de bactéries lactiques, ou de leurs surnageant ou quelques métabolites comme les bactériocines pouvait prévenir l'adhésion de microorganismes sur des surfaces abiotiques (Maldonadol *et al.*, 2007; Guerrieri *et al.*, 2009).

En effet, l'adsorption de bactériocines telle que la nisine sur des surfaces solides pouvait inhiber les premières étapes de l'adhésion bactérienne (Boweret *et al.*, 1998).

Zhao *et al.* (2004) ont également rapporté que l'application de bactéries lactiques productrices de bactériocines pouvait contrôler la croissance d'agents pathogènes au sein d'un biofilm.

#### III.2. Bio-surfactants

Les bio-surfactants ont été définis comme des molécules amphiphiles produites par des microorganismes. Ce sont principalement des glycolipides ou des lipoprotéines agissant grâce à leurs propriétés amphiphiles sur les tensions de surface aux interfaces. Différents rôles Physiologiques sont attribués aux bio-surfactants comme la stimulation de la croissance sur substrats organiques (adhésion aux substrats organiques ou émulsification des sources carbonées hydrophobes), participation à l'adhésion des bactéries productrices et création d'une barrière compétitive vis-à-vis de l'adhésion des agents pathogènes (Lepargneur et Rousseau, 2002).

En effet, les bio-surfactants sont impliqués dans des phénomènes de désorption et d'anti-adhésion. La première description des bio-surfactants a été relative à *Streptococcus mitis* qui secrète un bio-surfactant capable d'empêcher l'adhésion de *Streptococcus mutans*. Depuis, de nombreux autres dérivés ont été décrits chez les bactéries. La surlactine produite par *Lb. acidophilus* et *Lb. fermentum* fut capable d'inhiber l'adhésion initiale d'*Enterococcus faecalis*, *E. coli* et de *Candida albicans* (Lepargneur et Rousseau, 2002).

Les biosurfactants entraînent des modifications de surface conduisant à l'inhibition de la formation de biofilms. C'est le cas de celui produit par *Streptococcus thermophilus* qui provoque une réduction des taux de colonisation de matériel médical par les agents

pathogènes *Rothiadentocariosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. salivarius* (**Rodrigus et al., 2006**).

### III.3. Exopolysaccharides

Les exopolysaccharides font partie des métabolites primaires produits par les bactéries lactiques. Parmi ceux-ci, on peut distinguer les polysaccharides extracellulaires, qui ne restent pas liés à la cellule mais qui sont excrétés dans le milieu et les polysaccharides constitutifs d'une capsule épaisse ou d'une pellicule autour de la paroi bactérienne (**Cerning et al., 1992**).

Une étude a révélé que des exopolysaccharides extraits à partir d'un lait fermenté commercialisé "villi" étaient capables d'inhiber l'adhésion de nombreuses souches entéro-pathogènes (**Ruas-Madiedo et al., 2006**).

Dans une autre étude, des exopolysaccharides produits par *Lb. acidophilus* A4 pouvaient réduire la formation d'un biofilm formé par EHEC de 87% sur microplaques en polystyrène, et ceci en affectant les gènes liés à la production de curli (**Kim et al., 2009**).

***Chapitre 02:***

***Materiel et methodes***

L'objectif de cette étude est de déterminer les propriétés antiadhésives de deux souches de bactéries lactiques contre les souches d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, et également de déterminer si l'adhérence sur support solide (microplaques en polystyrènes ou cuves en plastiques) peuvent être réduite par les deux souches bénéfiques.

### I. Origines des souches

Les souches utilisées dans cette étude sont deux souches de bactéries lactiques et deux souches de bactéries pathogènes (*Escherichia coli* et *staphylococcus aureus*). Le **tableau I** présente l'origine d'isolement des différentes souches.

**Tableau I** : Origine des souches utilisées

Souche	Origine
<i>Lactobacillus</i> 8LB	Lait fermenté
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lait de chèvre
<i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i>	Selles d'enfants malades

### II. Revivification et vérification de la pureté des souches

#### II.1. Revivification

Un transfert d'un millilitre de culture des souches lactiques déjà conservés à 4°C dans des tubes de 9ml du bouillon MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) est réalisé, puis incubé à 30°C/48h.

#### II.2. Vérification de la pureté

Un repiquage à partir des cultures bactériennes de 24h sont effectués sur gélose MRS, suivi d'une incubation à 30°C/48h, jusqu' à l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes. La pureté des souches a été vérifiée par une observation macroscopique, microscopique et un test de recherche de catalase.

##### II.2.1. Examen macroscopique

Il est basé sur l'observation de l'aspect des colonies, obtenues après isolement sur gélose MRS, pour caractériser la taille, la forme et la couleur de ces dernières.

### II.2.2. Examen microscopique

Il a été effectué sur un frottis coloré avec la coloration de Gram, préparé à partir des colonies d'une culture de 48h, afin de déterminer leur morphologie, mode de regroupement et type de Gram.

### II.2.3. Test de catalase

Pour mettre en évidence cette enzyme, on a déposé une colonie bactérienne de 48h, dans une goutte d'eau oxygénée (10 V), sur une lame stérile. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de catalase (Delarras, 2007).

## III. Test d'antibiogramme

La résistance aux antibiotiques des bactéries lactiques a été évaluée par la méthode de diffusion en utilisant des disques selon Charteris *et al.* (1998). Les bactéries lactiques ont été testées vis-à-vis de trois antibiotiques (vancomycine, pénicilline et oxacilline).

Pour réaliser ce test, les souches (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus* 8LB) ont été ensemencées dans du bouillon MRS et incubées pendant 24h à 30°C. Après l'incubation, des ensemencements à partir de la suspension bactérienne de 10<sup>8</sup> UFC/ ml de ces souches ont été réalisés, sur gélose MRS par écouvillon, les boîtes ont été laissées sécher, puis chaque boîte à reçu les trois disques d'antibiotiques.

Après 24h d'incubation à 30°C, les diamètres des zones d'inhibition autour des disques ont été mesurés et les résultats ont été interprétés selon Charterie *et al.* (1998).

## IV. Détermination de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne, à l'égard des bactéries pathogènes, est un caractère très répandu chez certaines bactéries lactiques. Pour confirmer la capacité des souches utilisées, à exercer cet effet, des tests ont été réalisés.

### IV.1. Test des spots

Après avoir coulées les boîtes de Pétri avec la gélose MRS, un volume de 5µl d'une culture fraîche de chaque souche lactique de 10<sup>8</sup>UFC/ml, obtenue après 24h d'incubation à 30°C, est déposé en spots. Ces boîtes ont été laissées pendant quelques minutes à température ambiante, pour permettre leur séchage, puis incubées à 30°C/ 24h.

Par la suite, la gélose MRS est recouvertes par 10ml d'une gélose Muller Hinton, préalablement ensemencée par la souche cible (*E. coli* ou *Staphylococcus aureus*) à  $10^7$  UFC/ml. Puis incubées à 37°C pendant 24h. L'activité antimicrobienne se révéla par l'apparition de zones d'inhibition autour des spots, les diamètres de ces zones seront mesurés (Fleming et al., 1975).

### IV.2. Test des puits

Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant de culture des souches lactiques productrices des substances antimicrobiennes avec les souches pathogènes.

#### IV.2.1. Cas du surnageant natif

Un volume de 20ml de gélose nutritive est coulé dans des boîtes de Pétri stériles. Après solidification, 9ml de gélose Muller-Hinton en surfusion, ensemencé avec 1ml de la suspension de chaque souche cible (*Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli*) de  $10^7$  UFC/ml, ont été coulées sur la surface. Des puits de 0,8cm de diamètre sont ensuite creusés en utilisant des embouts stériles d'une micropipette de 1 ml. Ces puits sont remplis avec 100µl de surnageant natif de la culture des souches lactiques. Les valeurs de pH de ces derniers est de 4,32 pour *Lactobacillus plantarum* et 4,56 pour *Lactobacillus* 8LB. Ils sont obtenus par centrifugation des cultures fraîches (24h) des souches lactiques à 8000 tour/ 10 min à 4°C et filtrés à l'aide d'un filtre seringue stérile (0,22µm).

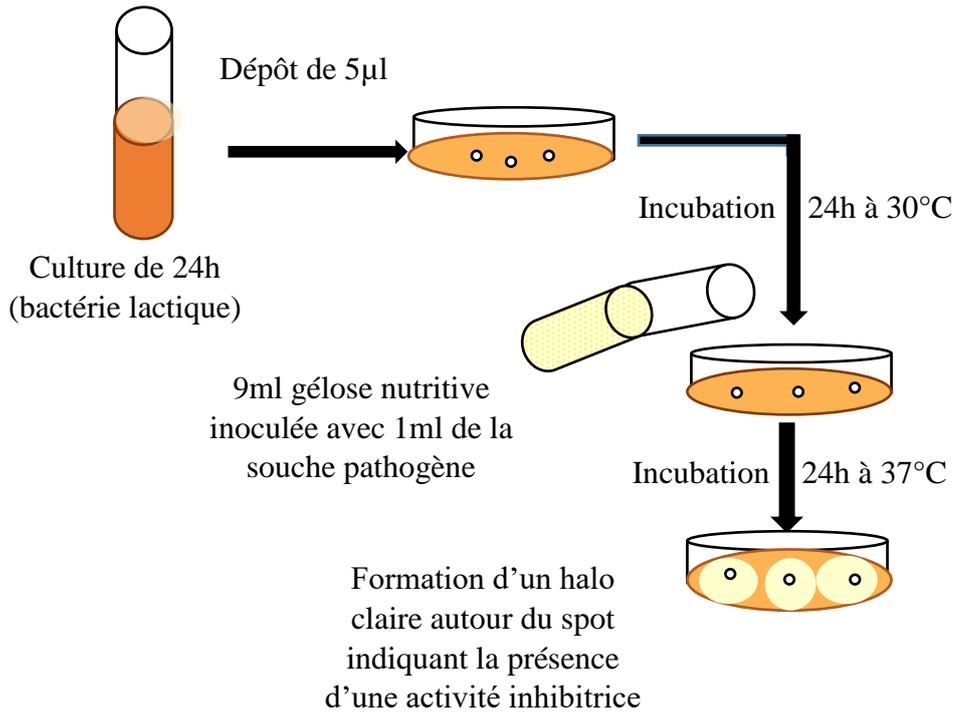
Les boîtes sont laissées, par la suite, à une température de 4°C pendant deux heures pour la diffusion des surnageants, puis incubées à 37°C/24h (Tagg et Mac Given, 1971 ;Bafout et Klaenhammer, 1983 ; EL Mouldé et al., 2008)

L'activité antibactérienne est révélée par l'apparition de zones claires autour des puits. Le diamètre de ces zones est mesuré à l'aide d'une règle.

#### VI.2.2. Cas du surnageant neutralisé

Pour éliminer l'effet de pH, notamment des acides lactiques et acétiques, dans le but de déterminer l'origine de l'activité antibactérienne, le surnageant récupéré après la centrifugation est neutralisé par la soude (NaOH) 1N de façon à obtenir un pH de 6,5 (Dunne et al., 2001 ;Labioui et al., 2005). L'activité est testée par la méthode des puits comme détaillée précédemment.

Test des spots



Test des puits

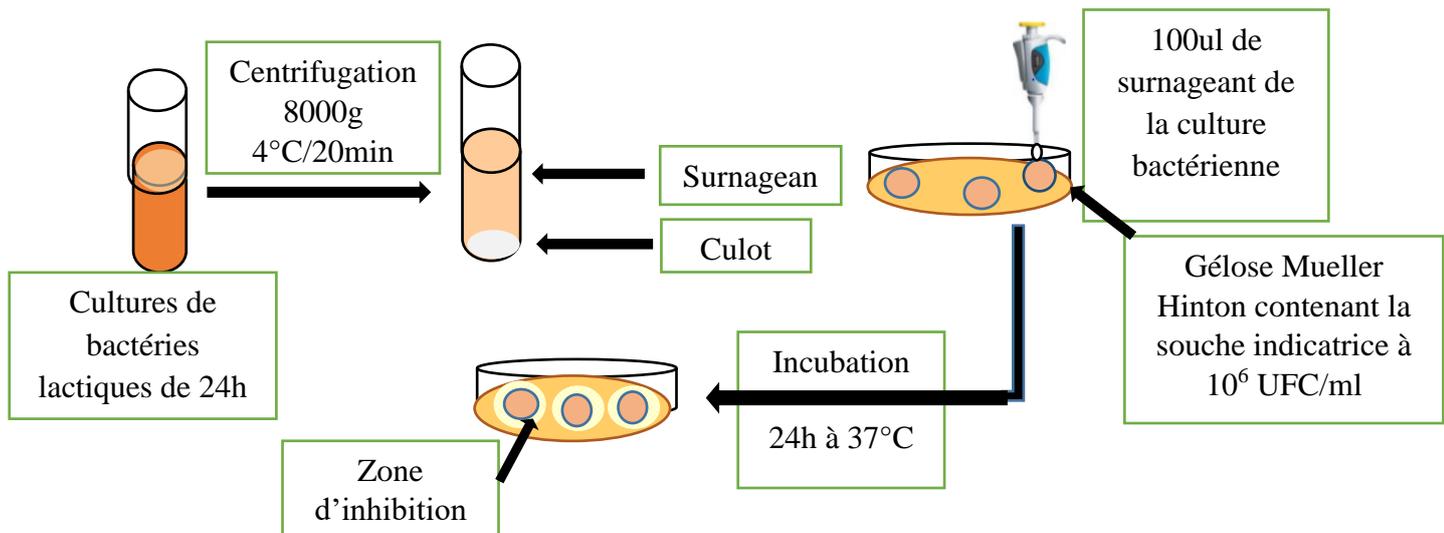


Figure 01 : Les différents tests utilisés pour la recherche de l'activité antibactérienne.

V. Détermination de l'hydrophobicité de la surface bactérienne

L'hydrophobicité des souches lactiques et de bactéries pathogènes est déterminée selon la méthode décrite par Iyer et al. (2010). Les deux souches lactiques (*Lactobacillus* 8LB, *Lactobacillus plantarum*) sont cultivées dans le bouillon MRS puis incubées pendant 24h à 30°C et les deux souches pathogènes (*E. coli* et *S. aureus*) sont cultivées dans le

bouillon nutritif à 37°C pendant 24h. Après incubation, le culot des cultures sont récupérées par centrifugation à froid à 12000rpm/5min suivi de deux lavages successifs avec PBS stérile (pH=7,2) en procédant à deux centrifugations, puis suspendue dans 1,2 ml d'une solution saline tamponnée au phosphate (PBS). La densité optique initiale de la suspension a été ajustée approximativement à 1,0 à 450nm (DO initiale).

Ensuite 0,6ml du xylène a été ajouté doucement à 3ml de la suspension bactérienne, puis incubé à 37°C pendant 10 min. Ce mélange a été agité en utilisant un vortex, pendant 2min. Après avoir laissé le mélange reposer et se séparer pendant 15min, la phase aqueuse est récupérée à l'aide d'une micropipette, pour mesurer à nouveau la densité optique finale (DO finale).

La différence de la densité optique est considérée comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%) calculé par l'équation suivante (**Iyer et al., 2010**) :

$$\% \text{ Hydrophobicité} = (\text{DO initiale} - \text{DO finale} / \text{DO initiale}) \times 100.$$

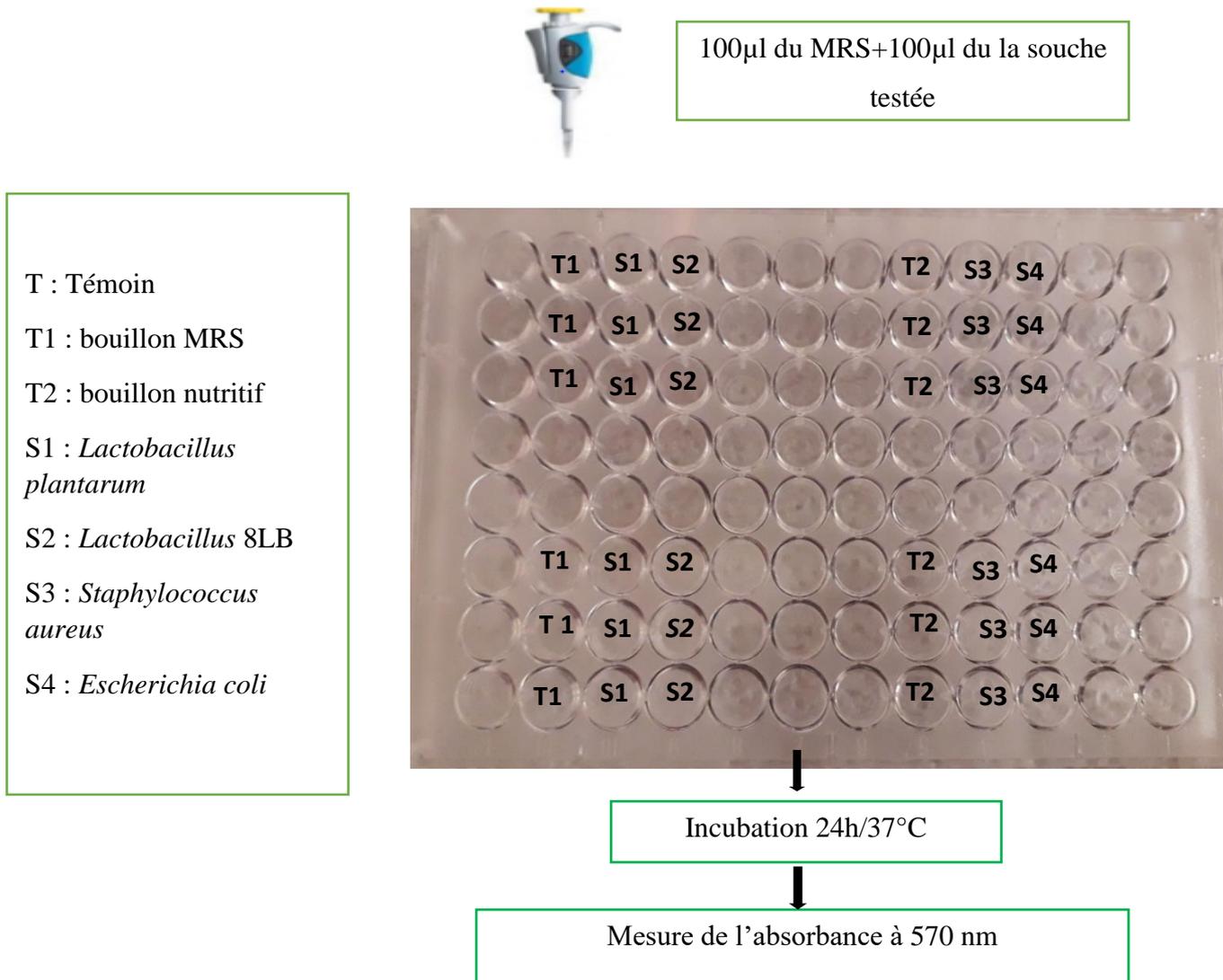
## VI. Test d'adhésion

### VI.1. Adhésion sur microplaque en polystyrène et cuves en plastiques

La capacité d'adhésion des souches lactiques (*Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus* 8LB) et pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) a été déterminée sur une microplaque à 96 puits, en suivant la méthode décrite par **Mahdhi et al. (2010)**. Après la culture des souches lactiques dans le bouillon MRS à 30°C et des souches pathogènes dans le bouillon nutritif à 37°C, pendant 24 heures, nous avons ajusté la densité optique des cultures à 0,3 pour une longueur d'onde de 570nm. Ces cultures ont été diluées à 1/100 dans le bouillon MRS pour les souches lactiques et dans le bouillon nutritif pour les cultures cibles (pathogènes). Un volume de 200µl de chaque suspension a été transféré dans les puits de la microplaque de 96 puits en polystyrène à fond plat.

Chaque souche a été testée trois fois. Le bouillon MRS stérile et le bouillon nutritif a servi de témoin négatif. La plaque a été incubée à 37°C pendant 24h, puis lavée trois fois par une solution de PBS stérile pour éliminer les cellules non adhérentes. Elle est ensuite séchée en position renversée. Les cellules adhérentes sont fixées par l'éthanol à 95%, ensuite colorées par 100 µl d'une solution de cristal violet à 1% pendant 15 min. Le surplus du cristal violet est rejeté et les puits sont lavés trois fois par l'eau distillée stérile. La plaque est à nouveau

séchée. La densité optique de chaque puits a été mesurée à 570 nm. Toutes les étapes sont répétées en utilisant les cuves en plastiques au lieu de la microplaque.



**Figure 02** : Technique d'adhésion sur microplaque de polystyrène.

### VII. Test d'anti-adhésion

Les bactéries lactiques, peuvent produire une variété de composés antimicrobiens, peuvent affecter des bactéries lactiques elle-même, ainsi que des souches indésirables ou pathogènes, en plusieurs mécanismes, dont l'empêchement de leur adhésion.

### VII.1. Sur les microplaques

Les puits des microplaques ont été remplis avec 50µl de bouillon nutritif, inoculé avec 50µl de suspension bactérienne de *E. coli* ou *S. aureus*, et 100µl de surnageant (natif ou neutralisé) déjà obtenu par centrifugation à 8000 g / 10 min à 4°C sont ajoutés à chaque puits, une microplaque est préparée pour chaque souche cible et chaque surnageant de culture est testé en triple. Les puits remplis avec 200µl de bouillon nutritif sont inclus en tant que témoins. Après l'incubation à 37°C/24h, la préparation des microplaques (lavage, coloration et décoloration) ainsi que les lectures ont été réalisées comme décrit précédemment.

## ***Chapitre 03:***

### ***Résultats et discussion***

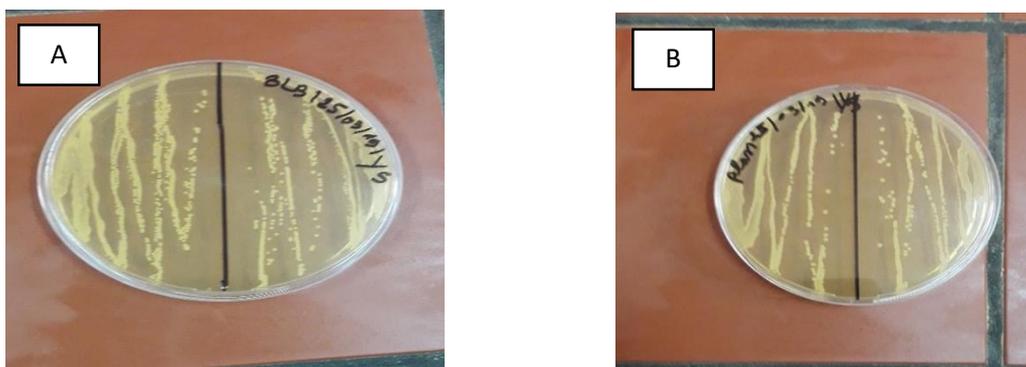
### I. Revivification des souches

Après 48h d'incubation dans bouillon MRS, le résultat obtenue est l'apparition d'un trouble dans les tubes de deux souches lactiques. Ce trouble est lié à une croissance bactérienne et la présence d'un anneau claire au fond de tube indique que les souches utilisées préfèrent des faibles quantités d'oxygène.

### II. Vérification de la pureté

#### II.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique sur milieu solide MRS montre des colonies rondes, lisses, de couleur blanchâtre, d'un contour régulier d'environ 1mm de diamètre (**figure 03**).



**Figure 03** : Aspect macroscopique des souches lactiques, (A) : *Lactobacillus* 8LB,

(B): *Lactobacillus plantarum* sur gélose MRS.

#### II.2. Examen microscopique

L'observation microscopique des souches après une coloration de Gram a montré qu'elles sont de Gram positif et se présentent sous forme de bacilles en chainettes parfois isolées.

#### II.3. Test de catalase

Le test de catalase indique que les deux souches sont de catalase négative, ce qui conforme leurs appartenance aux bactéries lactiques.

### III. Test d'antibiogramme

Afin de vérifier la résistance aux antibiotiques, de bactéries lactiques utilisées, un test d'antibiogramme est réalisé. Et se référant à la recommandation du CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute : la standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, avec collaboration de l'OMS, 2012). Les résultats de ces dernières sont dans le **tableau II**.

**Tableau II :** Antibiogramme des souches de *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus* 8LB.

Antibiotique	<i>Lactobacillus</i> 8LB	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Oxacilline	0 mm	13 mm
Vancomycine	0 mm	0 mm
Pénicilline	34 mm	32 mm

En effet, la souche de *Lactobacillus* 8LB n'a révélée qu'une seule zone d'inhibition qui révèle une très grande sensibilité à la pénicilline (34mm de diamètre). Tandis que, *Lactobacillus plantarum* présenté une sensibilité vis-à-vis de l'oxacilline (13mm de diamètre), la pénicilline (32 mm de diamètre) et une résistance à la vancomycine.

### IV. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques

#### IV.1. Test des spots

Les résultats de ce test ont montré que les deux souches lactiques possèdent une activité antimicrobienne à l'égard des deux souches pathogènes (*E. coli* et *S. aureus*) (**Tableau III**).

**Tableau III :** Diamètres des zones d'inhibition obtenue avec le test des spots.

		Diamètres des zones d'inhibition (mm)	
		<i>Lactobacillus</i> 8LB	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Souche cible	Souche test		
	<i>Escherichia coli</i>	28	20
	<i>Staphylococcus aureus</i>	17	24

L'activité a été évaluée par l'apparition de zones avec un diamètre varie entre 14 à 22mm selon la souche lactique testée et la souche cible. Cependant, la souche *Lactobacillus plantarum* présente un effet inhibiteur vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* supérieur à celui observé avec *Lactobacillus* 8LB.

Les résultats rapportés par **Bouadjaib (2013)** et **Madi (2010)** dans leurs travaux ont révélé que les souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits laitiers ont montré une activité antibactérienne à l'égard de *S. aureus* et *E. coli*.

Selon les travaux de **Labioui et al. (2005)**, les zones d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis d'*Escherichia coli* varient entre 22,5 mm et 31,5 mm, ces résultats sont proches aux nôtres où les diamètres obtenus se situent entre 20 mm et 28 mm. Tandis que **Savadojo et al. (2004)** ont montré à travers leur étude, que les diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques compris entre 9 mm à 10 mm vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, et 8 mm à 9 mm de diamètre vis-à-vis de *Escherichia coli*.

### IV.2. Test des puits

D'après les résultats obtenus précédemment, les souches lactiques utilisées, présente une activité antimicrobienne contre *E. coli* et *S. aureus* avec le test des spots.

Afin de vérifier l'activité des métabolites produits par les souches lactiques, le test des puits a montré que les souches de bactéries lactiques étudiées ont la capacité d'inhiber la croissance de *S. aureus* et *E. coli* (**Tableau IV**).

**Tableau IV** : Diamètres des zones d'inhibition obtenues avec le test des puits.

	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
	Surnageant natif		Surnageant neutralisé	
	<i>Lactobacillus</i> 8LB	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i>	<i>Lactobacillus</i> 8LB	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i>
Souche pathogène				
<i>E. coli</i>	22	14	10	8
<i>S. aureus</i>	7	7	9	12

- **Cas du surnageant natif**

À l'égard d'*Escherichia coli* : l'inhibition est considérée positive lorsqu'elle est supérieure à 2 mm selon **Schilinger et Lucke (1989)**.

D'après cette étude, les diamètres des zones d'inhibition révèlent une bonne activité antimicrobienne de *Lactobacillus* 8LB (22 mm) suivi par *Lactobacillus plantarum* (14 mm).

À l'égard de *Staphylococcus aureus* : Les deux bactéries lactiques étudiées présentent les mêmes diamètres des zones d'inhibition (7 mm) vis-à-vis de *S. aureus*.

**Allouche et al. (2010)** ont démontré que six souches de *Lactobacillus* isolés du lait cru produisent des substances antimicrobiennes capables d'inhiber la croissance de *S. aureus* et *E. coli*.

- **Cas de surnageant neutralisé**

À l'égard d'*Escherichia coli* : Après l'ajustement de pH à 6,5, les diamètres des zones d'inhibition observés en utilisant les surnageants neutralisés de *Lactobacillus* 8LB et *Lactobacillus plantarum* étaient de 10 à 8 mm respectivement. L'activité antibactérienne a diminué significativement par rapport aux résultats obtenus par les surnageant natifs. Cela est probablement dû à l'élimination du pouvoir acidifiant de ces souches, ce qui indique la présence d'autres substances antimicrobiennes.

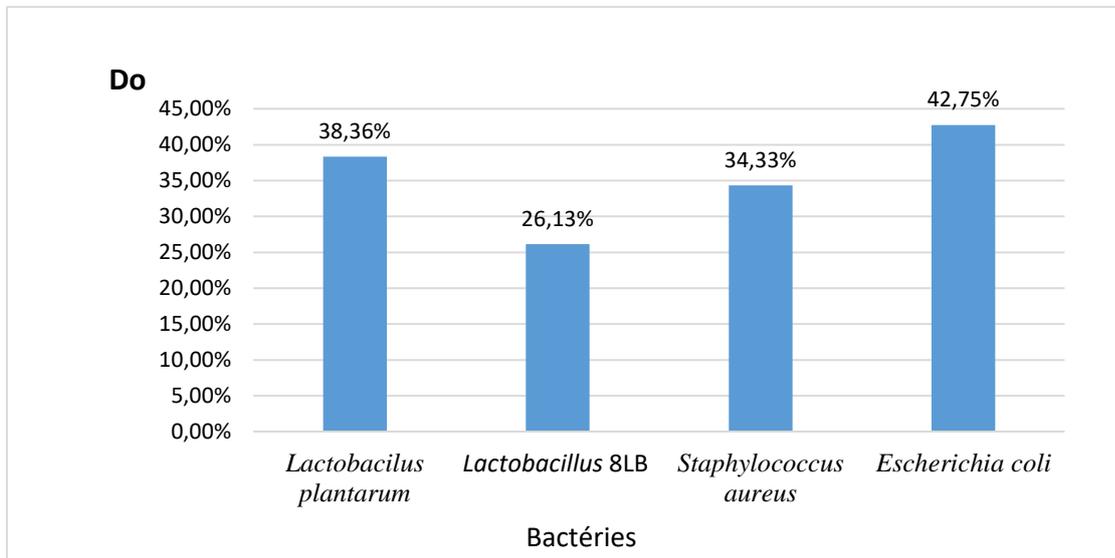
À l'égard de *Staphylococcus aureus* : D'après les résultats obtenus, en utilisant les surnageants neutralisés de *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus* 8LB, les diamètres des zones d'inhibition sont supérieur, à ceux observés en utilisant les surnageant natifs. L'élimination de l'effet des acides organiques, favorisent plutôt l'activité d'autres substances antimicrobiennes (**Song et Rechar, 1997**).

Les résultats obtenus sont en accord avec **Mami et al. (2010)** qui ont démontré la capacité de *Lactobacillus plantarum* à inhiber *S. aureus*.

En comparant aux résultats obtenus par le test des puits, l'activité antimicrobienne est mieux exprimée dans le test des spots, que en utilisant les surnageants de cultures bactériennes, comme rapporté par **Ammor et al. (2006)** qui est peut-être dû à la compétition aux nutriments.

## V. Test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité de la surface cellulaire des bactéries a été déterminée par l'affinité de ces derniers au xylène. Les pourcentages d'hydrophobicité des souches lactiques et pathogènes utilisées sont présentés dans la **figure 04**.



**Figure 04 :** Hydrophobicité des souches de bactéries lactiques et pathogènes.

Les bactéries sont hydrophobes si le pourcentage d'affinité au xylène est élevé ( $A\% > 40$ ) (Anwar *et al.*, 2013), et considéré hydrophile si elle est faible ( $A\% < 20$ ) (Bellifa, 2014).

Les résultats obtenus montrent que les bactéries lactiques testées, *Lactobacillus 8LB* et *Lactobacillus plantarum* sont moyennement hydrophobes avec des valeurs de 26,13 et 38,36%. Anwar *et al.* (2013) ont testé l'hydrophobicité pour six souches de lactobacillus (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus plantarum*), et les pourcentages obtenus varient entre 29,5% et 29,5%.

La souche *S. aureus*, présente une valeur d'hydrophobicité de 34,33%, tandis que la souche *E. coli*, est fortement hydrophobe et présente une valeur de 42,75%. Ces résultats, sont en accord avec ceux révélés par Ait Meddour (2015), pour les souches *E. coli* ATCC 25922 (43,76%) et *S. aureus* ATCC 25923 (30,83%).

L'hydrophobicité de la cellule est due à des composés liés à la membrane externe comprenant des lipopolysaccharides, des lipoprotéines, des acides lipothéchoïques et des lipomannanes. L'orientation de ces composés sur la membrane externe détermine l'hydrophobicité de la cellule (Neu, 1996). Pelletier *et al.* (1997) ont rapporté que le caractère

hydrophobe des bactéries est dû à la présence de substances protéiques à la surface cellulaire, tandis que le caractère hydrophile est lié à la présence de polysaccharide.

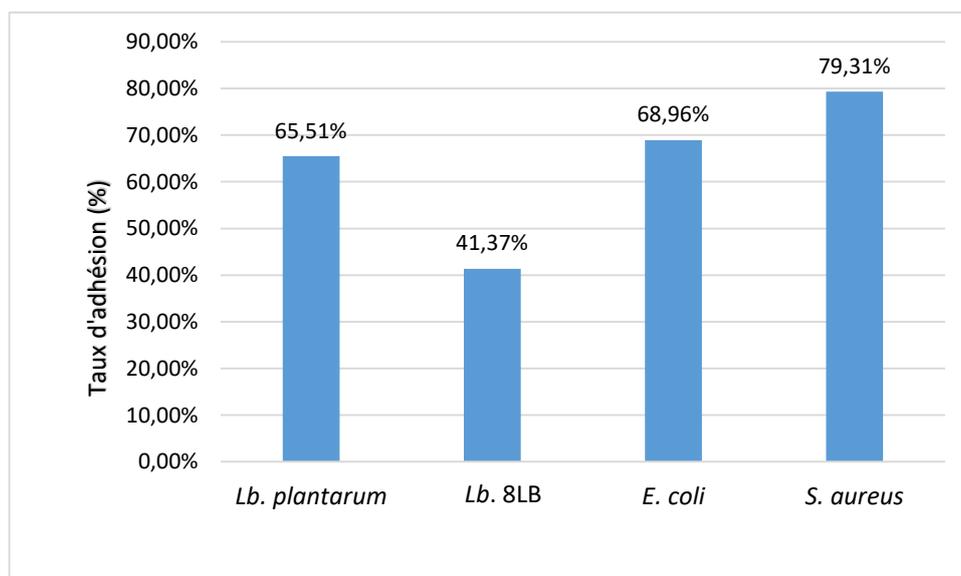
Les bactéries à Gram positif ont la partie lipide des acides lipotéichoïques qui se prolonge à l'extérieur de la cellule donnant une surface hydrophobe, tandis que les bactéries Gram négatif sont généralement plutôt hydrophiles. Cependant les protéines de surface présentes sur leur paroi peuvent les rendre hydrophobes (**Frank, 2001**).

### VI. Test d'adhésion

Les mécanismes fondamentaux qui régissent l'adhésion bactériennes sont encore mal compris et n'ont donc pas été complètement définis, il est admis que les propriétés physicochimiques de la surface bactérienne et celles des supports solides sont des facteurs déterminant de l'adhésion initiale (**Gallardo-Moreno et al., 2002 ; Bayouhd et al., 2006**). Afin de mettre en évidence cette caractéristique un test a été réalisé sur deux supports différents.

#### VI.1. Adhésion sur les cuves en plastiques

Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisés comme le téflon et d'autres matières plastiques (**Bendinger, 2003**). Afin de vérifier cette caractéristique, des souches de bactéries pathogènes et lactiques ont été testées sur les deux supports. Les résultats obtenus sont illustrés sur la **figure 05**.



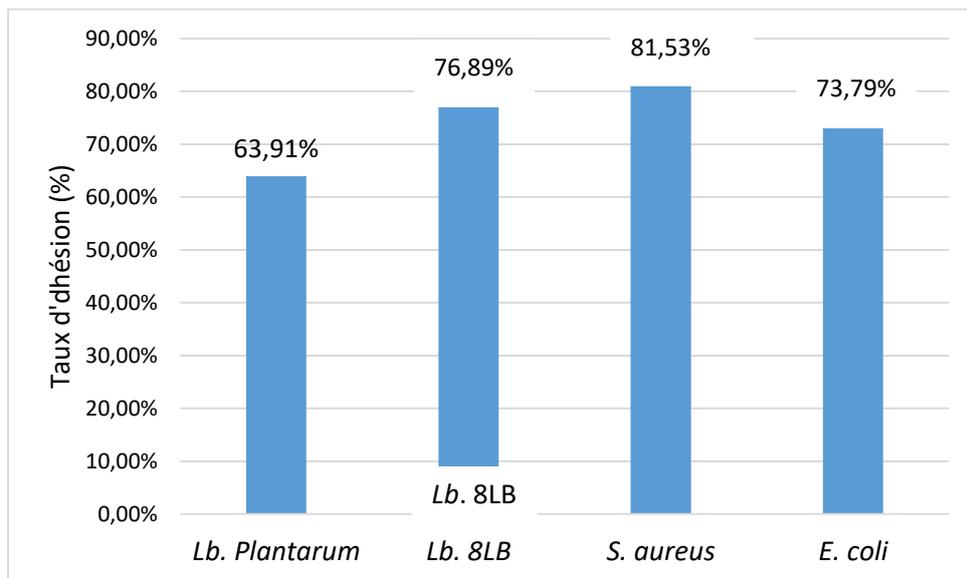
**Figure 05 :** Capacité d'adhésion des bactéries lactiques et bactéries pathogènes sur les cuves en plastiques.

Les résultats de ce test, montrent que toutes les souches testées peuvent adhérer au plastique.

Une forte adhésion de bactéries pathogènes testés, été remarquable par rapport aux souches de bactéries lactiques. La souche qui présente un taux d'adhésion plus fort c'été *Staphylococcus aureus* (79,31%) suivie d'*Escherichia coli* (68,96%), *Lactobacillus* 8LB (65,51%) et *Lactobacillus plantarum* (41,37%).

Des études faites par **Reifsteck et al. (1987)** et **Krepsky et al. (2003)** sur *S. aureus* et *S. epidermidis* démontrent que l'hydrophobicité de la surface bactérienne faciliterait l'adhérence au matériel médical.

### VI.2. Adhésion sur les microplaques en polystyrène



**Figure 06** : Capacité d'adhésion des souches pathogènes et des souches de bactéries lactiques sur les microplaques en polystyrène.

Ces résultats sont proches à ceux obtenus en utilisant les cuves en plastiques.

Cela peut être expliqué par l'état de l'hydrophobicités des deux supports. Selon **Moza et al. (1987)** et **Ait Meddour (2015)**, les supports en plastiques et polystyrènes présentent des surfaces hydrophobes.

Les propriétés physico-chimiques de la paroi cellulaire (charges, caractère hydrophobe/hydrophile, acide ou basique) dépendent de la composition de la paroi cellulaire (**Latrache et al., 1994**).

La capacité d'adhésion de ces souches, peuvent être liées à l'hydrophobicité. En effet, il a été démontré que cette caractéristique du microorganisme se révèle importante du point de vue de l'adhésion. Comme démontré par **Busscher et Weerkamp (1984)**, l'hydrophobicité des cellules et de la surface de contact est associée à l'adhésion initiale.

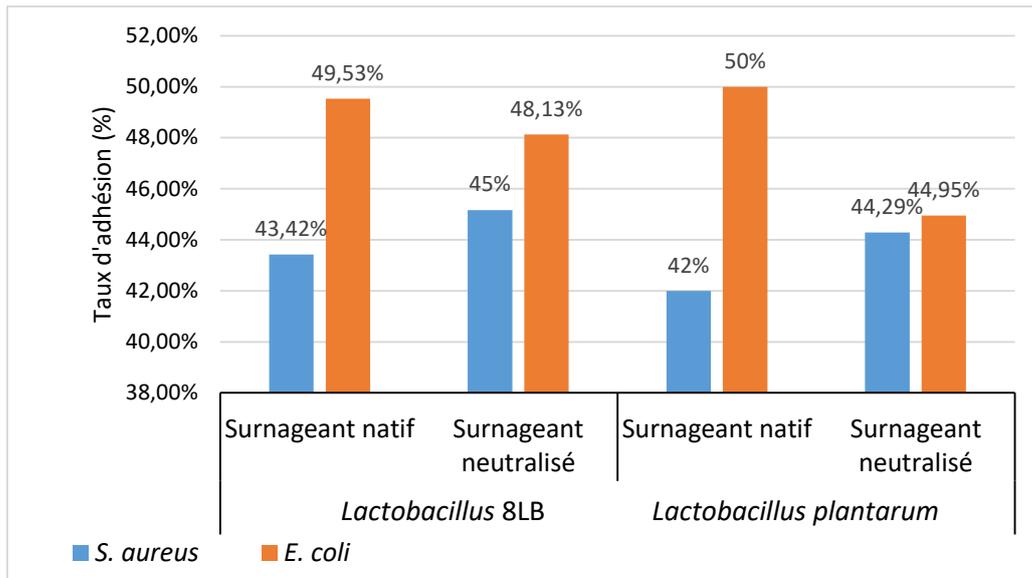
L'adhérence est aussi influencée par des composants de la paroi bactérienne tels que les acides teichoïques et des protéines de surface dont des adhésines et des autolysines identifiées chez *S. aureus* et *S. epidermidis* (**Oshida et al., 1995 ; Heilmann et al., 1997 ; Foster & Hook, 1998 ; Gross et al., 2001**). De même l'adsorption générale de protéines (ayant lieu pendant les premières étapes de l'adhésion) augmente avec l'hydrophobicité du support (**Pamula et al., 2004**).

D'après une étude de **Bharathi et al. (2011)**, sept souches de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. salivarius* et *Lb. casei pseudoplantarum*) étaient toutes capables de former un biofilm en cultures pures et mixtes sur du polystyrène.

## VII. Etude de pouvoir antiadhésif des souches lactiques à l'égard des souches pathogènes

Pour la détection de l'effet antiadhésif du surnageant de culture des souches lactiques, deux tests sont effectués :

**VII.1 Sur les microplaques en polystyrène** : l'intérêt de ce test est d'étudier l'impact des surnageants natif et neutralisé des bactéries lactiques sur l'adhésion des bactéries pathogènes, après 24h d'incubation.



**Figure 07 :** Résultats de l'inhibition de l'adhésion de *E. coli* et *S. aureus* par les surnageants de culture de *Lactobacillus 8LB* et *Lactobacillus plantarum* sur les microplaques.

Les résultats obtenus suite au test d'adhésion, illustrés dans la **figure 07**, ont permis de mettre en évidence plusieurs comportements selon les souches à différents surnageants.

Le taux d'adhésion bactérienne, après traitement par les surnageants natifs et neutralisés varient entre 42 et 50% par rapport aux bactéries non traitées par ces surnageants (**figure 06**).

A première vue, l'effet antiadhésif le plus important des surnageant de cultures est celui enregistré contre la souche de *S. aureus*. Le taux d'adhésion le plus faible est noté pour cette dernière en utilisant le surnageant natif de *Lactobacillus plantarum* (42%) et *Lactobacillus 8LB* (43,42%). En outre celles additionnés des surnageant neutralisés de ces bactéries aient des taux d'adhésion de 44,29% et 45% respectivement.

Tandis que la souche *E. coli* a présenté des taux d'adhésion de 49,53% en la traitant par le surnageant natif de *Lactobacillus 8LB* et 50% en la traitant par le surnageant natif de *Lactobacillus plantarum*. Par contre la souche *E. coli* additionné du surnageant neutralisé de *Lactobacillus plantarum* a un pourcentage d'adhésion de 44,95% et celle additionné par le surnageant neutralisé de *Lactobacillus plantarum* est de 50%.

D'après l'étude de **Gudina et al. (2010)**, une souche de *Lb. paracasei* pouvait produire un biosurfactant qui pouvait réduire l'adhésion de *Streptococcus sanguis* 12 (72,9%), *Streptococcus mutans* HG985 (31,4%), *S. aureus* (76,8%), *S. epidermidis* (72,9%), *P. aeruginosa* (21,2%) et *E. coli* (11,8%), après 4h d'incubation, sur microplaques en polystyrène.

# *Conclusion*

### Conclusion

*Lactobacillus* nous montrent à chaque étude effectuée des particularités très surprenantes les unes que les autres. Leur diversité et leur hétérogénéité nous permet d'étudier leur capacité d'adhésion à différents surfaces.

L'activité antibactérienne a été évaluée par l'application des tests de spots et puits. Les résultats enregistrés avec le test des spots montrent une activité antibactérienne des deux souches lactiques (Lb. 8LB et Lb. plantarum) à l'égard d'*E.coli* avec un diamètre allant de 20 à 28mm. À l'égard de *S. aureus* avec un diamètre de 17 à 24mm. La meilleure activité a été notée avec la souche de Lb. 8LB à l'égard d'*E.coli* (22 mm) (Test des puits).

D'après les résultats obtenus sur la capacité d'adhésion des bactéries lactiques et des bactéries pathogènes sur la microplaque en polystyrène, *S. aureus* montré une forte capacité d'adhésion (81,35%), suivi de Lb. 8LB (76,89%), *E. coli* (73,79%) et lactobacillus plantarum (63,91%) Ces derniers ont révélés une corrélation positive d'adhésion aux cellules épithéliales (colon et l'intestin grêle du bovin, colon de poulet). L'hydrophobicité des essais varie de 26,13% à 42,75%.

Le test d'inhibition de l'adhésion sur la microplaque a été réalisé avec les surnageant natif et neutralisé. Suite à ce test, les deux souches lactiques ont exercé un effet antiadhésif contre les deux bactéries pathogènes avec les deux surnageant, à partir d'un taux initial varie entre 81,53% et 73,79%, Le taux d'adhésions bactériennes, après traitement par les surnagent natif et neutralisés varie entre 42 et 50%.

A partir des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les deux souches lactiques, exercent un effet inhibiteur sur la croissance ainsi que l'adhésion des souches pathogènes.

En perspectives il serait intéressant d'envisager :

- ✓ L'utilisation des techniques d'identification moléculaires (ARN16s) pour une meilleure description des souches bactériennes utilisées.
- ✓ Mise en évidence de l'activité antiadhésive des bactéries utilisées par :
  - L'étude de la nature des substances à effet antiadhésif sécrétées par les souches lactiques sélectionnées ;
  - L'extraction et la purification de ces substances ;

Production de biosurfactants, bactériocines et autres substances à effet antiadhésif dans des bioréacteurs pour une exploitation dans le domaine agroalimentaire.

# *Références bibliographiques*

### [A]

**Ait Meddour. (2015).** Isolement et sélection de souches de bactéries lactiques pour la lutte contre les biofilms de microorganismes pathogènes et d'altération. Thèse de doctorat en microbiologie appliquée. Université A/MIRA de Bejaia. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.105p.

**Allouche FN, Hellal A et laraba A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. Rev. Nat. Technol. p 13-20.

**Ammor S, Tauveron G, Dufour E et Chevallier I. (2006).** Anti microbial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meatsmall-scalefacility: 1-Screening and characterization of the antibacterial compound. Food Microbial. 17, 454-461.

**Anwar A. Thikra A. Saeed A. M. (2013).** Adhesion, auto-aggregation and hydrophobicity of six lactobacillus strains. British microbiology research journal. 4, 38

**Annika. M.M et Marc.B. (2004).**Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. Ed Marcel Dekker

**Axelsson L. (2004).** Sciences et technologies alimentaires-New York-Marcel Dekker, 139, 1-66.

**Azkarate- Peril M.A. McAuliffe O., Altermann, E. Lick, S., Russel W.M. & Klaenhammer, T.R. (2005).** Microarray analysis of a two- component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophilus*. Apple Environ Microbiol. 71, 5794.

### [B]

**Barfoot S F et Klaenhammer T R. (1983).** Detection and Activity of Lactac in B, a Bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied And Environmental Microbiology, 45 (6): 1808-1815.

**Bauer R. &Dicks L.M.T. (2005).** Mode of action of lipid II-targeting antibiotics. Int. J. Food Microbiol., 101, 201-216.

**Bayoudh S, Othmane A, Bettaieb F, Bakhrouf A, Ben Ouada H, Ponsonnet L. (2006).** Quantification of the adhesion tree energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Matherial science and Engineering* 26: 300-305.

**Bellifa S. (2014).** Evaluation de la formation de biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. 56-57.

**Bendinger B, Rignaarts H, Altendorf K, Zehnder A, (2003).** Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and microbiology*. 59 (11): 3973-3977.

**Bharathi P, Bhowmick P, P, Shekar M. et Karunagar I, (2011).** Biofilm formation by pure and mixed culture of *Lactobacillus* isolates on polystyrene surface in varying nutrient conditions. *Biothechnology, Bioinformatics and Bioengineering*. 1, 93-98.

**Bower C.K., Daeschel M.A., Mc Guire J. (1998).** Protein anti-microbial barriers to bacterial adhesion. *Journal of Dairy Science*. 81: 2771-2778.

**Boudjaib S. (2013).** Etude physico-chimique du produit laitier du sud Algérien « Jben » recherche du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques. Mémoire de Master en Biologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou Bekr Belkaidde Tlemsen. 91p.

**Branger A. (2007).** *Microbiochimie et alimentation*; 345-343.

**Briandet. R, Fechner. L, Naitali M, Dreano, C. (2012).** *Biofilms, Qand les microbes s'organisent*. Amazon France : Quae.

**Brooijmans RJW, de Vos WM, Hugenholtz J. (2009).** The electron transport chains of *Lactobacillus plant arum* WCFS1. *Appl Environ Microbiol*. 75:3580–5.

**Busscher H.J., Weerkamp A.H., Van der mei H.C., Van pelt A. W.J., De jong H.P., and Arends, J.(1984) :** Mesurments of the Surface Free Energy of Bacterial Cell Surface and its Relvance for adhesion, *Appl Env Microbial* 48: 165-173.

**Byczkowski J. et Gessner T., (1988).** Biological role of superoxide ion radical. *Int. J. Biochem*.20: 569-580.

[C]

**Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K. (1998).** Antibiotic susceptibility of potentiallyprobiotic *Lactobacillus* species, *J. Food Prot*. 61 1636–1643.

**Carter, M. Q., Louie, J. W., Feng, D., Zhong, W. & Brandl, M. T. (2016).** Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157/H7 for initial attachment and biofilm formation. *Food Microbiol* 57, 81-89.

**Cerning J., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M. (1992).** Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from Slime-Forming Mesophilic Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*. 75 (3): 692.

**Cocolin, L and Ercolini. (2008).** Molecular Techniques in the Microbial Ecology of fermented foods. Food microbiology and food safety series. Springer Science+Business Media, LLC. Sequencing of 16S Rna. *FEMS Microbiology Letters* 77, 5-12

**Corrieu G. Luquet F.M. (2008).** Bactéries lactiques et probiotiques, édition Tec. Et Doc. Lavoisier, Paris France, p9, 10, 25, 51. Drider Dj., Prevost H. (2009).

**Cotter P.D. & Hill C. (2003).** Surviving the Acid test : responses of Gram+ bacteria to low Ph. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67, 429-453.

**Coulibaly I. (2010).** Contribution à l'étude de la résistance au séchage des bactéries lactiques. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique. Université de Liège (Gembloux, Belgique). 260 p.

### [D]

**Dankert J., Hogt A.H., Feijen J. (1986).** Biomedical polymers: bacterial adhesion, colonization, and infection *CRC Crit. Rev Biocompat* 2: 219-301.

**Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P. (2004).** High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* ; 127: 412-421.

**Dat N.M., Hamanaka D., Tanaka F., Uchino, T., (2012).** Control of milk pH reduces biofilm formation of FAO/OMS (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS) .Working Group Report. Cordoba, Argentina.

**Delarras Camille. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier. P : 128, 129, 269, 271.

**Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E., Hols P. (1999).** The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76 (1): 159

**Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M.C et Janssens D, (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques in *Bactéries lactique. T.1. Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Loriga (Uriage), 25-68. 614p.*

**Diep D., Salehian Z., Holo H. & Nes I.F., (2007).** Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocin. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 104, 2384-2389.

**Donlan. Rodney. (2002).** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, vol.8, n°9, p. 881-890.

**Dortu, C., Thonart, P., (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 13 (1), p. 143-154.

**Dunne C, OMahony L, Murphy L, Thomton G, et al. (2001).** In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr.* 73:386s-392s.

**Dziewanowska K., Patti JM, Deobald C F, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA. (1999).** Fibronectin Binding Protein and Host Cell Tyrosine Kinase Are Required For Internalization of *Staphylococcus aureus* By Epithelial Cells. *Infection and immunity:* 67(9): 4673-8.

### [E]

**El Moualdi H. Labioui L. Bousmaha A. Benzakour M. Ouhssine et M Yachioui. (2008).** Activité Bactéricide d'une Souche de *Lactococcus lactis* Subsp. *Cremoris* Bull.SOC.Pharm.Bordeaux ,147 7-18.

### [F]

**Faracchia L et al. (2010).** A *Lactobacillus* derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* producers. Department of chemical, food, pharmaceutical and pharmacological sciences University of Eastern piedmont, via Bovio 6,28100, Novara, Italy *aculture.* 274: 1-14.

**Frank J. F., Koffi R. A. (1990).** Surface- adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* 53: 550-554.

**Frank J. F. (2001).** Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Adv. Food. Nutr. Res.* 43 : 319-369.

**Fleming H.P., Etohells J.L., et Costilow R.N. (1975).** Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber Brins. *Appl. Microbiol*, 30 (6): 1040-1042

**Foster J.W, ( 1999).**When proton attack : microbial strategies of acid adaptation. *CurrOpin. Microbiol.*, 2, 170-174.

### [G]

**Gaboriaud, F., Dague, E., Bailet, S., Jorand, F., Duval, J., Thomas, F.; (2006) ;** Multiscale dynamics of the cell envelope of *Shewanella putrefaciens* as a response to a pH change; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 52: 108-116.

**Galardo-Moreno A M, Gonzalez Martin M L, Pérez-Giraldo C, Garduno E, Bruque J M, Gomez-Garcia A C. (2002).** Thermodynamic Analysis of Growth temperature dependence in the adhesion of *C. parapsilosis* to polystyrene. *Applied and Environmental microbiology* **68**: 2610-2613.

**Given, (1971).** Assay system for bacteriocin. *Appl. Microbiol*, 21, 943.

**Goh YJ, Klaenhammer TR (2009).** Genomic Features of *Lactobacillus* species. *FrontBiosci* 14 :1362-1386.doi :10.2741/3313).

**Gudina E.J., Teixeira J.A., Rodrigues L.A., (2010).** Isolation and functional characterization of a biosurfactants produced by *Lb. paracasei*. *Colloids and Surfaces B. Bio interface*, 76: 298304

**Guerrieri E., Simona N., Patrizia M., Carla S., Ramona I., Immacolata A., Moreno B. (2009).** Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. *Food Control*. 20: 861–865.

### [H]

**Hansen U, Hussain M, Villone D, Hermann, Robenek H, Peters G, Sinha B, and Bruckner P. (2006).** The anchorless adhesion Eap (extracellular adherence protein) from *Staphylococcus aureus* selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. *Matrix Biol.* 25: 252-260.

**Heilmann, C. (2011).** Adhesion mechanisms of staphylococci. *Adv. Exp. Med. Biol.* 715:105123.

**Hogt A.H., Dankert J., de Vries J.A., Feijen J. (1983).** Adhesion of coagulase-negativestaphylococci to biomaterials *J GenMicrobiol.* 129.

**Hogg T. (2005).** Essential Microbiology. *John Wiley & Sons.* 14: 188-190.

### [I]

**Iyer R. Tomar S. K. UmaMaheswari T. Singh R. (2010).** Streptococcus thermophilus strains: multifunctional lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 20, 133-141.

### [J]

**Jay, M., Loessner, M., and golden, D. (1982).** Modern Food Microbiology, 7th ed., New York: Springer Science Business Media.

**Juillardn, V., Spinnler, M., Desmazeaud, M.J. et Bouquien C.Y. (1987).** Phénomène de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Lait.* 67: 149-172.

### [K]

**Kachouri F., Ksontini H., Soumya E.A., Saad, I.S.K., M., Latrache H., Hamdi M., (2016).** Lactobacillus plantarum: Effect of a protective biofilm on the surface of olives during storage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1) 202-209

**Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L (2008).** Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes.

**Kim Y., Oh S., Kim S.H. (2009).** Released exopolysaccharides (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enter hemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 379: 324–329.

**Kong S. et Davison A.J. 1980.** The role of interactions between O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, O<sup>-</sup> and O<sub>2</sub> in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 204: 13-29.

**Klaenhammer T .R., Barrangou R., Buck B. L., Azcarate-Peril M.A et Altermann E. (2005).** Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev* 29 : 393-409.

**Krekeler C., Ziehr H., Klien J. (1989).** Physical methods for characterization of microbial cell surfaces *Experientia* ; 45 : 1047-1054.

**Krepesky N., Barreto R., Ferreira A., Casado Lins U, (2003).** Hydrophobicité de la surface des cellules et la production de *Boue Des écolats Du Brésil De Staphylococcus Epidermidis* 46 : (4), 280-287.

[L]

**Latrache, H., Moses, N., Pelletier, C., Boulioux, P, (1994).** Chemical and physicochemical properties on *Escherichia coli* : Variations among three strains and influence of culture conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2, 47-56.

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

**Lee, YK et Puong, KY (2002).** concurrence pour l'adhésion entre probiotiques et agent pathogènes gastro-intestinaux humaine en présence de glucides .*Brit J Nutr*88 , S101-S108.

**Lepargneur J.P. et Rousseau V. (2002).** Rôle protecteur de la flore de Doderlein. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*. 3: 485-494.

**Leveau J. P. Bouix M. (1993).** Microbiologie industrielle. Ed : Techniques et documentations. Lavoisier Paris. 2-39.

**Ludwig W. Schleifer K-H et Whitman X B. (2009).** Order: Lactobacillales. In: De vos P, Garrity G M, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey F A, Schleifer K-H et Whitman W B.(2009). *Bergey's manual of Systematic bacteriology, second Edition Volume Three: The Firmicutes*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 464p

**Ludwig W. Schleifer K-H et Whitman X B. (2009).** Order: Lactobacillales. In: De vos P, Garrity G M, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey F A, Schleifer K-H et Whitman W B.(2009). *Bergey's manual of Systematic bacteriology, second Edition Volume Three: The Firmicutes*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 464p.

**Lytle, D., Frietch, C., Covert, T.; (2004)** ; Electrophoretic mobility of *Mycobacterium avium* complex organisms. *Appl Environ Microbiol*. 70: 5667-5671.

[M]

**Madi N. (2010).** Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activité antibactérienne envers *Staphylococcus aureus* multi résistant. Mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée. Université A/MIRA de Bejaia. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 89p.

**Mahdhi A. Chaieb K. Kamoun F. et Bakhrouf A. (2010).** Use of *Pseudomonas stutzeri* and *Candida utilis* in the improvement of the conditions of *Artemia* culture and protection against pathogens. *Braz J Microbiol.* 41, 107-115.

**Maldonado N.C., Silva de Ruiz C., Cecilia M., Nader-Macias M.E. (2007).** A simple technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 wholecells and products. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.* Ed. A. Méndez-Vilas. pp.52-59

**Mami A, Hamedi A R, Henni J E, Ker foot A et Kihal M. (2010).** Activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. *Les technologies de laboratoire.* 5(21), 26-33.

**Matto J., Fonden R., Toevalen T., Von Wright A., Vilpponen Salmela T., Stokari R ,(2006).** *Intestinal survival and persistence of probiotic Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei fermented milk. Letters in applied Microbiology;44: 314-9.*

**Metzner M., Germer J. & Hengge R., (2004).** Multiple stress signal integration in the regulation of the complex sigma S-dependent *csiD-YgaF-gabDTP* operon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.,* 50,2127-2133.

**Mozes N, Marchal F, Hermesse M P, Van Haecht J L, Reuliaux L, Leonard A J, Rouxhet P G. (1987).** Immobilization of microorganisms by adhesion: interplay of electrostatic and non electrostatic interaction. *Biothechnology and Bioengineering* 30: 439-450.

**Muriana. P. M and Klaenhammer. T. R (1991).** Purification and Partial Characterisation of Lactacin F, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl and Enviro Microbio* 57 : 1144-121.

[N]

**Neu T. R. (1996).** Significance of bacterial surface active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* 60: 151-166.

### [O]

**Ogunbanwo S.T, Sanni A.I, and Onilude, A.A. (2003).** Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *Afr. J. Biotechnol.*, 2(8): 219-227.

**Oliveira, D.R., (1992).** Physico-chemical aspects of adhesion, in *Biofilms; science and technology*, L.F. Melo, et al., Editors., Kluwer academic: Dordrecht. p. 45-58.

**Orla-Jensen. S. (1919).** *The Lactic Acid Bacteria.* Fred Host and Son. Copenhagen.

### [P]

**Pratt, L. A. & (Kolter, R. 1998).** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation : roles of flagella, mobility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30, 285-293.

**Peacock, S. J., T. J. Foster, B. J. Cameron, and A. R. Berendt. (1999).** Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology* 145 (12):3477-3486.

**Pelletier C. Bouley C. Cayuela A. C. Bouttier S. Lerr E. Bourlioux A. Bellon Fontaine M. N. (1997).** Cell surface characteristics of *Lb. casei* subsp *casei*, *Lb. paracasei* subsp. *Paracasei* and *Lb. rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology.* 63, 1725-17311391.

**Piard J.C. et Desmazeaud M. (1991).** Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L. oxygen metabolites and catabolism products. *Lait.* 71: 525-541.

**Pramod K. Gopal, Jaya Prasad, John Smart, Harsharanjit S. Gill (2000).** In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*.

### [R]

**Rodrigues L., Moldes A., Teixeira J., Oliveira R. (2006).** Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal.* 28: 109–116.

**Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., de los Reyes-Gavilán C.G., Salminen S. (2006).** Short communication: effect of exopolysaccharides isolated from “villi” on the adhesion of probiotic and pathogens to intestinal mucus. *Journal of Dairy Science*. 89: 2355–2358.

### [S]

**Samaoui. 2010.** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifier. Université de Toulouse.

**Saito Y. A, Loke G. R., Weaver A. L, Locke, G. R, Meaver A L, Zinsmeister A R, and Talley, N.J (2005)** Diet and functional gastrointestinal disorders a population Based case-control study. *Am J. Gastroenterol.* 2734-2748.

**Satou N., Satou J., Shintani H., Okuda K. (1988)** Adherence of streptococci to surface-modified glass *J GenMicrobiol*, 134,1299-1305.

**Savadogo A., Ouattara C.A.T., Savadogo P.W., Ouattara A.S., Barro N., et Traore A.S. (2004).** Microorganisms involved in fulanitr additional fermente dmilk in Burkina Faso. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3 (2): 134-139

**Schillinger U., et Lücke F.K. (1989).** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (8): 1901-1906.

**.Schleifer, K.H. (1987).** Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbial. Rev.* 46, 201 203. pages 365s à 373s.

**Schleifer, K.H. and Ludwig. W. (1995).** Phylogeny of the genus *LLX~O~L&/~~S* and related genera. *System. Appl. Microbial.* 18, 461 467.

**Song H.J., et Richard J. (1997).** Antilisterial activity of three bacteriocin used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *International Journal of food Microbiologie*, 36 (2): 155-161.

### [T]

**Tagg J. R., Mcgiven A. R., (1971).** Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology*, 21(5), 943.

**Tomomi .H, Melaku .A, Miho .K, Chise .s, Sunee. N, Sadahiro.O. (2009).** Characterisation of bacteriocin produced by *Enterococcusfaecalis*N1-33 and its application as a food preservative. Journal of food protection. Vol72. No 3 :524-530.

[V]

**Vallet I., Olson J.W., Lory S., Lazdunski A., Filoux A. (2001).** The chaperone/usher pathway of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. Proc Natl Acad Sci USA. 98: 6911-6916.

**Vandamme. P., Pot. B., Gillis. M .dc Vo\ . P..Kerster\ . K and Swings. .I (1996)** Pal! phast taxonomy. A COI WISU approach IO bacterial cy\ tematics. Microbiol. Rc\ 60 407 33s.

[W]

**Wilhelm H Holzapfel, Petra Haberer, Rolf Geisen ,Johanna Bjorkroth , Ulrich Schillinger. (2001).** Taxonomie et caractéristiques importantes des microorganismes probiotiques dans les aliments et la nutrition journal American de nutrition Clinique, volume 73, numéro 2, pages 365s à 373s, [https:// doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365](https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365).

[Z]

**Zhao T., Doyle M.P., Zhao P. (2004).** Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by Competitive-Exclusion Microorganisms. Applied and Environmental Microbiology. 70 (7): 3996–4003.

**Zourari. A, Accolas.J.P and Desmazeaud.M. (1992).** Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. Lait 72:1.

# *Annex*

## Annexe 1 : Préparation de solutions

### ➤ Cristal violet (1%) :

Cristal violet .....	1g
Eau distillé.....	1 L

### ➤ Solution éthanol-acétone (75 : 25) :

Ethanol.....	75 ml
Acétone.....	25 ml

### ➤ Solution PBS (pH : 7,2) :

NaCl.....	8 g/L
Kcl .....	0,2 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,44 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,24g/L
Eau distillée.....	1 L

### ➤ Milieu MRS :

Extrait de viande.....	5 g
Extrait de levure.....	5 g
Peptone.....	10 g
Acetate de sodium.....	5 g
Citrate triammoniacale.....	2 g
Glucose .....	20 g
Phosphate dipotassique.....	2 g
Tween 80.....	1 ml
Sulfate de magnésium.....	0,2 g
Sulfate de manganèse .....	0,05 g
Eau distillée.....	1 L

Pour le milieu gélosé ajouter 15g/L d'agar.

### ➤ Bouillon nutritif (BN) :

Peptone .....10 g/L  
 NaCl.....5 g/L  
 Extrait de levures .....5 g/L  
 Eau distillée ..... 1 L

Pour le milieu gélosé on ajoute 15g/L d'agar.

➤ **Bouillon Muller-Hinton :**

Hydroxysat acide de caséine ..... 17 g/L  
 Fécula ..... 1,5 g/L  
 Extrait de bœuf ..... 3 g/L  
 Eau distillée ..... 1 L

Pour le milieu gélosé on ajoute 15g/L d'agar.

## Annexe 2 : Test d'adhésion

**Tableau 01 :** Résultats de test d'adhésion sur les cuves en plastiques.

Souche	Do initial	Do final	taux d'adhésion
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,29	0,19	65,51%
<i>Lactobacillus</i> 8LB	0,29	0,12	41,37%
<i>E. coli</i>	0,29	0,20	68,96%
<i>S. aureus</i>	0,29	0,23	79,31%

**Tableau 02 :** Résultats de test d'adhésion sur les microplaques.

	Témoin MRS	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb.</i> 8LB	T BN	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Première essai	0,053	0,22	0,205	0,04	0,187	0,266
	0,061	0,172	0,245	0,046	0,207	0,196
	0,058	0,205	0,235	0,058	0,219	0,24
Moyenne 1	0,05733333	0,199	0,22833333	0,048	0,20433333	0,234
Deuxième essai	0,06	0,189	0,255	0,049	0,199	0,232
	0,065	0,204	0,214	0,041	0,217	0,215
	0,055	0,199	0,187	0,051	0,225	0,221
Moyenne 2	0,06	0,197333	0,21866667	0,047	0,21366667	0,222667
Moyenne des deux moyennes	0,05865	0,19815	0,2233	0,0475	0,214	0,2283

**Tableau 03** : Taux d'adhésion des bactéries sur microplaques.

Souches	Do initiale	Do finale	Taux d'adhésion
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,31	0,19815	63,91%
<i>Lactobacillus</i> 8LB	0,29	0,223	76,89%
<i>Escherichia coli</i>	0,29	0,214	73,79%
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,28	0,2283	81,53%

### Annexe 3 : Tests d'antiadhésion

**Tableau 04** : Résultats de test antiadhésif de *S. aureus* sur les microplaques.

	T	8LB	PI	T	8LB	PI
Surnagent neutralisé	0,042	0,109	0,099	0,042	0,102	0,082
	0,039	0,101	0,108	0,039	0,089	0,095
	0,045	0,106	0,097	0,045	0,11	0,093
Moyenne 1	0,042	0,10533333	0,10133333	0,042	0,10033333	0,09
Surnagent natif	0,041	0,111	0,105	0,039	0,111	0,12
	0,037	0,115	0,101	0,035	0,099	0,111
	0,04	0,102	0,092	0,043	0,102	0,109
Moyenne 2	0,03933333	0,10933333	0,09933333	0,039	0,104	0,11333333

**Tableau 05** : Résultats de test antiadhésif d'*E. coli* sur les microplaques.

<i>E. coli</i>	T	8LB	PI	T	8LB	PI
Neutralisé	0,038	0,113	0,095	0,049	0,109	0,099
	0,042	0,089	0,112	0,042	0,101	0,108
	0,039	0,101	0,095	0,035	0,106	0,097
Moyenne 1	0,03966667	0,101	0,10066667	0,042	0,10533333	0,10133333
Natif	0,04	0,108	0,099	0,036	0,1	0,089
	0,037	0,1	0,109	0,037	0,086	0,11
	0,041	0,111	0,092	0,04	0,089	0,093
Moyenne 2	0,03933333	0,10633333	0,1	0,03766667	0,09166667	0,09733333

**Tableau 06** : Résultats de test antiadhésion sur les microplaques et calculs des taux d'adhésion.

Souche	Do d'adhésion	Do antiadhésive				Taux d'adhésion			
		<i>Lactobacillus</i> 8LB		<i>Lactobacillus plantarum</i>		<i>Lactobacillus</i> 8LB		<i>Lactobacillus plantarum</i>	
		Surnage nt natif	Surnage nt neutrali sé	Surnage nt natif	Surnage nt neutrali sé	Surnage nt natif	Surnage nt neutrali sé	Surnage nt natif	Surnage nt neutralis é
<i>E. coli</i>	0,214	0,1066	0,1028	0,106	0,1013	49,53%	48,13%	49,53%	47,33%
<i>S. aureus</i>	0,2283	0,0988	0,1031	0,101	0,098	43,42%	45,17%	44,29%	42,98%

## Résumé

Les bactéries lactiques peuvent exercer plusieurs effets bénéfiques. En particulier l'inhibition de l'adhésion de bactéries pathogènes. Cette étude avait pour objectif de tester l'activité antiadhésive de deux souches lactiques (*Lactobacillus* 8LB et *Lactobacillus plantarum*) à l'égard de deux souches pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*), sur microplaques en polystyrène. Les résultats obtenus, après la mesure de la densité optique indiquent que le taux d'adhésion de *Staphylococcus aureus* a été réduite de 55 à 58% et celui d'*Escherichia coli* de 50 à 55,05%, selon le surnageant (natif ou neutralisé) de la bactérie lactique utilisé. Cela était probablement dû à la production d'acides organiques, la production de bactériocines, des biosurfactant et des exopolysaccharides. A partir de ces résultats, nous pouvons conclure que les deux souches de *Lactobacillus*, exercent un effet inhibiteur sur l'adhésion de deux souches pathogènes.

**Mots clé :** Bactéries lactiques, bactéries pathogènes, activité antiadhésive, microplaque en polystyrène.

## Abstract

Lactic acid bacteria can have several beneficial effects. In particular, the inhibition of the adhesion of pathogenic bacteria. This study aimed to test the antiadhesive activity of two lactic acid strains (*Lactobacillus* 8LB and *Lactobacillus plantarum*) with respect to two pathogenic strains (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*), on polystyrene microplates. The results obtained in this study after measuring the optical density indicate that the adhesion rate of *Staphylococcus aureus* was reduced from 55 to 58% and that of *Escherichia coli* from 50 to 55,05%, depending on the supernatant (native or neutralized) of the lactic acid bacteria used. This was probably caused by the production of organic acids, hydrogen peroxide, bacteriocin production, biosurfactant and exopolysaccharides. From these results, we can conclude that the two *Lactobacillus* strains exert an inhibitory effect on the adhesion of two pathogenic strains.

**Key words:** Lactic acid bacteria, pathogens, polystyrene microplate, anti-adhesive activity.