

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Microbiologie Moléculaire et Médical



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Criblage de souches de bactéries
lactiques douées d'activités
antimicrobiennes**

Présenté par :

Djerdir Zakia & Nasri Khadîdja

Soutenu le : **21 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

M. TOUATI A.

M. BENDJEDDOU K.

M^{me}. MERZOUK H.

Professeur

MCB

MAA

Président

Encadreur

Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Dédicace

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات

Je dédie ce mémoire

*A l'absente, la présente toujours ma chère mère Salem Rebiha, grâce à toi maman je suis où
je suis maintenant*

*A mon cher papa Noureddine, pour son soutien moral et ses conseils les plus précieux qui
m'ont servi dans ma vie et son encouragement sans limite.*

*A mes sœurs : Asma ma source de bonheur, Hadjer la prunelle de mes yeux, Nada mon âme
et Meriem qui sont tous ce que j'ai dans ma vie*

A Himeur Malika, mes tantes et mes oncles

A mon frère Oualid et sa fille Safa

*A mon amie et ma sœur Djerdir Zakia qui est avec qui j'ai partagée des moments
inoubliables et grâce à elle j'ai compris c'est quoi la vrai amitié*

A mes chères amies : Dihia mon miroir, Sara, Chaima, Razika, Rachida et Maroua.

A mes collègues : Amir et Fouad

*A tous l'équipe de service chirurgie femme et le laboratoire médical de l'hôpital EL Zahraoui
M'sila*

A toute la famille Nasri et Salem

Khadidja



Dédicace

Avant tous, Mes profonds remerciements s'adressent à ALLAH qui m'a aidé et donné le courage et la patience pour effectuer ce travail.

Je dédie ce modeste travail à

Mon père pour sa patience avec moi et son encouragement.

Ma source de bonheur la prunelle de mes yeux ma mère

Que le bon dieu vous garde en bonne santé.

Ma sœur Amel mon âme sœur pour son soutien

Moral et son aides merci d'être là pour moi.

Mes très chers frères Fayssal et Mohammed amine qui ont toujours été à mes côtés.

Mon angelet Mahdi et ma princesse Nawel

Mon beau père et ma belle mère

Mon cher mari Mr. Assam Bourbia Pour son soutien et son compréhension

Mes belles sœurs et mes beaux frères

Ma chère binôme Khadîdja avec qui j'ai partagé les bons et les durs moments.

Mes chères amies, surtout Amira, Fatma, Hanane, Khadîdja et Massissilia.

Mes collègues surtout Fouad et Amir.

Toute ma famille

Tous ceux qui m'ont encouragé.

Zakia



Remerciement

Nous tenons à remercier en premier lieu « Allah » le tout puissant miséricordieux de m'avoir donné le courage et la confiance ainsi que la volonté pour préparer ce travail.

*Nos remerciements s'adressent d'abord, à mon promoteur, **M. Bendjeddou Kamel** Maître de conférences à l'Université Abderrahmane Mira-Bejaia. Nous le remercions pour son encadrement, ses encouragements, sa disponibilité et pour sa rigueur scientifique.*

Qu'il trouve le témoignage de notre haute considération et de notre profond respect.

On tient à remercier M.TOUATIT qui nous a fait un immense honneur de présider le jury ainsi que Mme MERZOUK d'avoir accepté d'examiner ce travail

Nous remercions tous les enseignants de département "Microbiologie" On 'adresse nos sincères remerciements à tous les personnels de laboratoire médicale de l'établissement public hospitalier EL ZAHRAOUI M'SILA, Algérie pour leurs efforts et leurs soutiens.

Merci également à tout le les techniciens du laboratoire de microbiologie et de biochimie pour leur présence et leur aide, Ainsi qu'à toute personne ayant contribué à la réalisation de ce travail et tous qui nous ont aidés de près ou loin pendant toutes les années d'études.

Sommaire

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

Partie I : Synthèse bibliographique

I. Définition et caractéristiques générales des bactéries lactiques.....	3
II. Taxonomie et classification	3
III. Propriétés antimicrobiennes	4
III. 1. Acides organiques.....	4
III. 2. Peroxyde d'hydrogène	5
III. 3. Dioxyde de carbone (CO ₂)	5
III. 4. Diacétyle	6
III. 5. Acétaldéhyde	6
III.6. Reutéline	6
III.7. Reutéline	6
III.8. Pyroglutamique.....	7
III. 9. Bactériocines.....	7
III. 9. 1. Définition des bactériocines	7
III. 9. 2. Classification des bactériocines	8
III. 9. 3. Mode d'action des bactériocines	10
IV. Effet antimicrobiennes bactéries lactiques	11

Partie II : Partie pratique

Matériel et méthodes

I. Objectifs de travail.....	12
II. Origines des souches utilisées	12
II.1. Souches test.....	12
II.2.Souches cibles.....	13
II.3.Revivification.....	14
III. Standardisation des inocula bactériens.....	14

VI. Etude de l'activité antimicrobienne des souches lactiques	15
VI.1. Méthode de spots.....	16
VI.2. Méthode des puits (méthode de Barfoot et Klaenhammer, 1983)	17

Résultats et discussion

I. Caractéristiques des isolats	18
I.1. Bactéries lactiques	18
I.1.1. caractères culturaux.....	18
I.1.2. Caractères microscopiques	18
I.1.3. Test catalase.....	18
I.2. Souches pathogènes.....	19
II. Résultats de la standardisation des inocula.	20
III. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des spots.	21
III.1. Test des spots à l'égard de <i>S.aureus</i>	21
III.2. Test des spots à l'égard d' <i>E.coli</i>	22
I.3. Test des spots à l'égard de <i>Candida albicans</i>	23
IV. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des puits.	24
IV.1. Test des puits à l'égard de <i>S.aureus</i>	24
IV.2. Test des puits à l'égard d' <i>E. coli</i>	25
IV.3. Test des puits à l'égard de <i>Candida albicans</i>	26
IV.4. Test des puits à l'égard <i>Candida sp</i>	26
IV.5. Test des puits à l'égard de <i>Citrobacter koseri</i>	27
IV. 6. Test des puits à l'égard de <i>Salmonella sp</i>	28
IV.7. Test des puits à l'égard de <i>Klebsiella sp</i>	29
IV.8. Test des puits à l'égard de <i>P. aeruginosa</i>	30
IV.9. Test des puits à l'égard de <i>Proteus mirabilis</i>	31
IV.10. Test des puits à l'égard de <i>Providencia</i>	32
IV.11. Test des puits à l'égard de <i>Pseudomonas sp</i>	33
Conclusion et perspectives	37
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des tableaux

N	Intitulé	Page
I	Les différentes souches de bactéries lactique utilisées	12
II	Différentes souches pathogènes utilisées	13
III	Aspect microscopique et résultats de tests biochimique	20
VI	Résultats de la standardisation des souches pathogène	21

Liste des tableaux en annexe

Annexe I. Résultats

N	Intitulé
V	Diamètre des zones d'inhibitions (mm) obtenues par le test des spots à l'égard de <i>S.aureus</i> et <i>E.coli</i> .
VI	diamètre des zones d'inhibitions obtenues (mm) par le test des puits à l'égard des souches pathogènes.
VII	diamètre des zones d'inhibitions (mm) obtenues par le test des puits à l'égard des souches pathogènes.

Annexe II. Compositions des milieux de culture

N	Intitulé
VIII	Gélose et bouillon nutritive
IX	Gélose et bouillon MRS.
X	Eau physiologie.

Liste des figure

N	Intitulé	Page
1	Dendrogramme reflétant les relations phylogénétiques de l'ordre " <i>Lactobacillales</i> " dans la classe des " <i>Bacilli</i> "	4
2	Standardisation des inocula des bactéries pathogènes	15
3	Méthode de spots	16
4	les étapes de réalisation de test des puits	17
5	Aspect des bactéries lactiques sur le milieu MRS	18
6	Aspect microscopique d'une souche de bactérie lactique sous microscope optique	18
7	Aspect des blastospores de <i>Candida</i> sous le microscope optique (G×40)	20
8	Aspect des chlamydo-spores de <i>C. albicans</i> sous microscope optique (G×40)	20
9	Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des spots à l'égard de <i>S.aureus</i>	21
10	Résultats du test de spots à l'égard de <i>S.aureus</i>	22
11	Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des spots à l'égard d' <i>E.coli</i> .	22
12	Résultats du test des spots à l'égard d' <i>E.coli</i>	23
13	Résultats du test des spots à l'égard de <i>C. albicans</i>	23
14	Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de <i>S.aureus</i>	24
15	Résultats du test des puits à l'égard de <i>S. aureus</i>	25
16	Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard d' <i>E.coli</i>	25
17	Résultats du test des puits à l'égard d' <i>E.coli</i>	26
18	Résultats du test des puits à l'égard de <i>Candida albicans</i>	26
19	Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de <i>Candida sp</i>	27
20	Résultats du test des puits à l'égard de <i>candida sp</i>	27
21	Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de <i>Citrobacter koseri</i>	28
22	Résultats du test des puits à l'égard de <i>Citrobacter koseri</i>	28
23	Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de <i>Salmonella</i>	29
24	Activité des bactéries lactiques à l'égard de <i>Salmonella sp</i>	29
25	Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de <i>Klebsiella sp</i>	30
26	Activité des bactéries lactiques à l'égard de <i>Klebsiella sp</i>	30
27	Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de <i>P.aeruginosa</i>	31
28	Activité des bactéries lactiques à l'égard de <i>P. aeruginosa</i>	31
29	Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de <i>Proteus mirabilis</i>	32
30	Activité des bactéries lactique à l'égard de <i>Proteus mirabilis</i>	32
31	Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de <i>Providencia sp</i>	33
32	Activité des bactéries lactiques à l'égard de <i>Providencia sp</i>	33

33	Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de <i>Pseudomonase sp</i>	34
34	Activité des bactéries lactiques à l'égard de <i>Pseudomonase sp.</i>	34

Liste d'abréviation

ARNr 16S :Acide ribonucléique ribosomique 16S

BL : Bactérie lactique

BN : Bouillon nutritif

C : Carbone

°C : Degré Celsius

CO₂ : **Dioxyde** de carbone

E.coli :*Escherichia coli*.

h :heure

H⁺ :Hydrogène.

H₂O :Eau.

H₂O₂ :Peroxyde d'hydrogène

kDa : Kilo Dalton.

Lb : *Lactobacillus*.

Lc : *Lactococcus*

MRS: Man Rogosa Sharp.

NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide hydrique

NaOH : Hydroxyde de sodium

O₂: Dioxygène.

OH : Hydroxyde d'hydrogène

pH: Potentiel d'Hydrogène.

ppm: Partie par millièrne

S.aureus : *Staphylococcus aureus*.

sp :Species (Espèce).

tr :tour

UFC : Unité formant colonie.

ZI : Zone d'inhibition

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques constituent un vaste groupe bactérien dont la taxonomie est régulièrement remise à jour avec la progression des données moléculaires (**Federighi, 2005**). Elles regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique. Elles appartiennent à divers genres comme *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* et *Carnobacterium*

Elles interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires, en contribuant à la texture, à la saveur des aliments, à la production de composés aromatiques (**Tabak et Bensoltan, 2011**) et en assurant une bonne sécurité alimentaire. Elles sont surtout employées dans de nombreux aliments fermentés dont le principal but est d'améliorer la qualité technologique et organoleptique (saveur et texture) et l'inhibition de la flore d'altération et les germes pathogènes (**O'Sullivan et al., 2002**).

Cette conservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (**Dortuet Thonart, 2009; Moraes et al, 2010**)

L'intérêt des bactériocines des bactéries lactiques réside d'une part dans leur effet antimicrobien à spectre large ou étroit et d'autre part dans leur sûreté pour la santé humaine, vue leur sensibilité aux protéases digestives, et leur non toxicité pour les cellules eucaryotes. Ces substances antimicrobiennes ont la capacité de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou d'altération, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables. Ces substances bioactives présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Tous ces critères suggèrent que les bactériocines peuvent être un substituant idéal des conservateurs chimiques (**Dortu et Thonart, 2009**).

Cette étude vise à sélectionner des souches de bactéries lactiques douées l'activité antimicrobienne à l'égard de certaines souches pathogènes qui posent des problèmes de santé publique, les objectifs assignés de cette étude consistent à réaliser :

- Mise en évidence l'activité des souches des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes isolées à partir des prélèvements pathologiques

- la sélection des souches des bactéries lactiques ayant une activité à l'égard *E.coli*, *S.aureus* et *Candida*.
- Etude de l'activité antimicrobienne des souches des bactéries lactiques à l'égard des micro-organismes pathogènes.

Synthèse bibliographique

I. Définition et caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique sont un groupe hétérogène de micro-organismes procaryotes, Gram-positifs, catalase négative, oxydase négative, nitrate réductase négative, anaérobies facultatifs(ou micro-aérophiles) et hétérotrophes, elles sont immobiles et asporulées, (**Tailliez, 2001**). Elles ont la capacité de fermenter les glucides en acide lactique (D(-), L(+) ou (DL) en utilisant les voies cataboliques d'Embden Meyerhof Parnas (EMP) ou d'Entner Doudoroff. Elles sont exigeantes en facteurs de croissance, comme : les acides aminés, les bases nucléiques, les acides gras, les peptides, les sels minéraux et les vitamines. Ces bactéries ont la capacité de produire de l'acide lactique comme produit principal à partir des sucres par un métabolisme exclusivement fermentaire. Selon ce métabolisme, les bactéries sont dites homofermentaires si elles ne produisent que l'acide lactique, ou hétérofermentaires si la fermentation abouti à la formation d'autres composés que l'acide lactique comme le CO₂, l'acide acétique, et l'éthanol. Elles sont de forme variable ; d'un long et mince bâtonnet parfois courbé à court coccobacille, coryneforme ou sphérique (**Pilet et al., 2005 ; Topisirovic et al., 2007; Schleifer, 2009**).

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, elles se trouvent dans diverses niches écologiques, tel que le lait, les végétaux, le fromage, la crème fraîche, le beurre, les régions gastro-intestinales et urogénitales des humains et des animaux (**Lopez-diaz et al., 2000 ; Navarro et al., 2000 ; El Shafei et al., 2000 ; Mathara et al., 2004**).

II. Taxonomie et classification

Les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (**De Roissart et Luquet, 1994;Holzapfel et al., 2001**).Les bactéries lactiques appartiennent au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales*(**De Vos et al., 2009**). Cet ordre comporte 33genres repartis entre six familles qui sont : *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*,*Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae* classées sur la base d'analyse phylogénétiques des séquences de l'ARNr 16S (**Ludwig et al., 2009**). La figure 1, représente la répartition des différents genres et familles de l'ordre des *Lactobacillales*.

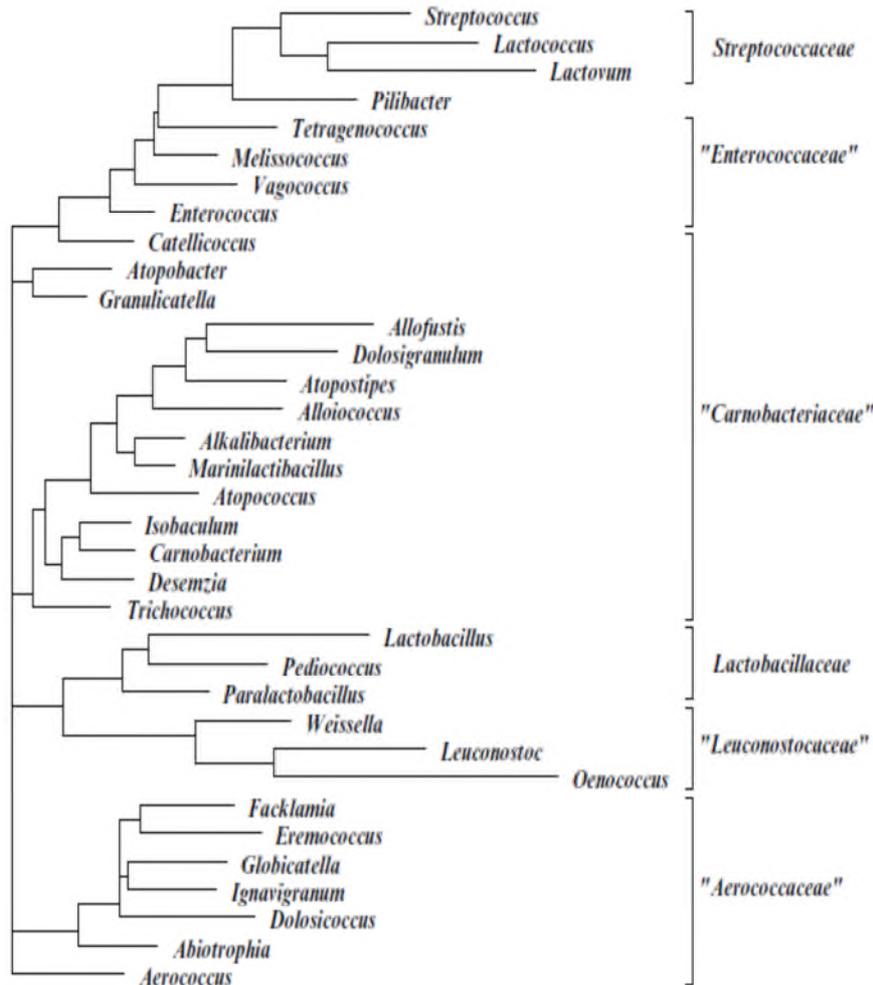


Figure 1 : Dendrogramme reflétant les relations phylogénétiques de l'ordre "*Lactobacillales*" dans la classe des "*Bacilli*" (Ludwig et al.,2009).

III. Propriété antimicrobienne

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

Les composés antimicrobiens des bactéries lactiques peuvent empêcher la croissance des bactéries (Guessas et al., 2006).

III.1. Acides organiques

Grace à la production des acides organiques, en particulier l'acide lactique et l'acide acétique, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu, dans lequel ils se multiplient, en inhibant une partie de la flore qui s'y développe (Zalan et al.,2010).Ainsi, ils peuvent inhiber les bactéries pathogènes dans les produits alimentaires fermentés, le

tube digestif et le tractus génital humain et animal(Slover et Danziger 2008 ; Walter, 2008).

Les acides lactiques et acétiques ont un effet inhibiteur sur les bactéries à gram positif et à Gram négatif(De Vuyst et Vandamme, 1994).Le premier effet des l'acides organiques correspond à une diminution du pH, qui est préjudiciable à des nombreux micro-organismes. Le second effet est lié aux activités spécifiques des formes dissociées ou non dissociées des acides organiques(Raibaud, 1994).

L'effet inhibiteur de la forme moléculaire semble être lié à la possibilité des acides non dissociés lipophiles de traverser la membrane bactérienne. Dans l'environnement cytoplasmique où le pH est plus élevé, l'acide se dissocié et produit des ions H⁺ qui interfèrent avec la machinerie enzymatique de la cellule. Ainsi, ils annulent la force promotrice de la membrane et les processus de transport membranaire de la cellule (De Vuyst et Vandamme, 1994).

III.2. Peroxyded'hydrogène

Les bactéries lactiques possèdent deux types d'oxydases à NADH. Ces enzymes catalysent la réduction d'O₂ en H₂O₂ ou d'O₂ en H₂O (Savadogo et Traore, 2011).

L'intervention du peroxyde d'hydrogène dans les phénomènes d'inhibition par les bactéries lactiques a été établie en 1951 par Wheeler *et al.*, mettent en évidence l'inhibition de Staphylococcus aureus par *Lactobacillus lactis* et l'ont attribué à une « lactobacilline».Dés 1952 ils montent que l'agent inhibiteur est en fait le peroxyde d'hydrogène produit par le lactobacille (Mathot *et al.*,1996).

Le peroxyde d'hydrogène est connu depuis longtemps comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celle des lactobacilles. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différent micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Zalan *et al.*, 2005).

III.3. Dioxyde de carbone (CO₂)

Le dioxyde de carbone est produit principalement par voie hétéro-fermentaire le mécanisme précis de ses propriétés antimicrobiennes est encore mal connu. Le CO₂ 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 membranaire(Dortu et Thonart., 2009).

III. 4. Diacétyle

Le Diacétyle est un composant aromatique essentiel du beurre et de quelques autres produits laitiers fermentés. Produit par des souches de *Lc. Lactis* sub sp. *Lactis* biovar. *Diacetyllactis* par la fermentation du citrate(Mathot *et al.*, 01996). Ses propriétés antimicrobiennes sont dirigées contre les levures, les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif non lactiques. La concentration nécessaire à l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm(Ammor., 2004 ; Dortu., 2008). Le diacétyle inhibe les souches de *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia coli* et *Aeromonas* (Yang 2000 ;Ammor *et al.*,2006).

III.5. Acétaldéhyde

Les bactéries lactiques sont capables de produire de l'acétaldéhyde à partir du glucose (Devoyod et Poullain, 1988). Il est produit par *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, par l'action d'une aldolase à thréonine, qui clive la thréonine en acétaldéhyde et en glycine. L'acétaldéhyde à une concentration de 10 à 100 ppm empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella typhimurium* et d'*E.coli* dans les produits laitiers(Piard et Desmazeaud, 1991).

III.6. Reutérine

La reutérine est un agent antimicrobien puissant à faible poids moléculaire, neutre et soluble dans l'eau (Axelsson *et al.*, 1989), résistante aux enzymes protéolytiques et lipolytiques et stable dans une large gamme de pH (Montiel *et al.*, 2014). La reutérine est active contre les bactéries à Gram positif et négatif, ainsi que les virus, les levures, les moisissures et les protozoaires (Cleusix *et al.*, 2007).

III.7. Reutéricycline

Certaines souches de *Lactobacillus reuteri* secrètent d'autres substances antimicrobiennes, la reutericycline. On a remarqué que la concentration d'inhibition minimale de cette molécule est de 0.05-1 mg/L pour les bactéries à gram positives. Tandis

qu'on n'a pas trouvé aucune sensibilité des bactéries à gram négative et les champignons à la reutéricycline (Ouwehandet *al.*, 1999) .

III.8. Pyroglutamique (2-pyrrolidone-5-carboxylic Acide)

Cette molécule est surtout produite par *Lactobacillus caseis subsp. Casei*, *L.caseis subsp. Pseudopantarum* et *Streptococcus bovis*. Elle est présente aussi dans les fruits, les légumes. Elle inhibe les *Bcillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens*. Elle est stable à (121°C/20min) mais elle perd son activité inhibitrice quand le pH est de 2,5. PCA est reconnu comme un fort agent antimicrobien comme l'acide lactique. son mécanisme d'action est le même que les acides organiques(Ouwehandet *al.*,1999).

III.9. Les bactériocines

III.9.1. Définition des bactériocines

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de **Tagg *et al.* (1976)** ont défini les bactériocines comme étant des protéines, ou complexes protéiques, ayant une activité bactéricide ou bactériostatique contre des espèces proches de la souche productrice.

Cependant ; le nombre de bactériocines ne répondant pas à cette définition surtout en ce qui concerne leur spectre d'activité ne cesse d'augmenter. De ce fait, **Cotter *et al.* (2006)**, ont proposé une définition de bactériocines qui reste la plus adaptée à toutes les bactériocines connues. Il ont défini les bactériocines comme étant « des substances d'origine bactérienne, de nature protéique, synthétisées par des ribosomes et sécrétées dans le milieu extracellulaire pour inhiber la croissance de bactéries typiquement proches de la bactérie productrice et qui exprime, quant à elle, une immunité spécifique contre sa propre bactériocine »(Cotter *et al.*,2006)

Certaines bactériocines sont douée, à la fois, d'activités antibactérienne et antifongique comme la Pentocine TV35b produite par *Lb. pentosus* (**Okkers *et al.*,1999 ; Atanassova *et al.*, 2003**).

III.9. 2. Classification des bactériocines

Différentes classification des bactériocines ont été établies sur la base de leur structure primaire, la masse moléculaire, sensibilité enzymatique, mode d'action, la stabilité à la chaleur et la présence d'acides aminés postraductionnellement modifiés. La classification de **Klaenhammer (1993)** comprend quatre classes de bactériocines.

➤ **Classe I : Les lantibiotiques**

Il s'agit de peptides de faible poids moléculaires (<5 kDa et contenant de 19 à 34 acides aminés), contenant des acides aminés inhabituels obtenus par modification post-traductionnelle dont le plus caractéristique est la lanthionine, la β –méthyllanthionine et des acides aminés déshydratés comme la déshydrobutyrine et la déshydroalanine. Un de ces acides aminés caractéristiques, la lanthionine, est à l'origine du nom "lantibiotique" donné à cette classe de bactériocines pour «lanthionine-containing antibiotics» (**Willy et Van der Donk, 2007**).

➤ **Classe II : Peptides non modifiés**

La classe II est constituée des peptides hétérogène de petite taille moyenne en 5 et 10 KDa thermostables, cationique, hydrophobes et sans modification post-traductionnelle (**Eijsink et al., 2002 ; Sprules et al., 2004**).

Cette catégorie est la plus largement représentée avec plus de 50 bactériocines caractérisées, ce qui a conduit à la création de trois sous classes

- **Sous-classe IIa** : Elle contient les bactériocines semblables, du point de vue structural, à la pédiocine qui fut la première bactériocine de ce groupe être décrite. Ce sont des peptides qui contiennent entre 37 acides aminés comme la Sakacin G (**Simon et al., 2002**) et 55 acides aminés comme l'Acidocine A (**Tahara et al., 1996**). Elles ont toutes une partie N-terminale hydrophile et cationique contenant un pont disulfure et une partie C-terminal moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action. Certaines bactériocines de cette sous classe contiennent un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminal qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire (**Richard et al., 2006**)

- **Sous-classe IIb** : cette sous classe contient actuellement 16 bactériocines différentes (**Nissen-Meyer et al., 2009**). Elle comprend les bactériocines ayant besoin de

l'association de deux peptides pour avoir une activité optimale. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués :

- ✓ **Type E (Enhancing)** où uniquement l'un des deux peptides est actif seul mais la présence du deuxième peptide augmente considérablement l'action du premier comme par exemple pour l'entérotoxine L50A/L50B (**Cintas et al., 1998**). Ces peptides peuvent également être inactifs individuellement, comme c'est le cas pour la plantaricine JK (**Moll et al., 1999**).
- ✓ **Type S (Synergy)** où les peptides sont actifs individuellement mais leur activité sera maximale quand ils sont ensemble comme par exemple pour la Lactococcine G et Q (**Oppegard et al., 2007**)

• **Sous classe IIc** : Contient les bactériocines activées par réduction du groupement thiols telle que la lactococcine B (**klaenhammen, 1993**). La sous classe IIc a été dédiée aux bactériocines de la classe II ne peuvent pas être classées ni dans la sous classe IIa ni dans la IIb comme la mésentérotoxine 52B. Actuellement, cette sous classe contient les bactériocines cycliques comme la Circularine A (**Kemperman et al., 2003**).

• **Sous classe II d** : cette sous classe est proposée par **Cotter et al. (2005b)** pour regrouper les bactériocines linéaires ne présentant pas une similitude structurale avec la pédiocine comme la lactococcine A la divergicine A (**Nissen-Meyer et al., 2009**). D'autres auteurs comme **Nes et al. (2007)** ont proposé de regrouper dans cette sous classe les bactériocines de classe II dont les pré-peptides sont dépourvus de peptides-signal ou peptides-leader.

• **Sous classe II e** : Cette sous classe est proposée par **Nes et al. (2007)** pour contenir certaines peptides douées d'activité antibactérienne et qui sont issues de la dégradation de grosses protéines comme le cas de la propionicine F produite par *Propionibacterium freudenreichii*.

➤ **Classe III : les bactériocines de grande taille**

Cette classe regroupe les bactériocines thermolabiles à l'exception de la propionicine SM1 et ayant un haut poids moléculaire > 10 KDa (**Heng et al., 2007**). Toutefois ; plusieurs auteurs comme **Cotter et al. (2005b)** ne considèrent pas ces composés comme des bactériocines mais des enzymes bactériennes douées d'une activité lytique, ils les ont appelées «bactériolysines».

➤ Classe IV

Cette dernière classe est dédiée aux protéines requérant une partie carbohydratée non protéique (lipidique, polysaccharidique) pour avoir une activité antibactérienne comme la Plantaricine S (**Jiménez-Díaz *et al.*, 1995**). Cependant, puisqu'aucun de ces peptides n'a été co-purifié avec sa partie glucidique ou lipidique, l'existence de telles bactériocines est très contestée par plusieurs auteurs comme **Nes *et al.* (1996)**.

En 2003 **Kemperman *et al.*** ont proposé de mettre dans la classe IV les bactériocines cycliques récemment découvertes. Ces bactériocines sont actuellement classées dans la sous-classe IIc.

III.9. 3. Mode d'action des bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif sont dirigées en premier lieu contre d'autres espèces Gram positif. Cependant, dans certains cas, une activité contre des bactéries Gram négatif peut être observée (**Cotter *et al.*, 2005b**).

L'action des bactériocines sur les cellules sensibles passe par deux étapes : la première est l'adsorption des bactériocines sur l'enveloppe bactérienne. A ce stade, les bactériocines sont sensibles à l'action des protéases. La deuxième est irréversible et implique des changements létaux, dans les cellules cibles, spécifiques pour chaque bactériocine. Après la fixation, la majorité des bactériocines provoque une perturbation immédiate de la perméabilité de la membrane cytoplasmique des bactéries sensibles (**Marciset *et al.*, 1997**).

Les travaux menés par **Barrena-Gonzalez *et al.* (1996)** et **Martinez-Cuesta *et al.* (1997)** ont montré que les bactériocines, une fois adsorbées sur les bactéries sensibles, peuvent avoir trois effets différents :

- Un effet bactériostatique aboutissant à un ralentissement ou un arrêt de croissance bactérienne sans mortalité cellulaire. Une reprise de croissance est souvent observée après le contact entre les bactéries sensibles et la bactériocine.
- Un effet bactéricide où une mort cellulaire est observée mais les bactéries gardent leur intégrité physique, car il n'y a pas de lyse bactérienne.
- Un effet bactériolytique où la mort des bactéries est principalement due à une lyse cellulaire.

En raison de leur grande diversité structurale, les bactériocines peuvent affecter différentes fonctions essentielles de la cellule cible comme la biosynthèse de la paroi cellulaires, mais la plupart d'entre elles agissent en formant des pores dans la membrane cytoplasmique des cellules cibles, ce qui conduit à la mort cellulaire (**Twomey et al., 2002**).

IV. Effet antimicrobien des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont capables de produire une variété de composés inhibiteurs dont les effets peuvent se répercuter sur la flore lactique elle-même mais aussi sur la flore indésirable ou pathogène (**Piard et Desmazaud, 1991**).

Dans une étude menée par **Bogovič et al., (2007)**, il a été démontré que *Lb. gasseri* K7 produit une bactériocine inhibe la croissance de *Clostridium tyrobutyricum*. La nisine est aussi capable d'inhiber les genres : *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria* et *Clostridium* en particulier *Clostridium tyrobutyricum* responsable de la production de gaz dans les fromages semi solides (**Walstra et al., 2006**).

Les bactéries lactiques sont utilisées pour la lutte contre la prolifération des champignons et la formation de mycotoxine dans les produits alimentaires, destinés à la consommation humaine, les lactobacilles peuvent trouver d'autre application dans le domaine de l'alimentation de bétail. **Ström et al. (2002)** ont rapporté que *Lb. Plantarum* MiLAB 393 est capable de protéger les aliments de bétail contre *Fusarium sporotrichioides*, *Aspergillus fumigatus* et *kluyveromyces marxianus*, sans aucune addition d'additifs chimiques ou biologiques. D'un autre côté, *Lb. Acidophilus* ATCC20552 a été proposé comme un bioconservateur de graines de céréales, du fait de son effet antifongique contre *Aspergillus fumigatus* (**Elsanhoty, 2008**)

La nisine est additionnée à certaines lotions utilisée comme bain de bouche pour traiter la gingivite et prévenir les caries dentaire en inhibent les micro-organismes en cause. La nisine est aussi utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vu sa stabilité aux pH acides et son activité contre *Helicobacter pylori* (**Boakes et Wadman., 2008, Tong et al., 2010**).

Matériels et méthodes

I. Objectifs du travail

- Sélectionner des souches des bactéries lactiques douées l'activité antimicrobienne.
- Mise en évidence l'activité des souches des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes (des bactéries et des levures).

II. Origine des souches utilisées

Ce travail consiste à étudier l'activité antimicrobienne de certaines souches de bactéries lactiques à l'égard de quelques micro-organismes pathogènes

II.1. Souches tests

Les souches de bactéries lactiques (souches test) utilisées pour réaliser cette études sont des souches isolées à partir d'un fromage artisanal en 2017 et conservées à -18°C dans un bouillon MRS additionnée de 20% de glycérol.

Tableau I : les différentes souches de bactéries lactiques utilisées.

Souches	Identification
S2	<i>Lactobacillus aquaticus</i>
S4	<i>Lactobacillus nagelli</i>
S5	<i>Lactobacillus nagelli</i>
S6	<i>Lactobacillus nagelli</i>
S8	<i>Lactobacillus curvatus melibiosus</i>
S9	<i>Lactobacillus ghanensis</i>
S11	<i>Lactobacillus saniviri</i>
S12	<i>Lactobacillus nagelli</i>
S13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
S14	<i>Lactobacillus composti</i>
38	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>
S17	<i>Enterococcus phoeniculicola</i>
S18	<i>Lactococcus lactis subspructae</i>
S19	<i>Enterococcus avium</i>
S21	<i>Lactobacillus nagelii</i>
S22	<i>Lactobacillus nagelii</i>

S23	<i>Lactobacillus ghanensis</i>
S24	<i>Lactobacillus aquaticus</i>
S25	<i>Lactobacillus aquaticus</i>
S28	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
S29	<i>Lactobacillus nagelii</i>
S31	<i>Enterococcus avium</i>
S32	<i>Enterococcus faecium</i>
S34	<i>Enterococcus phoeniculicola</i>
S35	<i>Enterococcus malodorantus</i>
S40	<i>Lactobacillus plantarum</i>
S45	<i>Streptococcus parvulus</i>
S48	<i>Enterococcus termitis</i>
S50	Souche 50
S52	Souche 52

II.2. Souches cibles

Les souches pathogènes sont isolées à partir de prélèvements pathologiques (les urines, les selles, le pus), identifiés et conservées à 4°C dans un laboratoire médical de l'établissement public hospitalier EL ZAHRAOUI M'SILA Algérie.

L'identification faite par la coloration du Gram et la galerie biochimique.

Tableau II : Différentes souches pathogènes utilisées.

Souches cibles	Origine
<i>Salmonella sp</i>	Selle
<i>Citrobacter koseri</i>	Urine
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pus
<i>Pseudomonas sp</i>	Urine
<i>Klebsiella sp</i>	Urine
<i>Providencia sp</i>	Urine
<i>Escherichia coli</i>	Urine
<i>Proteus mirabilis</i>	Urine
<i>Staphylococcus aureus</i>	Urine
<i>Candida albicans</i>	Prélèvement buccal

<i>Candida sp</i>	Prélèvement vaginal
-------------------	---------------------

II.3. Revivification et vérification de la pureté des souches conservées

La revivification des souches consiste à la repiquer successivement sur des milieux appropriés, puis à l'incuber jusqu'à l'obtention d'une culture fraîche.

Les souches des bactéries lactiques ont été décongelée, puis revivifiées par repiquages successifs sur bouillon MRS, ensuite incubé 24H à 37°C, l'incubation peut prolongée lorsque il n'y a pas des troubles jusqu'à l'obtention d'une bonne croissance.

Les souches cibles sont isolées, purifiées et conservées sur gélose nutritive à +4°C. Avant leur utilisation dans les tests d'inhibition, elles sont repiquées sur bouillon nutritif et incubées 18 heures à 37 °C.

La pureté des souches lactiques ainsi que pathogènes a été vérifiée par la réalisation du test de catalase et la coloration de Gram.

III. Standardisation des inocula bactériens

Afin de comparer le pouvoir antimicrobien des différentes souches lactiques utilisées et de s'assurer la fiabilité du résultat, il est indispensable de connaître la charge de départ des souches cibles pour cela une standardisation des souches est effectué comme suite :

- une boîte de Pétri contenant de la gélose nutritif estensemencée avec une culture fraîche de la souche à standardiser et incubée 24h à 37°C.
- 2 colonies bien isolées sont mises dans 9mL de bouillon nutritif respectivement puis incubée à 37°C pendant 24h.
- A partir de ces cultures, des dilutions (jusqu'à 10^{-9}) sont réalisées dans de l'eau physiologique, puis un ensemencement en masse est effectué à partir de la dilution 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} . Les boîte sont incubées à 37°C/24. Après incubation, les colonies sont dénombrées et le nombre est exprimé en UFC/ml. La figure 2 représente les étapes de standardisation de l'inoculum des souches cibles.

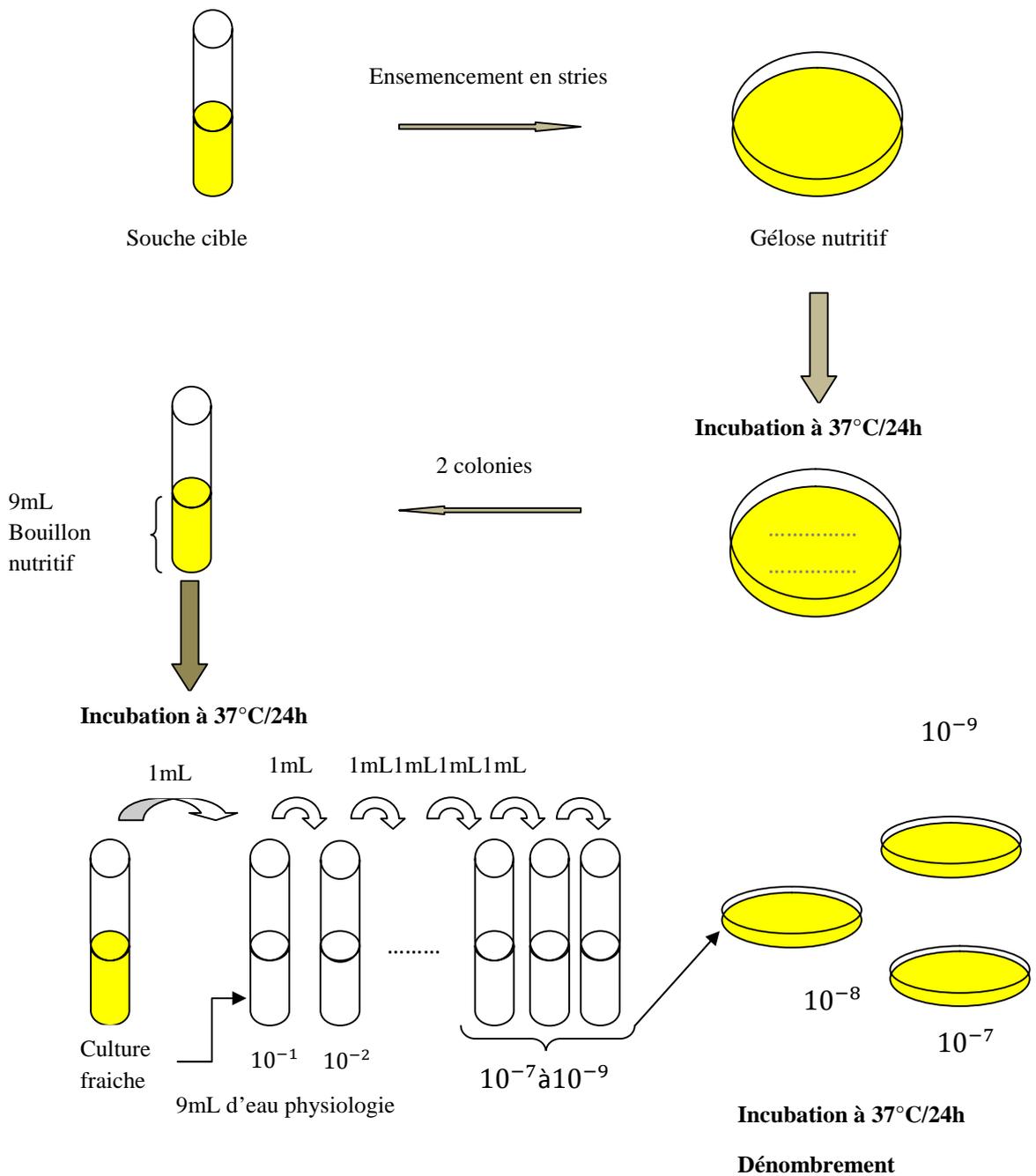


Figure 2 : Standardisation des inocula des bactéries pathogènes.

IV. Etude de l'activité antimicrobienne des souches lactiques

Il s'agit de chercher l'activité antimicrobienne des souches des bactéries lactiques. Cette étude est réalisée par deux méthodes : spots et puits.

IV.1. Méthode de spots.

La méthode de spot, est utilisée pour l'observation des zones d'inhibitions. Ce test consiste à déposer un volume de 5µL d'une culture fraîche de 24h de chaque souche lactique sur une gélose MRS. Le même volume de bouillon MRS stérile est aussi déposé comme témoin négatif. Les boîtes sont laissées à température ambiante pour permettre le séchage des spots, avant de les incuber à 37°C pendant 24h. En parallèle, une culture fraîche de bactérie pathogène à tester est préparée en la cultivant dans 9mL du bouillon nutritif et incubée à 37°C pendant 18h.

Après l'incubation, 9mL de gélose nutritif en surfusion sont inoculés par la souche cible après une dilution de 10^{-2} . Puis, le mélange est ensuite coulé sur la couche de MRS, en contact direct avec les spots. Les boîtes sont incubées à 37°C/ 24h. Ce test est répété 2 à 3 fois pour chaque souche cible. L'activité antibactérienne se révèle par l'apparition de zones claires autour des spots. L'inhibition est considérée positive si la zone dépasse 10 mm de diamètre.

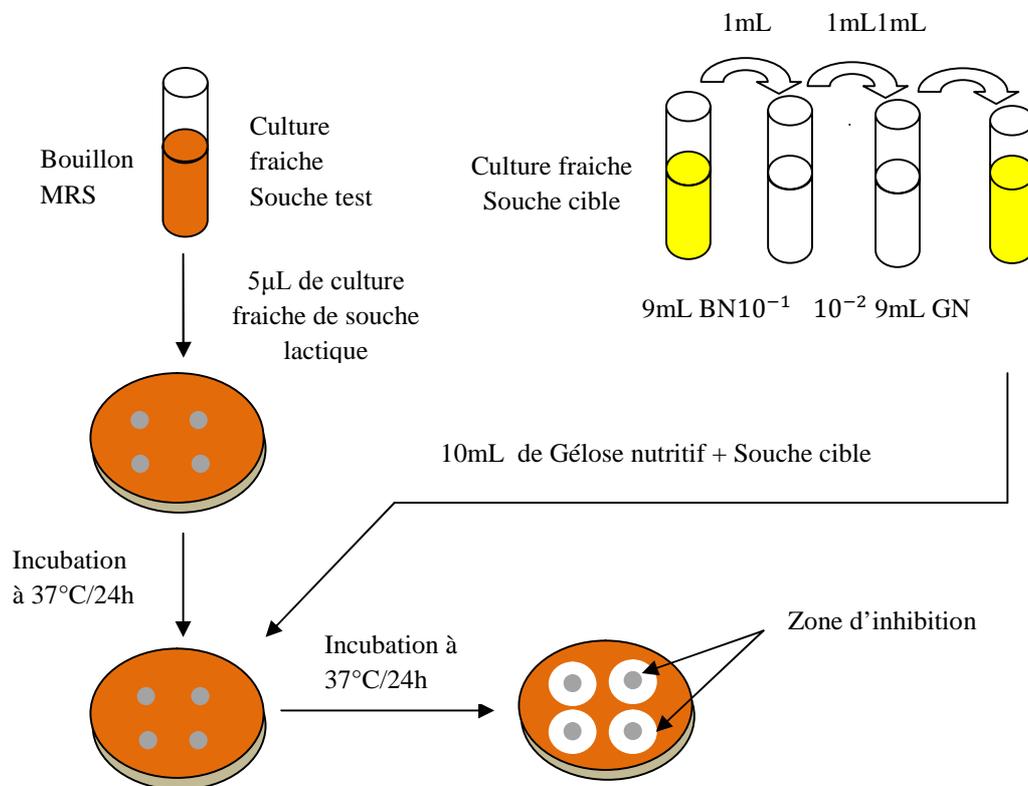


Figure 3 : Méthode de spots (Fleming et al.,1975).

IV. 2. Méthode des puits

l'activité antibactérienne dans les surnageant des souches des bactéries lactiques est testée par la méthode des puits décrit par **Cintas *et al.*, (1995)**. Cette méthode consiste à mettre le surnageant de la souche de bactérie lactique en contact avec la souche cible pathogène. Les souches lactiques produisent des substances pouvant diffuser dans le milieu de culture solide. Les bactéries lactiques sont repiquées dans le milieu MRS liquide et incubées à 37°C 24h. Après incubation une centrifugation réfrigérée est réalisée à 6000 tr /min pendant 20 min à 4°C. Des puits de 6mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide de pipette Pasteur sur la gélose nutritif inoculé par la souche cible (pathogène).Ensuit, les puits sont remplis par 100µl du surnageant à tester. Les boîtes sont mises à 4°C /2h pour permettre la bonne diffusion de la substance antimicrobienne puis incubées à 37°C/24h (Figure 4).la lecture se fait par la mesure du diamètre en mm des zones inhibition formées autours des puits. Les résultats son considérée positive si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 10mm.

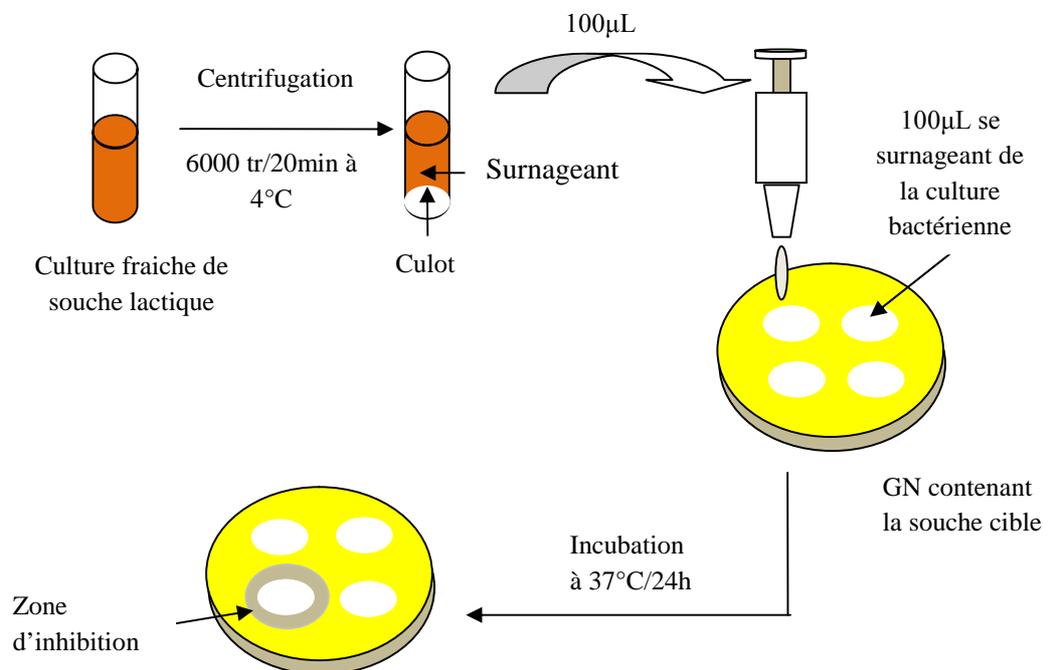


Figure 4 : les étapes de réalisation de test des puits.

Résultats et discussion

I. Caractéristiques des isolats

I.1. Bactéries lactiques

I.1.1. Caractères cultureux

Sur gélose MRS, ces bactéries apparaissent en petites colonies muqueuses de tailles variables arrondies de forme lenticulaire avec une couleur blanchâtre à jaunâtre sur milieu, elles donnent un trouble homogène sur milieu liquide. La figure 5 présente l'aspect d'une culture fraîche des souches de bactéries lactiques sur gélose MRS.

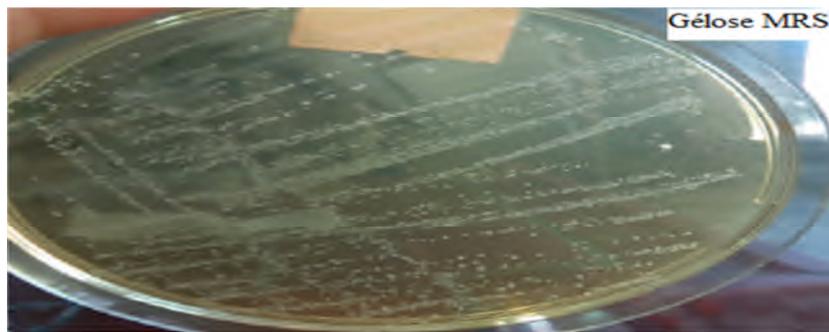


Figure 5 : Aspect des bactéries lactiques sur le milieu MRS

I.1.2. Caractères microscopiques

Après la coloration de Gram. L'aspect microscopique des souches a révélé deux formes de cellules : coques et bâtonnets. La figure 6 présente l'aspect d'une souche de bactérie lactique sous microscope optique ($G \times 100$) (ZEISS West Germany).

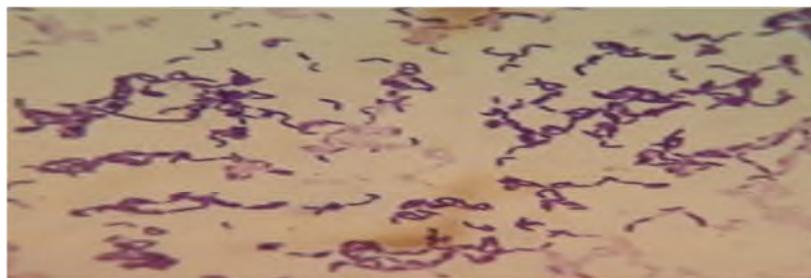


Figure 6 : Aspect microscopique de la souche *Streptococcus parvulus* sous microscope optique.

I.1.3. Test catalase

Le test catalase a été négatif sur toutes les souches des bactéries lactiques. Les bactéries à Gram positif et catalase négatif sont supposés être des bactéries lactiques.

I-2 souches pathogènes

Pour les tests d'activité antimicrobienne, nous avons utilisé onze (11) souche pathogènes, elles ont été isolées et identifiées à partir des prélèvements pathologiques. Les aspects microscopiques et les résultats des tests biochimiques des bactéries pathogènes à Gram négatif sont présentés dans le tableau III.

Tableau III : Aspect microscopique et résultats des tests biochimique

Bactérie	Aspect	G	Mobilité	LAC	ONPG	IND	VP	Citrate	Urée	H ₂ S	catalase
<i>Citrobacter koseri</i>	Bacille	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>E.coli</i>	Bacille	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>Klebsiella sp</i>	Bacille	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	Bacille	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Providencia sp</i>	Bacille	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>Pseudomonase sp</i>	Bacille	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>P. aeruginosa</i>	Bacille	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
<i>Salmonella sp</i>	Bacille	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+

(-) si Caractères négatifs

(+) si Caractères positifs

L'identification de *S.aureus* est faite par l'examen microscopique qui a montré des Cocci à Gram positive groupés en amas, immobile. Les caractères biochimiques sont catalase(+), oxydase (-) et fermente le mannitol.

L'identification de *Candida sp* ou de *Candida albicans* est réalisée avec un avec un examen direct sur un milieu sabouraud suivi par une autre culture sur un milieu Rice cream de 24h à 48h sous 27 °C.

- *Candida sp* : sous le microscope optique (G×40). elle donne des pseudomycélium et des blastospores (figure 8), elle fermente des sucre et elle résiste à l'actidione.

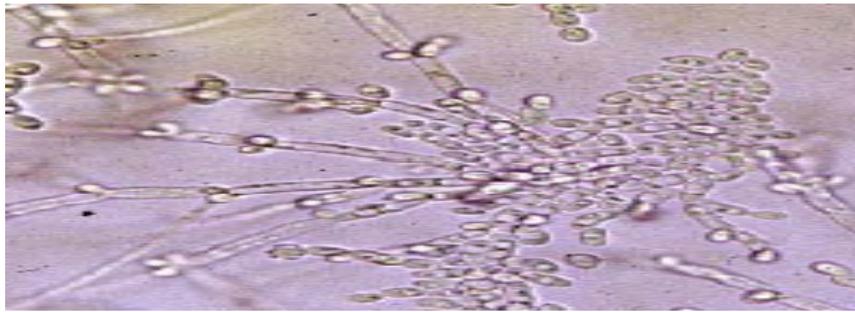


Figure 7 : Aspect des blastospores de *Candida sp* sous le microscope optique (G×40).

- *C.albicans* : sous microscope optique (G×40) des pseudofilaments et des chlamydospores (figure 9).

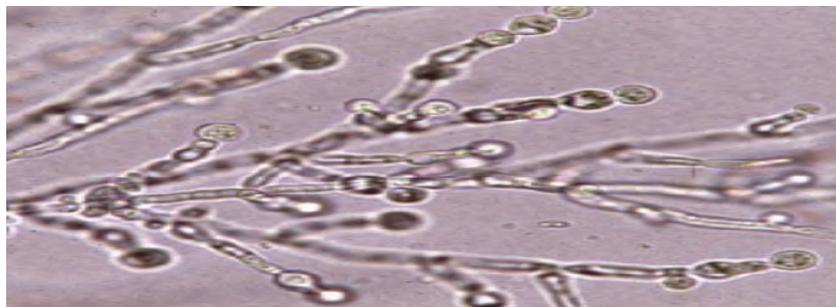


Figure 8 : Aspect des chlamydospores de *C.albicans* apparues sous microscope optique (G×40).

II. Standardisation des inocula

Le but de cette étape est de pouvoir travailler avec une même charge bactérienne dans 1mL de culture durant toutes les étapes de ce travail. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : Résultats de la standardisation des bactéries lactiques et pathogènes.

Souches	Nombre de cellules (UFC/ml)
<i>Salmonella sp</i>	2.10^9
<i>Citrobacter koseri</i>	$1,2.10^8$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$1,3.10^8$
<i>Pseudomonas sp</i>	$1.2.10^8$
<i>Klebsiella sp</i>	10^9

<i>Providencia sp</i>	$1,2.10^9$
<i>Escherichia coli</i>	$1,6.10^8$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1,5.10^9$
<i>Candida albicans</i>	10^8
<i>Candida sp</i>	$1,8.10^8$
<i>Proteus mirabilis</i>	1.10^8

III. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des spots

Le test de spots a été réalisé pour 30 souches de bactéries lactiques dans le but de sélectionner les souches qui ont une activité antimicrobienne.

III.1. Test des spots à l'égard de *S.aureus*

Ce test a montré que 24 souches parmi les 30 souches étudiées sont douées d'activité antibactérienne vis-à-vis la souches *S.aureus*, avec des zones d'inhibition de diamètres différents allant de 20mm à 33mm, alors que les souches 35, 21, 50, 14,45 et 9 ne révèlent aucun activité antibactérienne à l'égard de *S.aureus*. La meilleure activité a été observée avec la souche 40(*Lactobacillus plantarum*)(ZI=33mm).

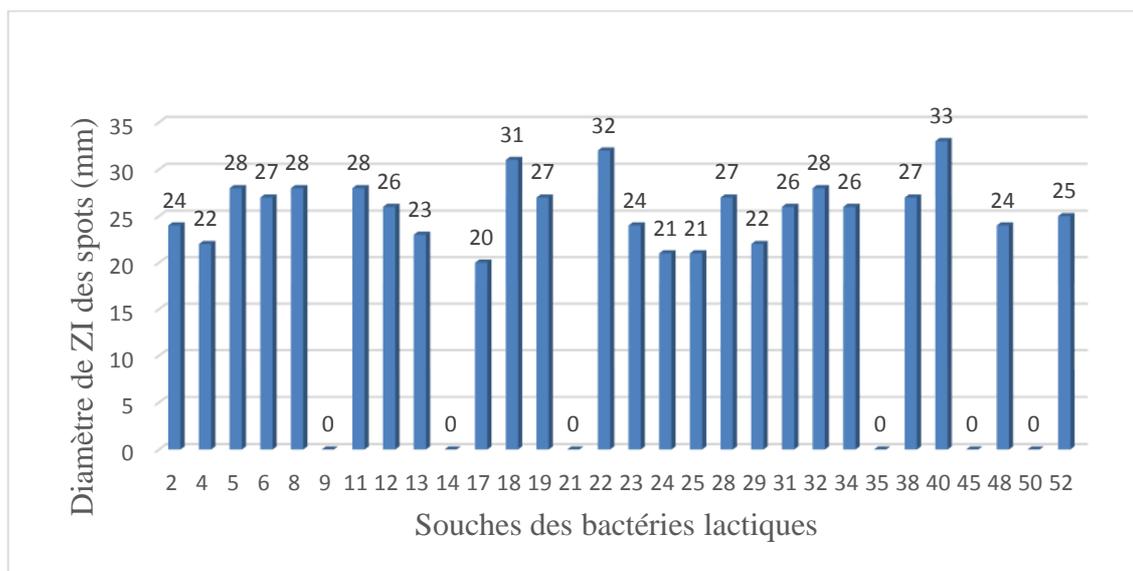


Figure 9 : Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des spots à l'égard de *S.aureus*



Figure 10 : Résultats du test de spots à l'égard de *S.aureus*.

III.2. Test des spots à l'égard d'*E.coli*

Le test de spots a montré que 20 souches parmi les 30 souches étudiées sont douées d'activité antibactérienne vis-à-vis la souche *E.coli*, avec des zones d'inhibition allant de 25mm à 36mm, alors que les souches 25,17,34,21,35,45,29,9,50 et 40 ne révèlent aucune activité antibactérienne à l'égard de *E.coli*. La grande zone d'inhibition a été observée avec la souche 12(*Lactobacillus nagelli*)(ZI=36mm).

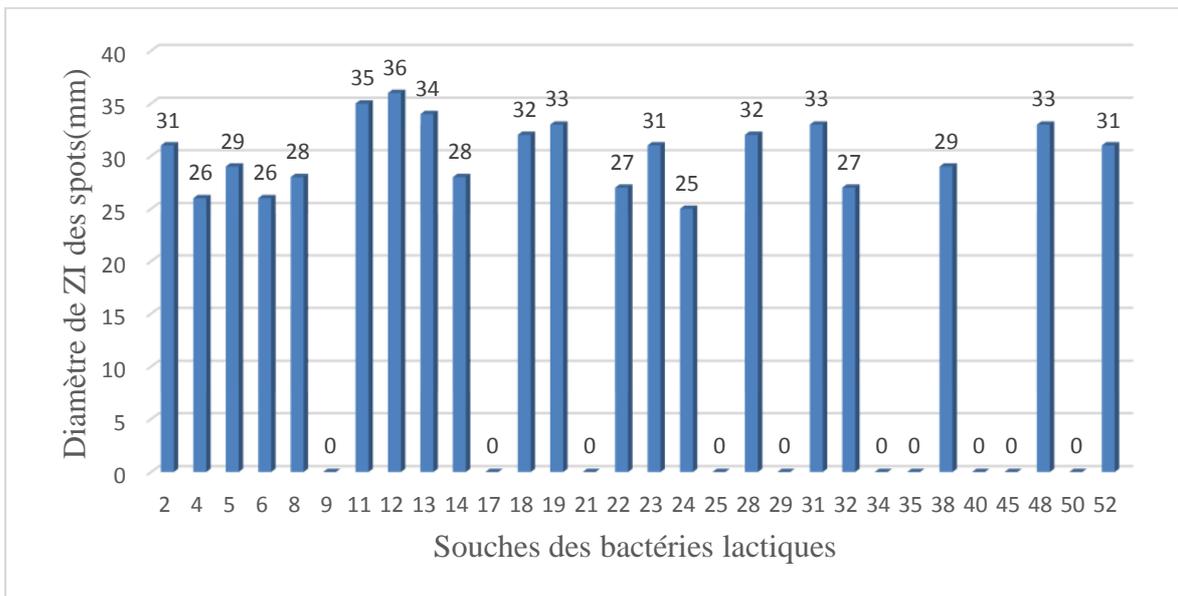


Figure 11 : Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des spots à l'égard d'*E.coli*.



Figure 12 : Résultats du test des spots à l'égard d'*E.coli*.

III.3. Test des spots à l'égard de *Candida albicans*

Les résultats du test des spots montrent que 20 souches des bactéries lactiques ont montré une faible activité antifongique à l'égard de *Candida albicans*, alors que les souches 14, 35, 48, 21, 17, 50, 45,9 et 23 ne révèlent aucune activité antifongique. La figure 14 présente un exemple des zones d'inhibitions obtenues.

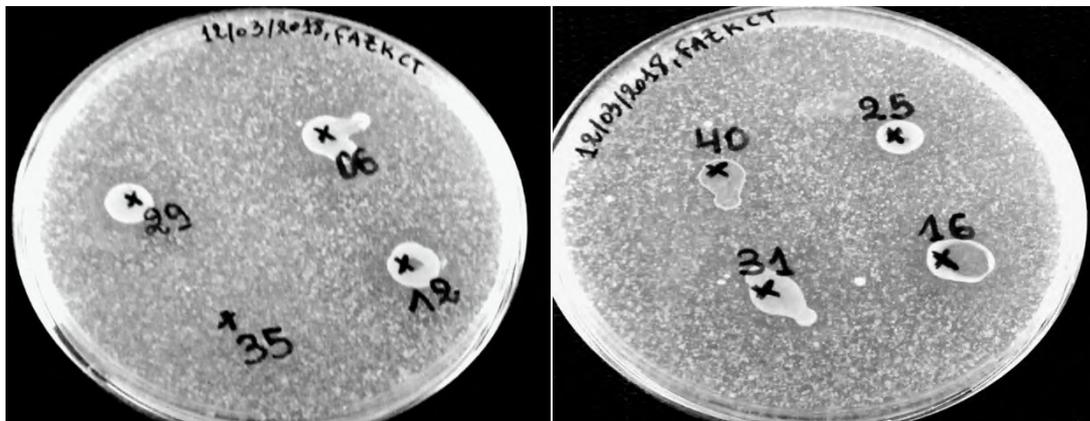


Figure 13 : Résultats du test des spots à l'égard de *C. albicans*

Les résultats obtenus avec le test des spots montre que vingt-cinq souches parmi les trente souches testées, ont présenté une activité antimicrobienne contre au moins un des souches cibles testés. Cependant, les souches 50,35,45,9 et 21 ne révèlent aucune activité antimicrobienne détecté contre toutes les souches testées *S. aureus*, *E. coli* et *Candida albicans*.

Des résultats similaires ont été rapportés par **Bouadjaib (2013)** et par **Madi (2010)** dans leur travail où les souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits laitiers ont montré une activité à l'égard de ces bactéries pathogènes. 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. Selon les travaux de Labioui et al., (2005) la zone d'inhibition des bactéries lactiques à l'égard de *E. coli* varie entre 22,5 et 31,5 mm. Ces valeurs sont similaires aux valeurs obtenues dans notre étude. Atanassova et al., (2003), Lozo et al., (2007) ont rapporté que de nombreuses souches de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* isolées de différentes niches écologique, ayant un large spectre d'activité sur des bactéries Gram positif et Gram négatif et même sur des levures.

IV. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des puits

L'effet antibactérien des surnageants des cultures des bactéries lactiques étudiées est mis en évidence par l'apparition des zones d'inhibitions (zone claire) autour des puits. La lecture de l'activité inhibitrice se fait par la mesure des diamètres d'inhibitions autour des puits (Zi), exprimée en mm.

IV.1. Test des puits à l'égard de *S. aureus*

Les résultats de test des puits ont montré que 19 souches de bactéries lactiques présentent une activité plus ou moins importante à l'égard de *S. aureus*, avec des zones d'inhibition allant de 13mm à 19mm. Cependant les souches 6, 23, 13,28, 40 et 52 ne révèlent aucune activité antibactérienne contre *S. aureus*. La plus grande zone d'inhibition a été observée avec la souche 2 (*Lactobacillus aquaticus*) avec ZI=19mm. (figure 15)

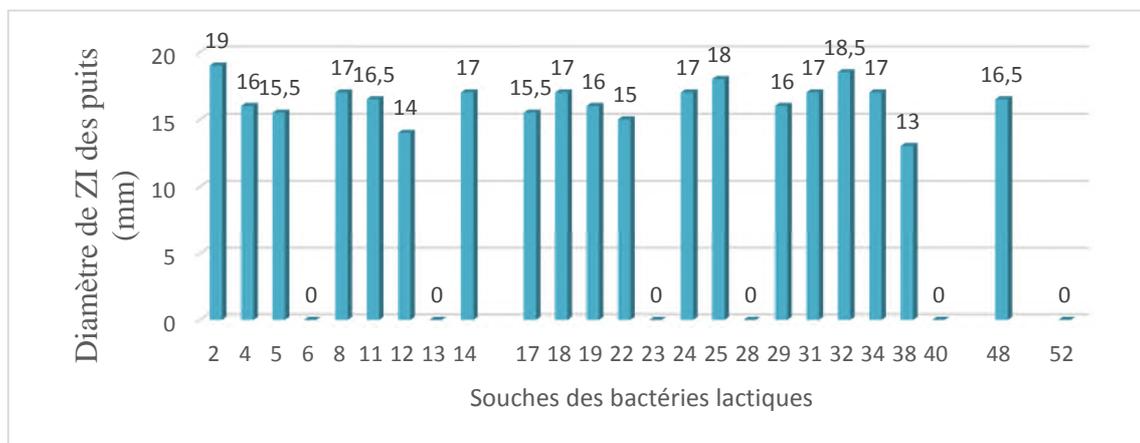


Figure 14: Diamètres des zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de *S.aureus*.



Figure 15: Résultats du test des puits à l'égard de *S. aureus*.

IV. 2. Test des puits à l'égard d'*E. coli*

Le test d'activité antimicrobienne a montré que 21 souches de bactéries lactiques exercent une activité plus ou moins importante à l'égard d'*E. coli*, cette activité est révélée par l'apparition des zones d'inhibition de 13mm à 17mm. Les souches 8, 17, 40 et 52 ne présentent aucune activité anti *Escherichia coli*. La meilleure activité inhibitrice a été observée avec la souche 12 (*Lactobacillus nagelli*) avec $ZI=17$ mm. La figure 17 représente les résultats de test des puits à l'égard d'*E. coli*.

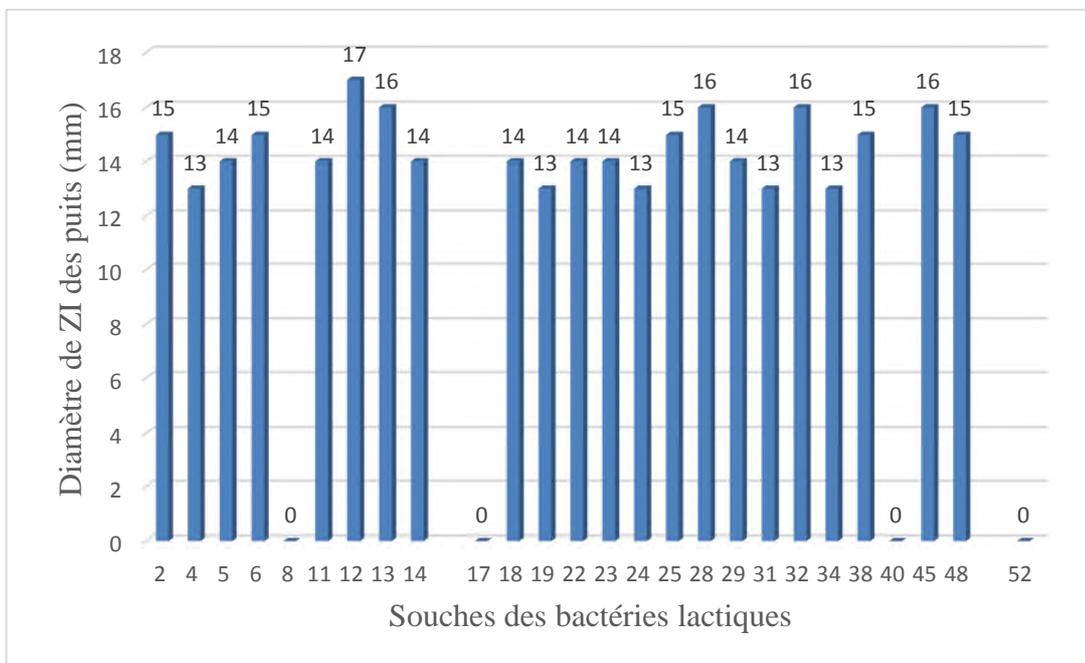


Figure 16 : Diamètres des zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard d'*E. coli*.

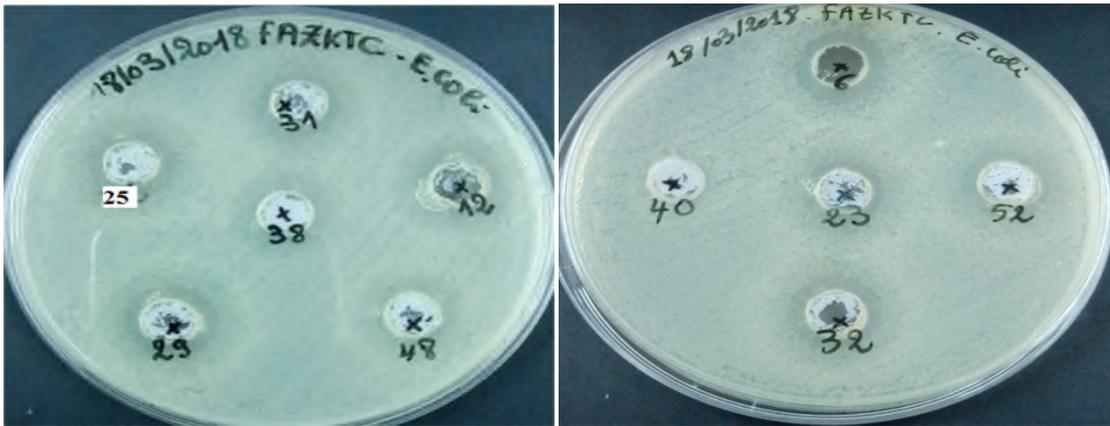


Figure 17: Résultats du test des puits à l'égard d'*E. coli*.

IV. 3. Test des puits à l'égard de *Candida albicans*

Les résultats de test des puits ont montré que, toutes les souches de bactéries lactiques testées ne révèlent aucune activité antifongique à l'égard de *Candida albicans*.



Figure 18 : Résultats du test des puits à l'égard de *Candida albicans*

IV. 4. Test des puits à l'égard de *Candida sp*

Selon les résultats de test des puits, les souches 6,8, 11, 12, 18, 24 et 32 montrèrent une activité importante à l'égard de *Candida sp*, cela est révélé par l'apparition des zones d'inhibitions de 19mm à 22mm. Les souches 29, 38, 14, 31 et 5 ont présenté une activité plus ou moins importante avec des zones d'inhibition allant de 13mm à 17mm. Néanmoins les souches 28, 23, 22, 40, 34, 25, 13, 4, 2, 52, 48, 19 et 17 ne présentent aucune activité antibactérienne contre *candida sp*. La figure 20 représente les résultats de test des puits à l'égard de *Candida sp*.

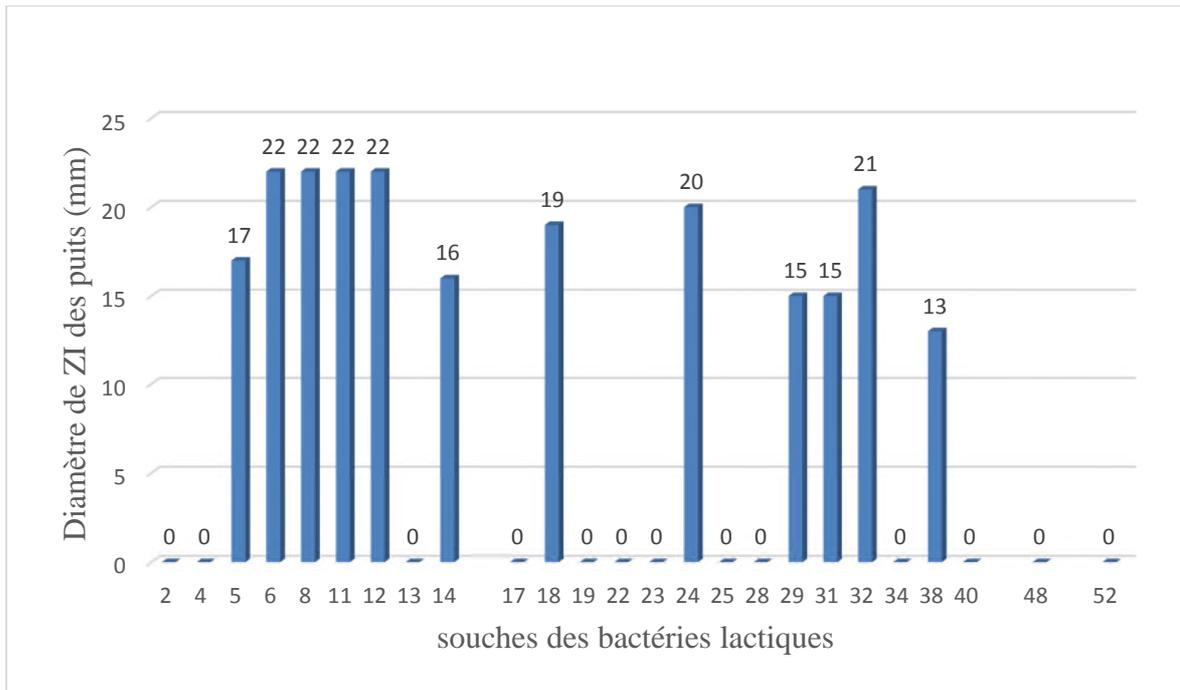


Figure 19 : Diamètres des zones d’inhibition obtenues par le test des puits à l’égard de *Candida sp.*



Figure 20: Résultats obtenus par le test des puits à l’égard de *candida.*

IV. 5. Test des puits à l’égard de *Citrobacter koseri*

La méthode des puits ont montré que 19 souches de bactéries lactiques exercent une activité plus ou moins importante à l’égard de *Citrobacter koseri* avec des zones d’inhibition allant de 12mm à 17mm de diamètre. Cependant les souches 52, 23, 40, 34, 48 et 32 ne révèlent aucune activité inhibitrice contre *Citrobacter koseri*. La plus grand zone d’inhibition a été observée avec les souches 6 (*Lactobacillus nagelli*) et 25 (*Lactobacillus aquaticus*) avec ZI=17mm. (figure 22)

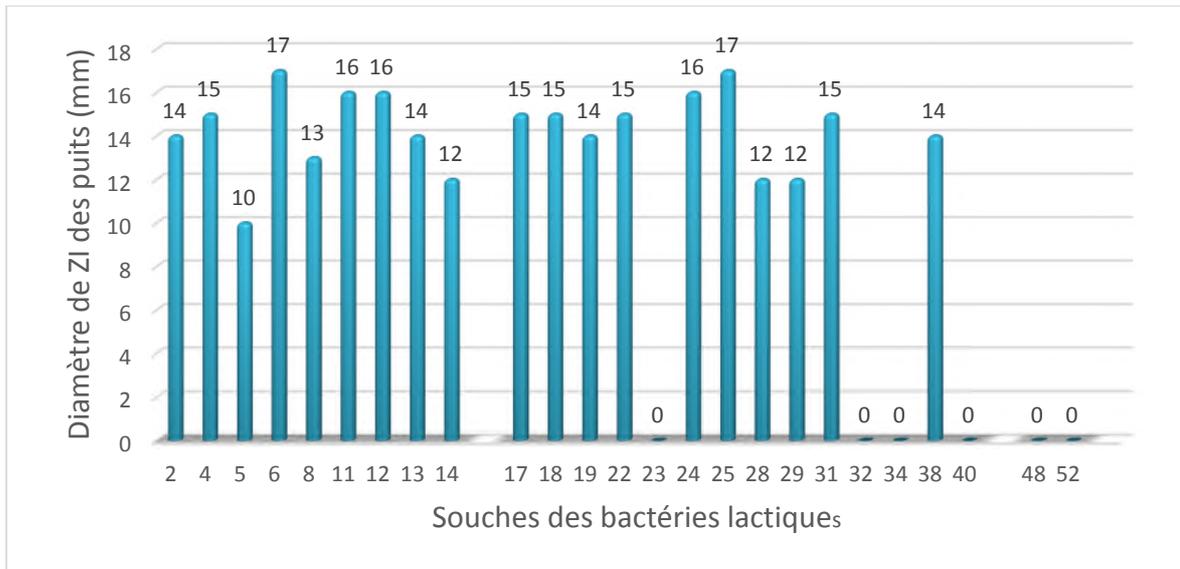


Figure 21: Diamètres des zones d’inhibition obtenues par le test des puits à l’égard de *Citrobacter koseri*



Figure 22: Résultats du test des puits à l’égard de *Citrobacter koseri*.

IV. 6. Test des puits à l’égard de *Salmonella sp*

D’après les résultats présenté par la figure 24 les souches 32, 17, 8, 19, 24, 11, 6, 4, 2, 31, 12 et 18 présentent une activité contre *salmonella sp* avec des zone d’inhibition allant de 13mm à 20mm de diamètre. Cependant aucune activité contre *Salmonella sp* n’a été détectée avec les souches 52, 29, 14, 38, 28, 23, 22, 40, 25, 34, 13, 5 et 48. La meilleure zone d’inhibition a été observée avec la souche 32(*Enterococcus faecium*) avec ZI=20mm.

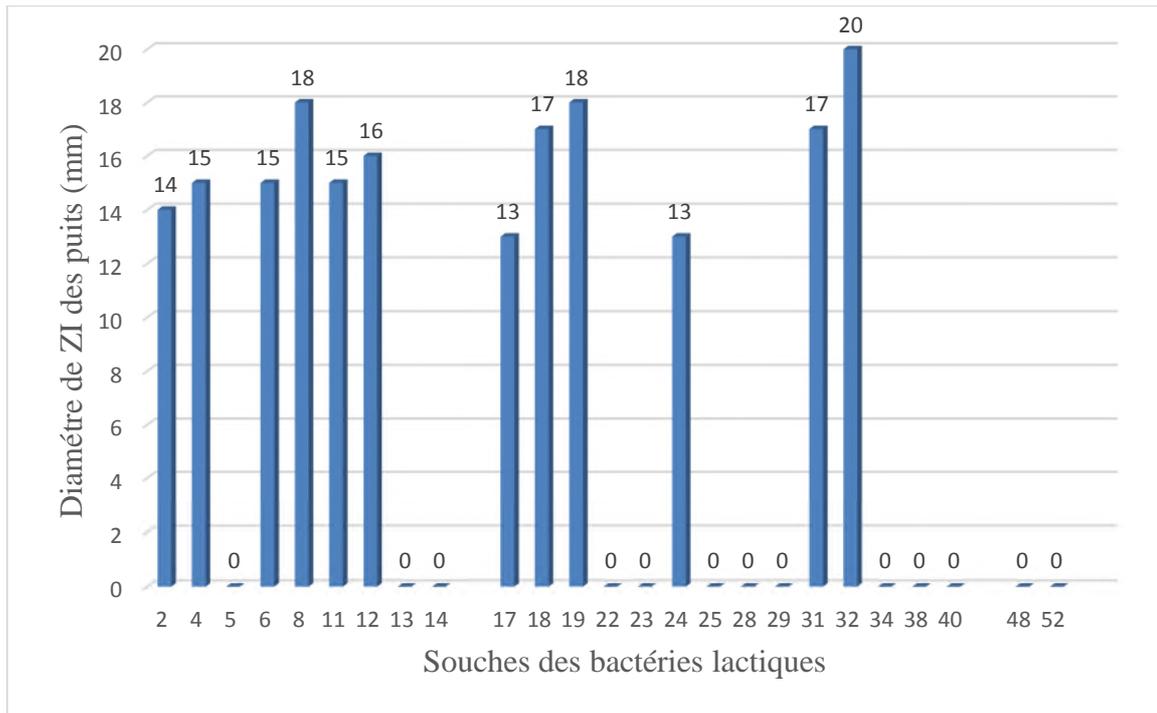


Figure 23: Diamètres des zones d’inhibition obtenues par le test des puits à l’égard de *Salmonella sp.*



Figure 24: Activité des bactéries lactiques à l’égard de *Salmonella sp.*

IV. 7. Test des puits à l’égard de *klebsiella sp*

Le test des puits a démontré que 17 souches de bactéries lactiques présentent une activité plus ou moins importante à l’égard de *Klebsiella sp*, cette activité est révélée par l’apparition des zones d’inhibition de 12mm à 16mm. Les souches 52, 31, 23, 40, 34, 11, 48 et 32 ne présentent pas une activité antibactérienne à l’égard de *Klebsiella sp*. La meilleure activité inhibitrice a été observée avec les souches 22 (*Lactobacillus nagelii*) et

25 (*Lactobacillus aquaticus*) avec ZI=16mm. La figure 26 présente les résultats de test des puits à l'égard de *Klebsiella sp.*

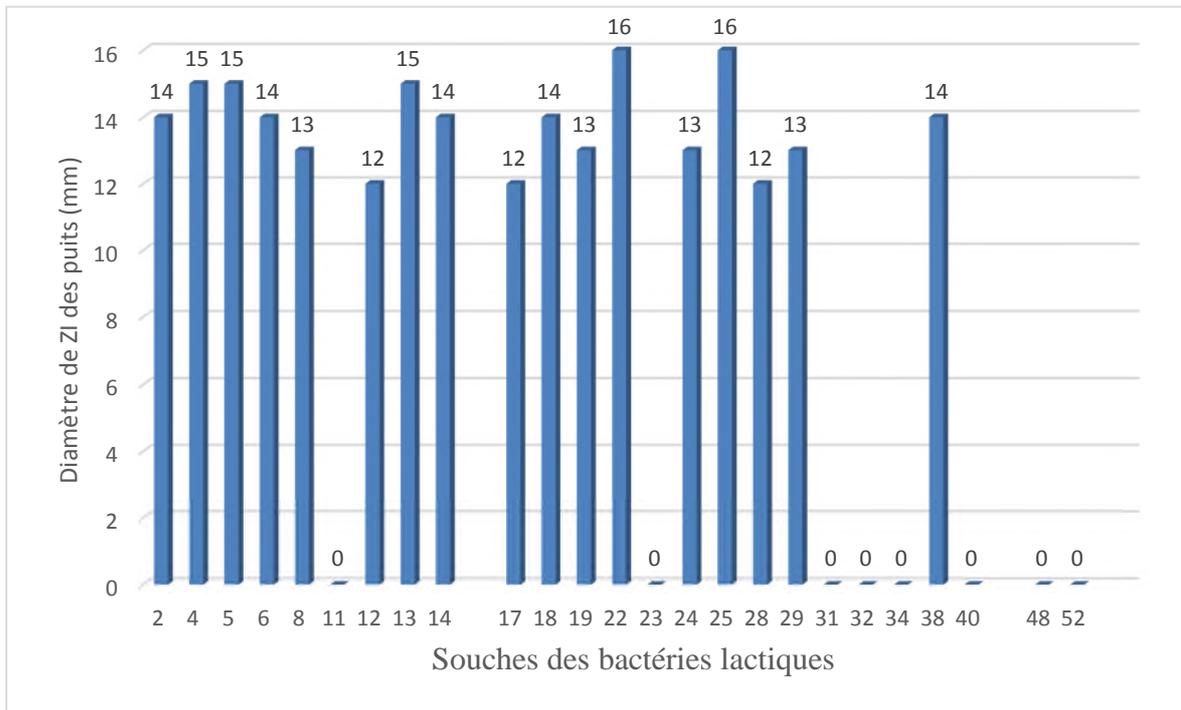


Figure 25 : Diamètres des zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de *Klebsiella sp.*



Figure 26: Activité des bactéries lactiques à l'égard de *Klebsiella s p.*

I V. 8. Test des puits à l'égard de *P. aeruginosa*

Les résultats de test des puits montrent que 21 souches de bactéries lactiques révèlent une activité antibactérienne à l'égard de *P. aeruginosa*, cela est présenté par l'apparition des zones d'inhibition allant de 13mm à 21mm, alors que les souches 32, 48,

29 et 52 ne présentent aucune activité antibactérienne contre *P. aeruginosa*. La meilleure activité antibactérienne a été observée avec la souche 12 (*Lactobacillus nagelli*) avec ZI=21mm. La figure 28 présente les résultats de test des puits à l'égard de *P. aeruginosa*.

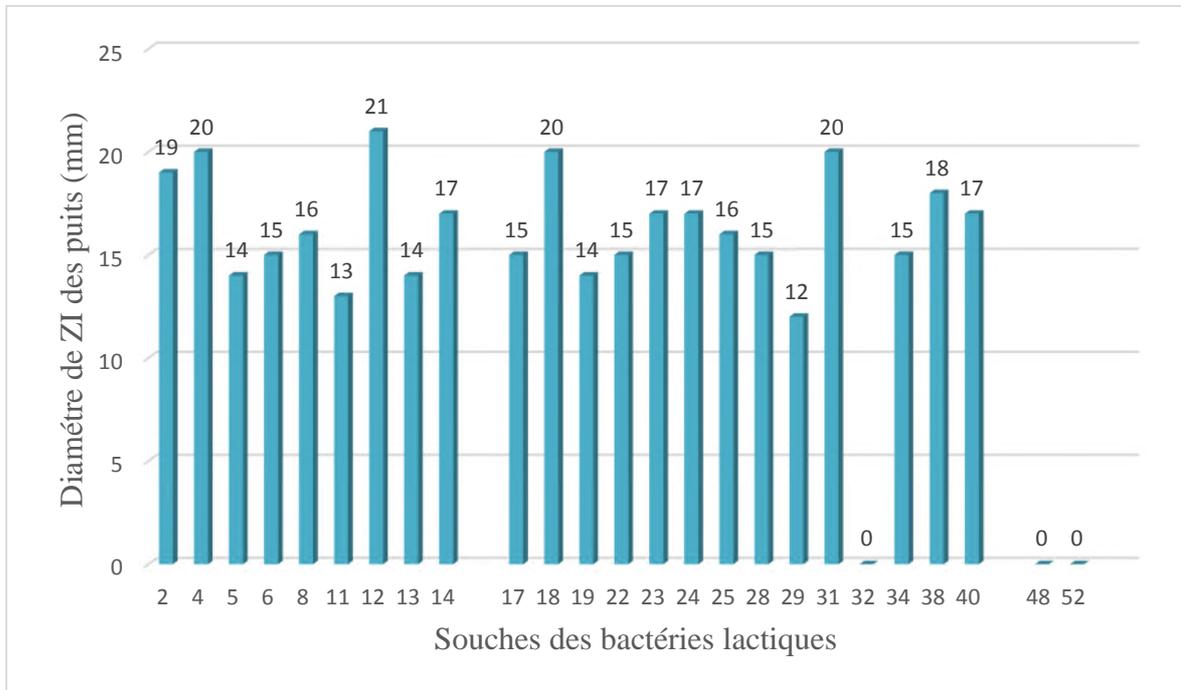


Figure 27: Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de *P.aeruginosa*.

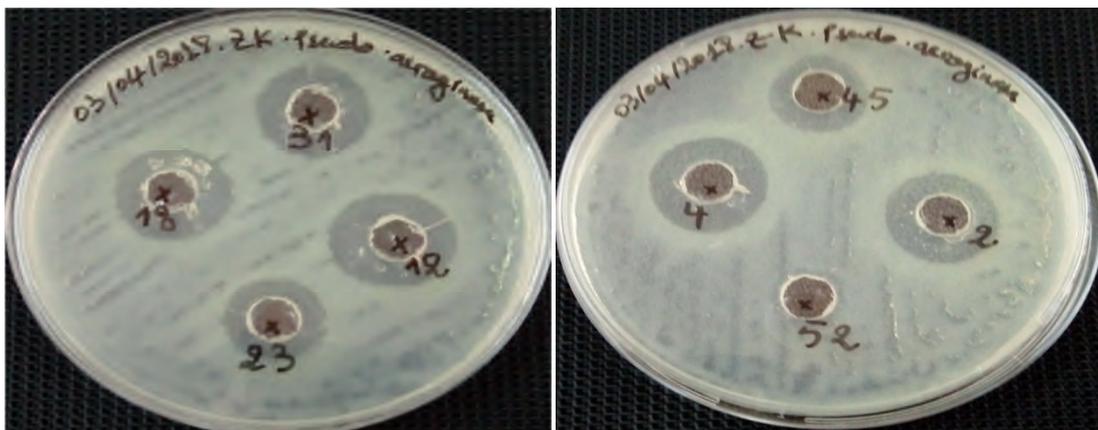


Figure 28 : Activité des bactéries lactiques à l'égard de *P. aeruginosa*.

IV. 9. Test des puits à l'égard de *Proteus mirabilis*

Le test des puits à l'égard de *proteus mirabilis* a montré que 21 souches de bactéries lactiques présentent une activité importante avec des zones d'inhibition de

diamètre différent allant de 12mm à 27mm. Cependant les souches 28, 38, 48 et 52 ne révèlent aucune activité antibactérienne contre *Proteus mirabilis*. La plus grand zone d'inhibition a été observée avec la souche 24 (*Lactobacillus nagelii*) avec ZI=27mm. (figure 30)

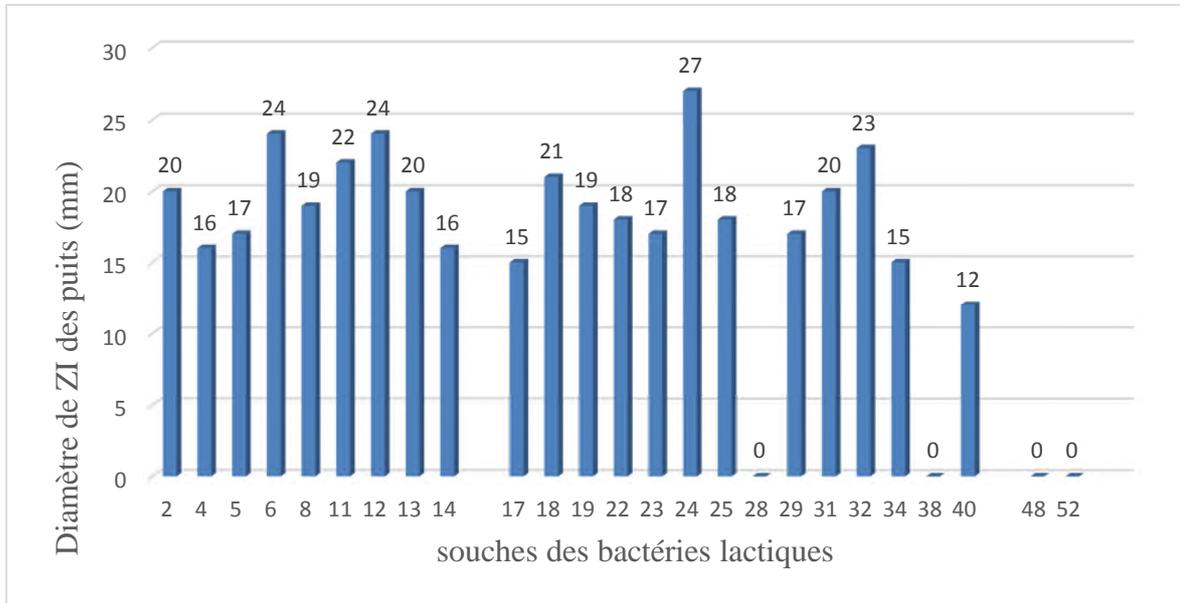


Figure 29 : Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de *Proteus mirabilis*

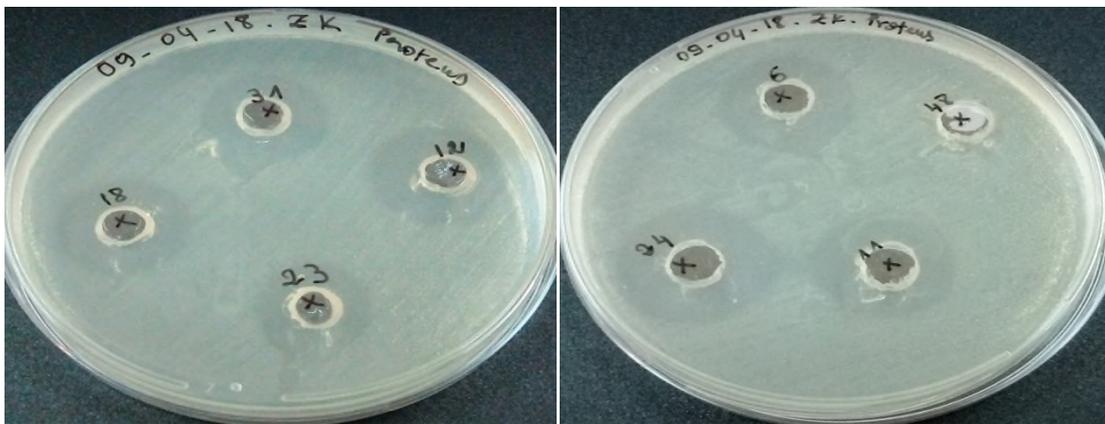


Figure 30: Activité des bactéries lactique à l'égard de *Proteus mirabilis*.

IV. 10. Test des puits à l'égard de *Providencia sp*

Le test des puits montre que 15 souches de bactéries lactiques testées présentent une bonne activité à l'égard de *Providencia sp*, cette activité est révélée par l'apparition des zones d'inhibition de 15mm à 29mm de diamètre. Néanmoins, les souches 6, 48, 17, 23, 52, 29, 38, 28,22 et 40 ne montrent aucune activité antibactérienne contre *Providencia*

sp. La meilleure activité antibactérienne a été observé avec la souche 4 (*Lactobacillus nagelli*) avec ZI=29mm. La figure 32 présente les résultats de test des puits à l'égard de *Providencia sp.*

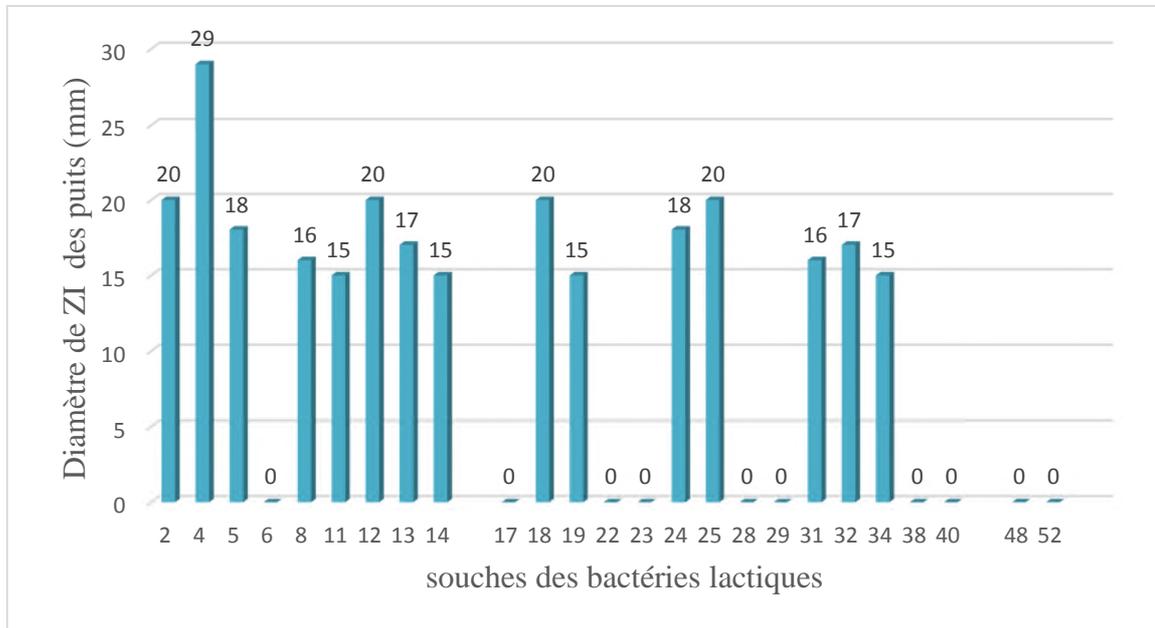


Figure 31 : Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de *Providencia sp.*

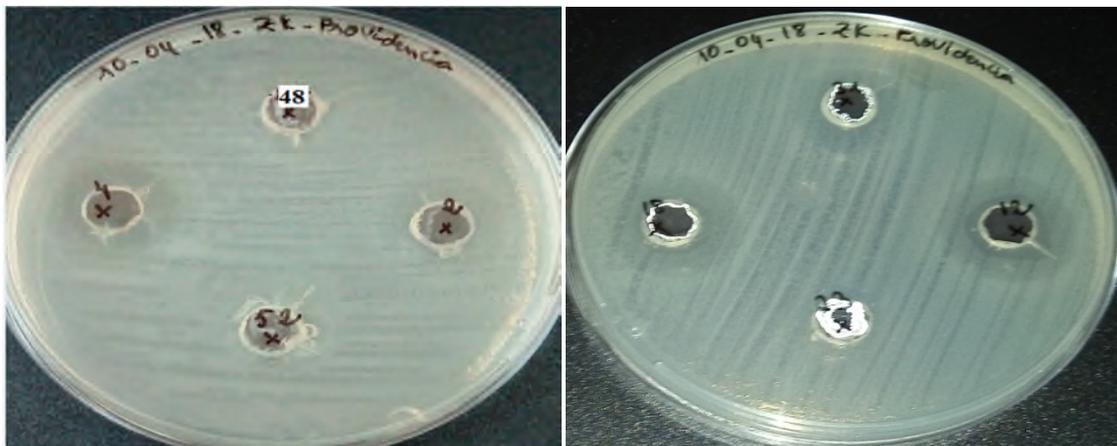


Figure 32 : Activité des bactéries lactiques à l'égard de *Providencia sp.*

IV. 11. Test des puits à l'égard des *Pseudomonas sp*

Selon les résultats de test des puits , 22 souches de bactéries lactiques montrent une activité antibactérienne à l'égard de *Pseudomonas sp*, cette activité est révélée par l'apparition de zones d'inhibition de diamètres différents allant de 13mm à 20mm.

Cependant les souches 52, 38, 23, 40, 17, 19, 48 et 28 ne présentent aucune activité inhibitrice contre *Pseudomonas sp.* La plus grande zone d'inhibition a été observée avec la souche 5 (*Lactobacillus nagelli*) avec ZI=20mm (figure34).

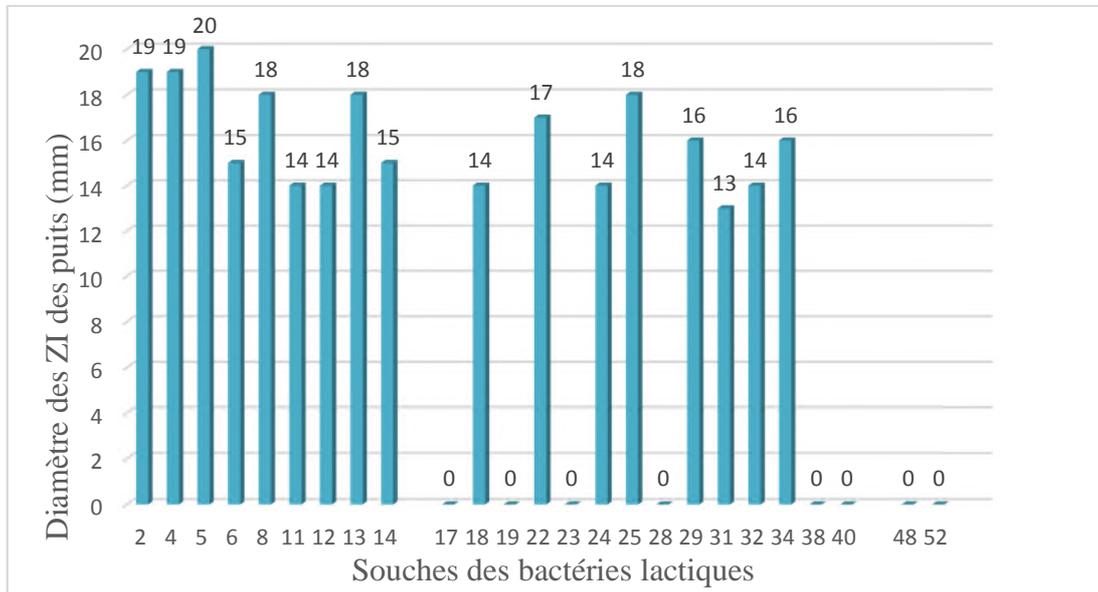


Figure 33: Diamètre de zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de *Pseudomonas sp.*

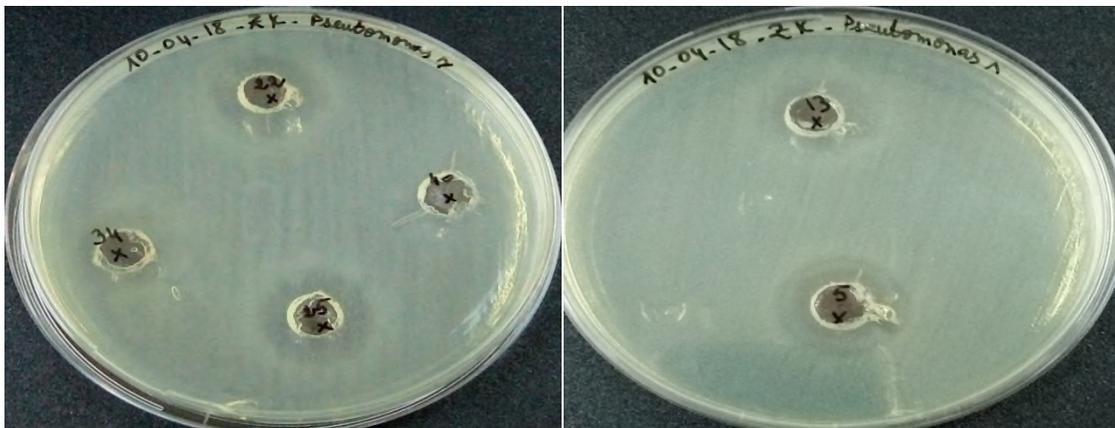


Figure 34: Activité des bactéries lactiques à l'égard de *Pseudomonas sp.*

Ce test a permis de sélectionner des souches possédant une activité antibactérienne intéressante, il montre que toutes les souches des bactéries lactiques testées. A l'exception de la souche 52 ont présentées une activité antimicrobienne contre au moins une souche cible testée, cela pourrait être expliqué par l'existence des substances antimicrobiennes dans le surnageant. Cependant, toutes les souches de bactéries lactiques testées ne révèlent

aucune activité antifongique à l'égard de *Candida albicans*, alors qu'une faible activité inhibitrice a été détectée par le test des spots.

Les souches de bactéries lactiques qui présentent une activité inhibitrice importante sont les souches de *Lactobacillus aquaticus* (16mm à 19mm), de *Lactobacillus nagelli* (16mm à 29mm), de *Lactobacillus saniviri* (22mm), de *Lactobacillus curvatus melibiosus* (22mm) et la souche de *Enterococcus faecium* (20mm).

Selon plusieurs auteurs, cet effet antibactérien serait dû à l'effet combiné de plusieurs substances antibactériennes produites par les bactéries lactiques comme les acides organiques essentiellement l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, ou encore des substances antibactériennes de nature protéique (bactériocines) (**Antanasova et al., 2003;Lozo et al., 2007**).

L'acide lactique est le métabolite principal de la fermentation des bactéries lactiques. A pH acide, une grande quantité d'acide lactique est sous la forme non dissociée, cette forme est toxique pour beaucoup de bactéries, champignon et levures (**Podolak et al.,1996**).

Labaioui et al., (2005).Ont examiné le surnageant natif du *Streptococcus agalactae* à l'égard d'*E.coli* et *Staphylococcus aureus*, ces auteurs ont obtenu un résultat positif avec des zones d'inhibition de $31,5 \pm 1,1$ mm et $32,5 \pm 1,0$ mm respectivement.

Allouche et al., (2010). Dans leur travail sur des souches de *lactobacilles* utilisées dans l'industrie laitière ont montrés une activité antimicrobienne à l'égard de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeroginosa* et *Escherichia coli*. Cette activité est révélée par l'apparition de zones d'inhibition allant de 12 à 22 mm, 14,5 à 22mm, 17 à 22mm et 18mm à 19mm respectivement. Cependant les souches des *lactobacilles* ne révèlent aucune activité inhibitrice à l'égard de *Salmonella seftenberg*.

Mami S. (2013),a montré que la souche *Lb. plantarum* présente une activité inhibitrice à l'égard de *S. aureus*, *Listeria ivanovii*, *E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinitobacter calcoaceticus*, *P. aeroginosa*, *Salmonella enterica* et *Bacillus cereus*. Cette activité est attribuée à des bactériocines.

Selon **Menad N. (2017)**, dans son étude sur l'effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de *Salmonella* sp. Les souches de *Lactobacillus plantarum* présentent une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée vis-à-vis de la bactérie pathogène avec un diamètre de zone d'inhibition de 5mm. Les différentes souches de *Lactococcus* sp présentent un spectre d'activité vis-à-vis du germe cible testé.

Mamèche-Doumandji(2008), ont montré que, *Lactobacillus acidophilus* inhibe quelques espèces pathogènes Gram négatif telles que *E. coli* et *Salmonella thyphimurium*.

Bouzaid et al., (2016) ont montré que la souche *L. yamanashiensis*, isolée de la viande hachée de dromadaire est capable d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonase flouresence* et *Salmonella sp.*

Conclusion

Conclusion

Dans ce travail, l'activité antimicrobienne a été recherchée dans trente souches de bactéries lactiques isolées de fromage artisanal à l'égard onze souches pathogènes isolées dans un laboratoire d'analyse médical.

Le but est de cribler et de sélectionner des souches de bactéries lactiques ayant une activité inhibitrice en utilisant de test des spots et des puits.

Vingt-cinq souches de bactéries lactiques parmi trente ayant une activité antimicrobienne, les meilleures activités inhibitrices ont été révélées par le test des spots avec la souche *Lactobacillus plantarum* (33 mm) à l'égard *S. aureus* et la souche *Lactobacillus nagelli* (36 mm) à l'égard *E.coli*. *Candida sp* présente une faible activité antifongique.

Les souches des bactéries lactiques ayant une meilleures activité antimicrobienne sont les souches de *Lactobacillus aquaticus* (19mm) à l'égard *S.aureus*, de *Lactobacillus nagelli* (29mm), de *Lactobacillus saniviri* (22mm) contre *Proteus mirabilis*, de *Lactobacillus curvatus melibiosus* (22mm) vis-à-vis à *Candida sp* et la souche de *Enterococcus faecium* (20mm) à l'égard *salmonella sp*. La souche 52 ne présente aucune activité contre toutes les souches pathogènes.

Pour cela, et en perspective, nous suggérons dans l'avenir de :

- Rechercher la nature exacte des facteurs inhibiteurs (bactériocines, polysaccharides...)
- Déterminer l'effet des bactéries lactiques à l'égard des souches pathogène (bactéricide ou bactériostatique).
- étudiée l'activité antimicrobienne des souches des bactéries lactiques à l'égard des souches multi résistance.

A

Allouch F. N., Hellal A. et Laraba A. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de *Lactobacillus thermophilus* utilisées dans l'industrie laitière. *Revue Nature et Technologie*, 30, 13-20.

Ammor M.S., (2004). Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison : identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de Doctorat en physicochimie et qualité de bioproduite, université de Rennes 1. France. p.21.

Ammor S, Tauveron G, Dufour E et Chevallier I. (2006).Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility : 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Microbiol.*17, 454-461.

Atanassova M., Choiset Y., Dalgalarondo M., Chobert J.M., Dousset X., Ivanova I. et Haertle T. (2003). Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* strain M3. *Int.J. Food Microbiol.*,87: 63-73.

Axelsson L T, Chung T C, Dobrogosz X J et Lindgren S E. (1989). Production of a Broad Spectrum Antibacterial Substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2, 131-136.

B

Barrena-Gonzalez C., Huot E. et Petitdemange H. (1996). Mode of action of bacteriocin (J46) produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* J 46. *J. Food Protec.*, 9: 955-962.

Boakes S. et Wadman S. (2008). The therapeutic potential of lantibiotic. *Innov. Phurm. Technol.*, 27: 22-25.

Bogovič M. B., Koman R. M. et Perko B. (2007). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *Int. Dairy J.* 17: 157-166.

Boudjaib S. (2013). Etude physico-chimique du produit laitier du sud Algérien « Jben » recherche du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques. Mémoire de Master en

Références bibliographiques

Biologie.Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. 91p.

Bouzaid M, Chatoui R; Latrache H, Hasib A. (2016). Activité antimicrobienne des souches des bactéries lactique isolées de viande hachée de dromadaire et de lait cru de vache.*Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. vol 10, N°1, p : 1-12.*

C

Chafai s.2006 : Effet de l'addition des probiotiques dans les régimes alimentaires sur les performances zootechniques du poulet hair, Mémoire de magister en sciences vétérinaires. *Université El-hadj-Lakhdar de Batna.*

Cintas L.M., Casaus P., Holo H., Hernandez P.E., Nes I.F. et Havarsstein L.S. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.*, 180:1988-1994.

Cleusix V, Lacroix C, Vollendweider S, Duboux M et Le Blay G. (2007).Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteria* gainst intestinal bacteria. *BioMed Central Microbiology.* 7, 101.

Cotter P.D., Draper L.A., Lawton E.M., McAuliffe O., Hill C. et Ross R.P. (2006). Overproduction of wild-type and bioengineered derivatives of the lantibiotic lactacin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 4492-4496.

Cotter P.D., Hill C. et Ross R.P. (2005b). bacteriocins: Developing Innate Immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 777-788.

D

De Roissart, H., Luquet, F.M. 1994. Les bactéries lactiques. *Uriage, Lorica, France, 1 :* 1- 286 pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier p 476.

De Vos P, Garrity G M , Jones D, Krieg N R , 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. 1422p.

Devoyod J J et Poullain F. (1988). Les leuconostoc. Propriétés : Leur rôle en technologie laitière. *Le lait.* 68 (3), 249-280.

Références bibliographiques

De Vuyst L. et Vandamme E. J. (1994). Antibacterial potential of lactic acid bacteria. Dans: Bacteriocin of lactic acid bacteria. Ed. Blacki Academic &Profitionel. Londre,p.91-129.

Dortu, C. Thonart, P. 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques :caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 143-154.

E

Eijsink V. G.H., Axelsson I., Diep D.B., Havarstein L.S., Holo H. et Nes LF. (2002) Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an exemple of biological warfare and communication. *Antonie van leeuwenhoek*, 81: 639-654.

Elsanhoty R.M. (2008). Screening of some *Lactobacillus* strains for their antifungal activities against aflatoxin producing aspergilla *in vitro* and maize. *J. Food Agric. Environ.*, 6: 35-40.

El Shafei H.A., abdel-Sabour H., Ibrahim N. etMostefa Y.A. (2000). Isolation, screening and characterisation of the bacteriocin-producing Lactic and bacteria isolated from traditional fermented. *Food Microbiol. Res.* 154: 4, 321.

F

Federighi M. (2005). Bactériologie Alimentaire, Edition ECONMICA, 2eme édition, p 28.

G

Gould G.W. 1991. Antimicrobial compound. In: Biotechnology and Food Ingredients. eds. Goldberg I. et Williams R. *Van Nostrand Reihold*, New York. pp. 461-483.

Guessas B., Ghazi F. Z., Aggad H., Henni D. et Kihal M., (2006). Phenotypic identification and whole cell protein analysis by SDS-Page for dominants lactic acid bacteria isolated from Algerian raw milk. *Journal Algérien des zones arides*, 5: 25-35.

H

Références bibliographiques

Heng N.C.K., Wescombe P.A., Burton J.P., Jack R.W. et Tagg J.R. (2007). The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. Dans: Riley M.A. et Chavan M.A.: Bacteriocins: Ecology and Evolution. Eds. Springer Science Business Media, Heidelberg, p. 45-92.

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

J

Jiménez-Díaz R., Ruiz-Barba J.L., Cathcart D.P., Holo H., Nes I.F., Sletten K.H. et Warner P.J. (1995). Purification and partial amino acid sequence of palantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus palantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 4459-4463.

K

Kemperman R., Kuipers A., Kersens H., Nauta A., Kuipers O. et Kok J. (2003). Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 1589-1597.

Klaenhammer T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12:39-86.

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.

Lopez-Diaz T.M., Alonso C., Roman C., Garcia-Lopez M.L. et Moreno B. (2000). Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiol.* 17: 23-32.

Lozo J., Jovicic B., Kojic M., Dalgalarondo M., Chobert J.M.,Haertle T . et TopisirovicL.(2007). Molecular chracterisation of a novel Bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei*BGSJ2-8, a natural isolate from homemadecheese. *Current Microbiology.*, 55 :266-271.

Références bibliographiques

Ludwing W, Schleifer K-H et Whitman X B. (2009). Order: Lactobacillales. In: De Vos P, Garrity G M , Jones D, Krieg N R , 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. p464.

M

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

Mami S. (2013). Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de Doctorat de Microbiologie appliquée. Université d'Oran. P 121.

Mamèche-Doumandji A. (2008). Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées localement. Thèse de Doctorat, Université de Blida: 44-85.

Marciset O., Jewronimus-Stratingh M.C., Mollet B. et Poolman B. (1997). Thermophilin 13, a non typical antilisterial poration complex bacteriocin that functions without a receptor. *J. Biol. Chem.*, 272: 14277-14284.

Martinez-Cuesta M.C., C. Pelaez et T. Requena (1997). Autolysis of *Lactococcus lactis* sp. *Lactis* and *lactobacillus caseis* sp. *Casei*. Cell lysis induced by a crude bacteriocin. *Int. J. Food Microbiol.*, 38(3): 125-131.

Mathara J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K. et Holzapfel W.H. (2004). Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of *kulenaoto*: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 3, 269-278.

Mathot A.G., Beliard E., Thanult D., (1996). Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques en Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires. Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, Tec & Doc, Lavoisier, pp: 432-450

Menad N. (2017). Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de *Salmonella* sp. Thèse de Doctorat de Microbiologie. Université Abdelhamid ibn Badis Mostaganem. P 72, 73.

Références bibliographiques

Moll G.N., van der Akker E., Hauge H.H., Nissen-Meyer J., Nes I.F., Koning W.N. et Deriessen A.J.M. (1999). Complementary and overlapping selectivity of the two peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *J.bacteriol.* 181: 4848-4852.

Montiel R, Martin-Cabrejas I, Langa S, El Aouad N , Arqués J L, Reyes F et Medina M. (2014). Antimicrobial activity of reuterin produced by *Lactobacillus reuterion* *Listeria monocytogenes* cold-smokd salamon. *Food Microbiology.* 44, 1-5.

MORAES, M. P., PERIN, L. M., ORTOLANI, M. B. T., YAMAZI, A. K., VIÇOSA, G. N., NERO, L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *Food Sci. Technol.*, **43**: 1320-1324.

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: 4

Nes I.F., Diep D.B., Havarstein L. S., Brurberg M.B., Eijsink V. et Holo H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van leeuwenhoek*, 70: 113-128.

Nes I.F., Diep D.B. et Holo H. (2007). Bacteriocins diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.*, 189: 1189-1198.

Nissen-Meyer J., Rogne P., Oppegard C., Haugen H.S. et Kristiansen P.E. (2009). Structure-fuction relationships of the non lanthionine-containing peptids (class II) bacteriocis produced by gram-positive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 10:19-37.

O

Okkers D., Dicks L.M.T., Silvester M., Joubert J.J. et Odendaal H.J. (1999). Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.* 87: 726-734.

Oppegard C., Ronge p., Emanuelsen L., Kristiansen P.E., Fimland G. et Nissen-Meyer J. (2007). The two peptide class II bacteriocins : structure, production, and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13: 210-219.

Références bibliographiques

O'sullivan L., Ross R.P. ET Hill C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, **84**, 593-604.

Ouwehand, A. C., Kirjavainen , P. V., Gronlund, M. M., Isolauri, S. J et Salminen, S. (1999).Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, **9**:623-630.

P

Piard j.c. et Desmazeand M. (1991).Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L. oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*. 71: 525-541.

Pilet M-F, Mogras C et Federighi M. (2005). Bactéries lactiques. In :Federighi M. Bactériologie Alimentaire. Economica. Paris. pp219-242.

Podolak P. K., Zayas J. F., Kastner C.L. et Fung D. Y. C. 1996. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59: 370-373.

R

Raibaud P. (1994). Interactions bactériennes dans le tractus digestif. Dans : Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. II, Loriga, Paris , 391-436.

Richard C., Cañon R., Naghmouchi K., Bertrand D., Prévost H. et Drider D. (2006).Evidence o correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *FoodMicrobiol.*,23: 175-183.

S

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

Savadogo A, Ouattara Cheik A T, BassoleImael H N et Traore A S. (2004).AntimicrobialActivities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk.Pakistan Journal of Nutrition. 3 (3), 174-179.

Références bibliographiques

Shleifer K-H. (2009). Family I. Lactobacillaceae. In: De Vos P, Garrity G M , Jones D, Krieg N R , 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. p465.

Simon L., Fremaux C., Centatiempo Y. et Berjeaud J.M. (2002). Sakasin G, a new type of antilisterial bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.*,68:6416-6420.

Slover C.M. et Danziger L. (2008). *Lactobacillus* :a Review. *Clin. Microbiol. Newslet.*, 30(4):23-27.

Sprules T., Kawulka K.E., Gibbs A.C., Wishart D.S. et Vederas J.C.(2004). NMR solution structure of the precursor for carnobacteriocin B2, an antimicrobial peptide from *Campylobacterium pisciola*. *Eur. J. biochem.*, 271:1748-1756.

Ström K., Sjögren J., Broberg A. et Achnürer J. (2002). *Lactobacillus palntarum*MiLAB393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and phenyllactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 322-4327.

T

Tabak S .,Bensoltane A. (2012). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales, *Nature & Technologie* 6 :71-79. 123.

Tagg J.R., Dajani A.S. et Wannamaker L.W. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*,40:722-756.

Tahara T., Oshimura M., Umezawa C. et Kanatani K. (1996). Isolation, partial characterization and mode of action of Acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Appl. Environ. Microbiol.*,62:892-897.

Références bibliographiques

Tailliez, P., Quiberoni, A., Rezaiki, L., El Karoui, M., Biswas, I., and Gruss, A. (2001) Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. *Res Microbiol.* **152**: 131-139.

Topisirovic L ,Veljovic K , TerzicVidojevic A, Strahinic I et Kojic M. (2007). Comparative analysis of antimicrobial and proteolytic activity of lactic acid bacteria isolated from zlatar cheese. *Genetika.* 39 (2), 125 -138.

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

W

Willy J.M et van der Doonk W.A. (2007). Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61:477-501.

Y

Yang Z. (2000). Antimicrobial compounds and extracellular polysaaharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties. MSc Thesis, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Food Technology University, University of Helsinki. 61p.

Z

Zalan Z., Barath A., Hhalasz A., (2005). Influence of growth medium of hydrogen peroxide and bacteriocin production of lactobacillus strains. *Food Technol. Biotech.*, 43(3): 219-225.

Zalan Z., Hudacek J., Stetina J., Chumchalova J., et Halasz A. (2010). Production of organic acids by lactobacillus strains in three different media. *EUR. Food Res.Technol.*,230:395_4755.

Annexes

Annexe I. Résultats

Tableau V: Diamètre des zones d'inhibitions (mm) obtenues par le test des spots à l'égard de *S.aureus* et *E.coli*

Souches	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>C.albicans</i>
S2	24	31	10.5
S4	22	26	11
S5	28	29	10.5
S6	27	26	11
S8	28	28	11.5
S9	0	0	10.5
S11	28	35	11
S12	26	36	11
S13	23	34	12.5
S14	0	28	0
S17	20	0	0
S18	31	32	10
S19	27	33	11
S21	0	0	0
S22	32	27	10
S23	24	31	0
S24	21	25	10
S25	21	0	10.5
S28	27	32	11
S29	22	0	10
S31	26	33	11
S32	28	27	10.5
S34	26	0	10
S35	0	0	0
S38	27	29	10.5
S40	33	0	10
S45	0	0	0
S48	24	33	0
S50	0	0	0
S52	25	31	11

Tableau VI : diamètre des zones d'inhibitions obtenues (mm) par le test des puits à l'égard des souches pathogènes

Souches	<i>Candida</i> <i>sp</i>	<i>C .koseri</i> <i>sp</i>	<i>E.coli</i>	<i>Klebiella</i> <i>sp</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>sp</i>
S2	0	14	15	14	19
S4	0	15	13	15	19
S5	17	10	14	15	20
S6	22	17	15	14	15
S8	22	13	0	13	18
S11	22	16	14	0	14
S12	22	16	17	12	14
S13	0	14	16	15	15
S14	16	12	14	14	15
S17	0	15	0	12	0
S18	19	15	14	14	14
S19	0	14	13	13	0
S22	0	15	14	16	17
S23	0	0	14	0	0
S24	20	16	13	13	14
S25	0	17	15	16	18
S28	0	12	16	12	0
S29	15	12	14	13	16
S31	15	15	13	0	13
S32	21	0	16	0	14
S34	0	0	13	0	16
S38	13	14	15	14	0
S40	0	0	0	0	0
S48	0	0	15	0	0
S52	0	0	0	0	0

Tableau VII : diamètre des zones d'inhibitions obtenues (mm) par le test des puits à l'égard des souches pathogènes

Souches	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.mirabilis</i>	<i>Providencia</i> <i>sp</i>	<i>Salmonella</i> <i>sp</i>	<i>S. aureus</i>
S2	19	20	20	14	19
S4	20	16	29	15	16
S5	14	17	18	0	15.5
S6	15	24	0	15	0
S8	16	19	16	18	17
S11	13	22	15	15	16.5
S12	21	24	20	16	14
S13	14	20	17	0	0
S14	17	16	15	0	17
S17	15	15	0	13	15.5
S18	20	21	20	17	17
S19	14	19	15	19	16
S22	15	18	0	0	15
S23	17	17	0	0	0
S24	17	27	18	13	17
S25	16	18	20	0	18
S28	15	0	0	0	0
S29	12	17	0	0	16
S31	20	20	16	17	17
S32	0	23	17	20	18.5
S34	15	15	15	0	17
S38	18	0	0	0	13
S40	17	12	0	0	0
S48	0	0	0	0	16.5
S52	0	0	0	0	0

Tableau VIII : Gélose et bouillon nutritive

Composition	Quantité (g/l)
Peptone de viande	10
Extrait de viande	3
Extrait de levure	3
Chlorure de sodium	5
Agar	18
pH final	7,2

NB : Pour avoir la gélose nutritive : on ajoute 15 g d'agar

Pour avoir une gélose nutritive molle : on ajoute 8 g d'agar

Tableau IX : Gélose et bouillon MRS

Composition	Quantité (g/l)
Peptone de caséine	10
Extrait de viande	8
Extrait de levure	4
Glucose	20
Phosphate dipotassique	2
Di ammonium citrate	2
Acétate de sodium	5
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,04
Tween 80	1ml
Agar	20
pH final	6,5

Tableau X : Eau physiologie

Composition	Quantité
Eau distillée	1L
Chlorure de sodium	9g
pH	7

Résumé

Dans cette étude, l'activité antimicrobienne de trente souches des bactéries lactiques isolées à partir de fromage artisanal, a été testée sur onze souches pathogènes isolées dans un laboratoire d'analyse médicale

Le criblage des souches de bactéries lactiques douées d'une activité inhibitrice a été mis en évidence par le test des spots et test des puits

Les résultats obtenues ont montrés que certaines souches des bactéries lactiques ont une bonne activité à l'égard des souches pathogènes alors que d'autres présentent une moyenneactivité antimicrobienne et d'autres ne présentent aucune activité inhibitrice.

Mots clés : bactéries lactiques, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Candida*, activité antimicrobienne

Abstract

In this study, antimicrobial activity of thirty lactic acid bacteria strains isolated from artisanal cheese has been tested on eleven pathogenic strains isolated in medical analysis laboratory.

Screening lactic acid bacteria strains with inhibition activity has been highlighted by the agar spot test and the agar well diffusion assay

The results shew that some lactic bacteria strains have a big activity on pathogenic strains whether some have a mean inhibiting power and the rest do not have at all.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Candida*, antimicrobial activity