

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA - Bejaia

Faculté des sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité Microbiologie Appliquée



Réf.....

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

MASTER

Thème

**Effet antibactérien de quelques bactéries
lactiques isolées localement à l'égard des
bactéries pathogènes
(*S.aureus*, *E.coli*)**

Présenté par :

Mouhoub Loubna et Sayah Yamina

Soutenu le : **24 juin 2018**

Devant le jury composé de :

M ^{me} CHIBANE	MCB	Présidente
M ^{me} BENACHOUR	MAA	Promotrice
M ^{me} TAFOUKT	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2017/2018



Remerciements

Nous remercions Dieu, le tous puissant de nous avoir accordé santé et courage pour accomplir ce modeste travail.

*

*Nous tenons à présenter nos sincères remerciements a notre promotrice M^{me}
BENACHOUR*

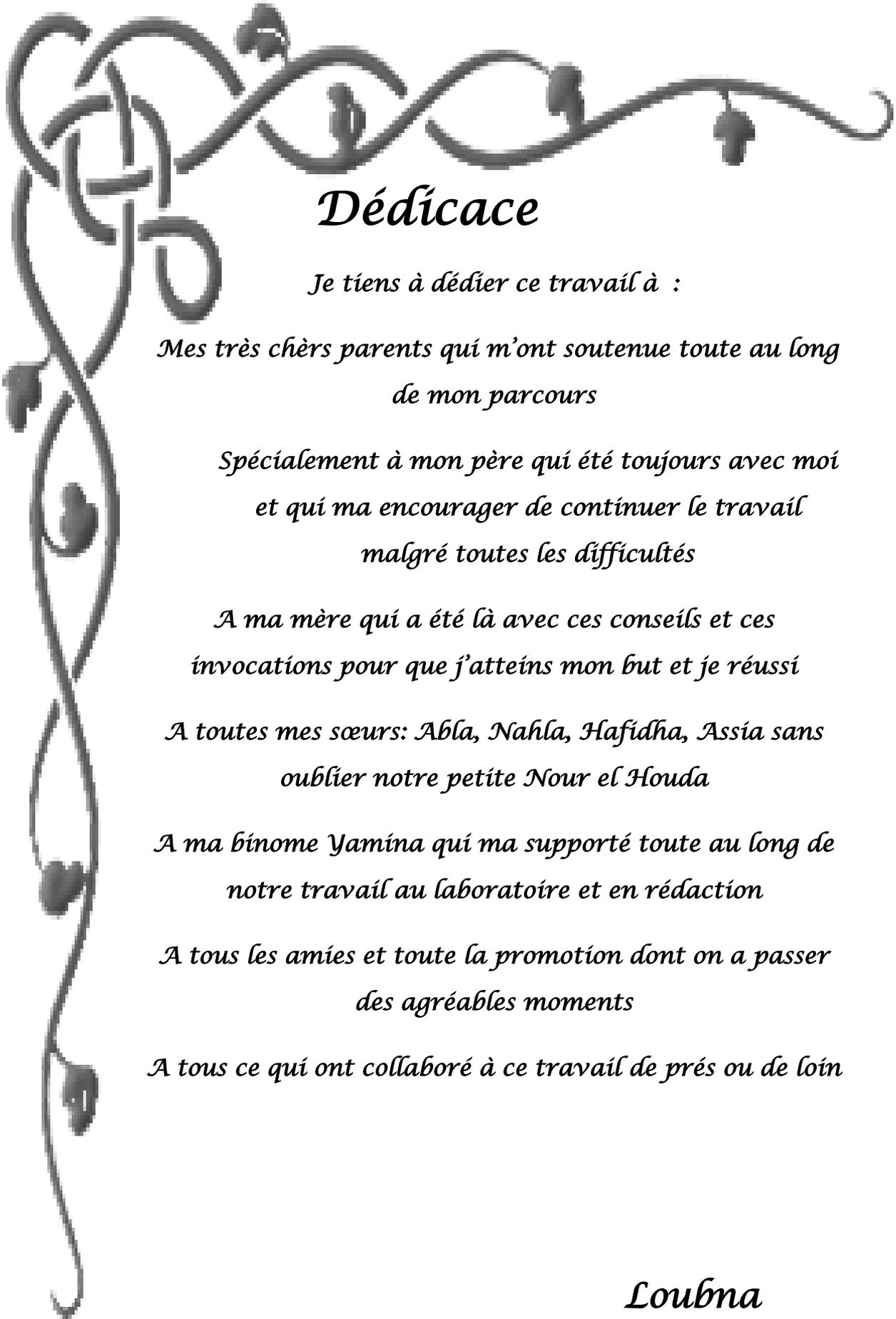
Qui a donner de son vif temps pour nous corriger et nous suivre toute au long du travail

*

*Egalement en remercie M^{me} TAFOUKT d'avoir
Accepter l'examinassions de ce travail*

*

*À la présidente des jurys M^{me} CHIBANE qui nous a
fait l'honneur de juger ce travail*



Dédicace

Je tiens à dédier ce travail à :

*Mes très chers parents qui m'ont soutenue toute au long
de mon parcours*

*Spécialement à mon père qui été toujours avec moi
et qui ma encourager de continuer le travail
malgré toutes les difficultés*

*A ma mère qui a été là avec ces conseils et ces
invocations pour que j'atteins mon but et je réussi*

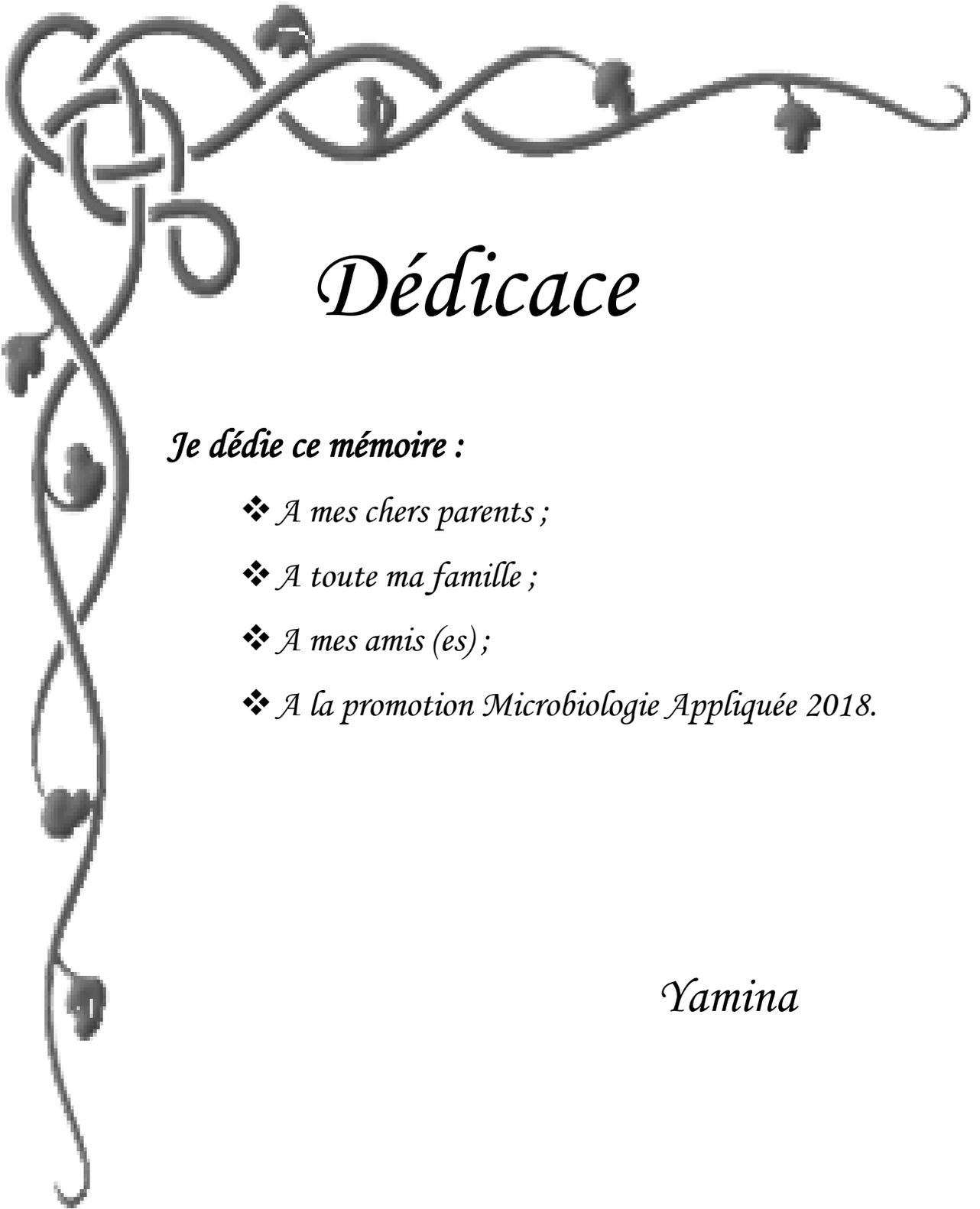
*A toutes mes sœurs: Abla, Nahla, Hafidha, Assia sans
oublier notre petite Nour el Houda*

*A ma binome Yamina qui ma supporté toute au long de
notre travail au laboratoire et en rédaction*

*A tous les amies et toute la promotion dont on a passer
des agréables moments*

A tous ce qui ont collaboré à ce travail de prés ou de loin

Loubna



Dédicace

Je dédie ce mémoire :

- ❖ *A mes chers parents ;*
- ❖ *A toute ma famille ;*
- ❖ *A mes amis (es) ;*
- ❖ *A la promotion Microbiologie Appliquée 2018.*

Yamina

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Patrie bibliographique

I. Les bactéries lactiques	2
1. Généralités.....	2
2. Habitat des bactéries lactiques	2
3. Classification.....	2
4. Lactobacille.....	4
5. Activités antimicrobiennes des bactéries lactiques	4
5.1. Compétition nutritionnelle et spatiale.....	4
5.2. Synthèse de métabolites antimicrobiens.....	4
5.2.1 Acides organiques	4
5.2.2 Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	5
5.2.3 Le dioxyde de carbone (CO ₂)	5
5.2.4 Le diacétyle (C ₄ H ₆ O ₂).....	6
5.2.5 Acétaldéhyde.....	6
5.2.6 Bactériocines	6
II. Les bactéries pathogènes	7
1. <i>Escherichia coli</i>	7
1.1. Historique et caractéristiques.....	7
1.2. Classification	8
2. <i>Staphylococcus aureus</i> :	8
2.1. Historique	8
2.2. Caractéristiques générales :	9

2.3. Classification et taxonomie :	9
2.4. Caractères cultureux de <i>Staphylococcus aureus</i>	9

Partie pratique

Matériel et méthodes

1. Origine des souches	11
1.1. Les bactéries lactiques.....	11
1.2. Les bactéries pathogènes	11
2. Revivification et vérification de la pureté des souches bactériennes.....	12
3. Standardisation des souches test (bactéries lactiques).....	13
4. Etude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques.....	15
4.1. Méthodes directe (Test des spots)	15
4.2. Méthode indirecte (Test des puits)	16
4.3. Méthode de microplaque.....	19
4.4. Antagonisme dans le lait.....	21

Résultats et discussion

1. Les souches lactiques.....	23
1.1 Aspect macroscopique.....	23
1.2 Test de la catalase	24
1.3 Aspect microscopique.....	24
2. Les bactéries pathogènes.....	24
3. Résultats de la standardisation des souches tests (bactéries lactiques).....	25
4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques	25
4. 1. Méthode directe (Test des spots).....	25
4.2. Méthode indirecte (Test des puits)	28
4.3. Antagonisme en microplaque	32
4.4. Etude de l'antagonisme dans le lait écrémé.....	35

Table de matière

Conclusion 37

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

BHIB : bouillon cœur cerveau

°D : Degré Dornic

DO: Densité Optique

E.coli : *Escherichia coli*

G⁺ : GRAM positif

h, min, s: heure, minute, seconde

Lb: *Lactobacillus*

µl : microlitre

ml : millilitre

mm : millimètre

MRS: Man Ragusa and Sharpe

ppm : partie pour million

pH: Potential d'hydrogène

rpm: rotation par minute

S.aureus : *Staphylococcus aureus*

t : tours

T : temps

UFC: unité formant colonie

Liste des figures

N	Intitulé	page
1	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S	3
2	Schéma illustrant les étapes de standardisation des bactéries lactiques dans MRS	14
3	Schéma illustrant les étapes du test de spots	16
4	Schéma illustrant les étapes du test des puits	18
5	Schéma illustrant le remplissage d'un puits de la microplaque	19
6	Microplaque utilisée pour tester l'effet du surnageant de bactéries lactiques sur <i>S.aureus</i>	20
7	Microplaque utilisée pour tester l'effet du surnageant de bactéries lactiques sur <i>E.coli</i>	20
8	Flacons utilisés dans le suivie de la croissance d'une culture mixte dans le lait	21
9	Aspect des bactéries lactiques sur milieu MRS	23
10	Résultat du test de catalase	23
11	Aspect microscopique d'une souche de bactéries lactiques sous microscope optique (Gx100)	24
12	Aspect macroscopique des souches de bactéries pathogènes	24
13	Activité antibactérienne des différentes souches du genre <i>Lactobacillus</i> à l'égard de <i>S.aureus</i> obtenus par le test des spots.	26
14	Exemples de résultats obtenus par le test de spots à l'égard de <i>S.aureus</i>	27
15	Activité antibactérienne des différentes souches du genre <i>Lactobacillus</i> à l'égard d' <i>E.coli</i> obtenus par le test des spots.	27
16	Exemples de résultats obtenus par le test de spots à l'égard d' <i>E.coli</i>	28
17	Activité antibactérienne des différentes souches du genre <i>Lactobacillus</i> à l'égard de <i>S.aureus</i> obtenus par le test des puits (surnageant natif).	29
18	Activité antibactérienne des différentes souches du genre <i>Lactobacillus</i> à l'égard d' <i>E.coli</i> obtenus par le test des puits (surnageant natif).	29
19	Exemple de résultats obtenue par le test de puits avec le surnageant natif	30

20	Activité antibactérienne des différentes souches du genre <i>Lactobacillus</i> à l'égard de <i>S.aureus</i> obtenus par le test des puits (surnageant neutralisé)	30
21	Activité antibactérienne des différentes souches du genre <i>Lactobacillus</i> à l'égard d' <i>E.coli</i> obtenus par le test des puits (surnageant neutralisé)	31
22	Exemple de résultats obtenue par le test de puits cas du surnageant neutralisé	31
23	Résultats de l'effet antagoniste des surnageant natif et neutralisé des bactéries lactiques vis-à-vis de <i>S.aureus</i>	33
24	Résultats de l'effet antagoniste des surnageant natif et neutralisé des bactéries lactiques vis-à-vis d' <i>E.coli</i>	34
25	Cinétique de croissance de L3Z ₁ et 8Lb ₁ en culture pure et en culture mixte dans le lait écrémé	35
26	Evolution du pH et de l'AD de L3Z ₁ et 8Lb ₁ en culture pure et en culture mixte dans le lait écrémé	36

Liste des tableaux

N	Intitulé	Page
I	Classes et sous classe des bactériocines produites par les bactéries lactiques	7
II	Origine des souches des bactéries lactiques utilisées	11
III	Origine des souches des bactéries pathogènes utilisées	11
IV	Résultats de la standardisation des bactéries lactiques	25

Liste des tableaux des annexes

N	Intitulé
I	Résumé de l'observation microscopique des souches isolées sur milieu MRS
II	Acidité Dornic et le pH de <i>Lactobacillus</i> dans le lait écrémé
III	Cinétique de croissance de <i>S.aureus</i> (log du nombre de cellules/ml) en culture mixte et en culture pure dans le lait écrémé
IV	Résultats du Test des spots à l'égard de <i>S.aureus</i>
V	Résultats du Test des spots à l'égard d' <i>E.coli</i>
VI	Résultats du Test des puits à l'égard de <i>S.aureus</i> avec le surnageant natif
VII	Résultats du Test des puits à l'égard d' <i>E.coli</i> avec le surnageant natif
VIII	Résultats du Test des puits à l'égard de <i>S.aureus</i> avec le surnageant neutralisé
IX	Résultats du Test des puits à l'égard d' <i>E.coli</i> avec le surnageant neutralisé
X	Résultats de l'effet antagoniste des surnageant natif des bactéries lactiques vis-à-vis <i>S.aureus</i>
XI	Résultats de l'effet antagoniste des surnageant neutralisé des bactéries lactiques vis-à-vis <i>S.aureus</i>
XII	Résultats de l'effet antagoniste des surnageant natif des bactéries lactiques vis-à-vis <i>E.coli</i>
XIII	Résultats de l'effet antagoniste des surnageant neutralisé des bactéries lactiques vis-à-vis <i>E.coli</i>

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles sont présentes naturellement dans de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale Humaine ou animale (**Stiles et al., 1997**).

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 inhibent le développement de certains micro-organismes grâce à la synthèse de molécules antibactériennes telles que des acides organiques, notamment l'acide lactique, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines (**Jasniwski, 2008**) ou par la compétition nutritionnelle (**Leonard, 2013**). Il est intéressant de noter que ces phénomènes d'inhibition causés par les bactéries lactiques peuvent également s'exercer contre de nombreux organismes étrangers à savoir les staphylocoques et les coliformes (**Julliard et al., 1987**).

Les bactériocines sont des peptides antibactériens (**Klaenhammer, 1988**). Elles présentent un spectre d'activité étroit envers des espèces pathogènes (**Aymerich et al., 2000**)

Plusieurs microorganismes ont été découverts dans un contexte de santé humaine ou de sécurité sanitaire des aliments. L'inhibition des agents pathogènes par les bactéries lactiques dans les produits laitiers et d'autres aliments fermentés, a été particulièrement explorée. La bioconservation des aliments, est due aux pouvoirs antagonistes des bactéries lactiques. (**Zagorec et Christieans, 2013**).

L'objectif de ce travail consiste à rechercher des souches de bactéries lactiques pour leur activité antibactérienne et la nature de substances inhibitrice vis-à-vis des souches pathogènes dont : *S.aureus* et *E.coli*. Ce travail comportera deux parties, dont une synthèse bibliographique qui consiste à rappeler les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques et des généralités sur *S.aureus* et *E.coli*. Une partie pratique qui présente les différents tests réalisés et les résultats obtenus.

Comment peut-on alors mettre en évidence cette activité antibactérienne ? Et elle pourrait être attribuée à quoi dans ce travail ?

Partie
bibliographique

I. Les bactéries lactiques

1. Généralités

Les bactéries lactiques sont des cocci ou des bâtonnets qui sont, en générale, aérotolérantes (**Larpent, 1989**). Cependant certaines espèces habitant, par exemple le tube digestif des animaux, sont anaérobies strictes, même en présence d'O₂. Elles sont incapables de réaliser la phosphorylation oxydative. Elles sont Gram positif, généralement, immobiles et asporulées. Ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni Cytochrome oxydase, ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole et d'hydrogène sulfureux (**Delaglio et al., 1994**).

Ces bactéries sont des micro-organismes bénéfiques à l'Homme. Elles lui permettent de fabriquer et de conserver un nombre important d'aliments. Elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés et elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons (**Eufic, 1999**).

2. Habitat des bactéries lactiques

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

Elles sont ubiquistes et se trouvent dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses Humaines et animales et dans le tractus digestif (**Douault et Corthier, 2000**). Elles ont été, également, retrouvées dans le sol, les engrais, et les eaux d'égouts (**Holzappel et al., 1996. Cité par Givry, 2006**).

3. Classification

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique et biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les sucres, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires,

exiger des facteurs de croissance, synthétiser certaines enzymes tels que lipase, lactase et estérase (Mofredjet *al.*, 2007).

La composition en GC de l'ADN et la composition en acides gras, sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Stiles et Holzopfel, 1997 ; Hoetal., 2007).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classer les genres des bactéries lactiques. De ce fait, elles peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques. Le genre *Weissella*, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins et *al.*, 1993 ; Ho et *al.*, 2007). Selon la dernière édition du « *Bergey's manual of systematic bacteriology* » (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des *Bacilliet* l'Ordre des *Lactobacillales*, renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles (figure1).

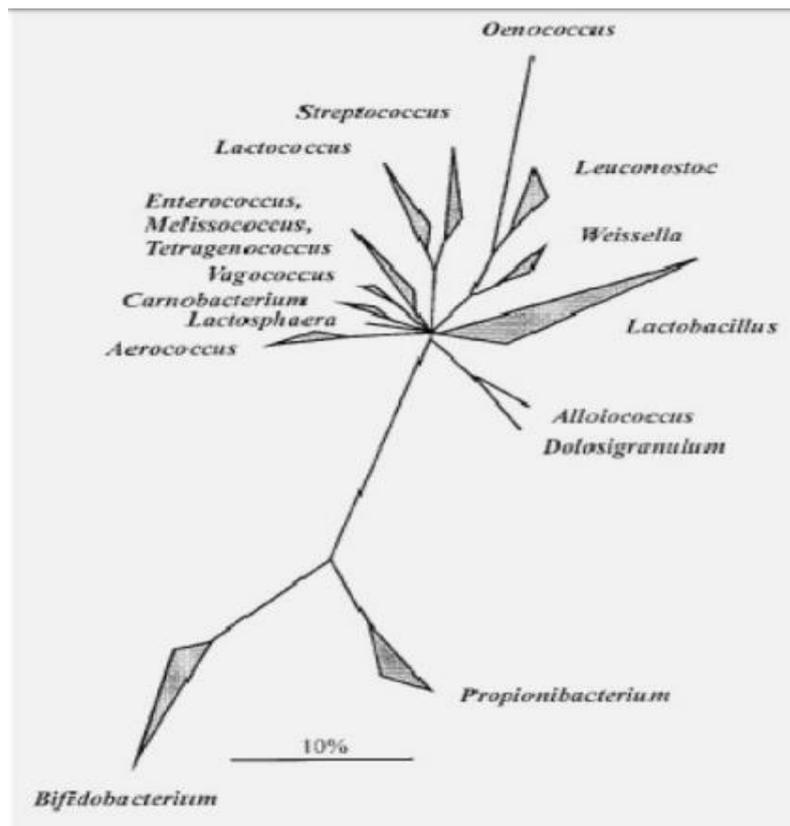


Figure 1 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997)

4. Lactobacilles

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique, intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développant à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en : acides aminés, vitamines, acides gras, nucléotides, glucides et minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994).

5. Activités antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques, utilisées habituellement en tant que ferments ou non ferments pour développer certaines caractéristiques organoleptiques, peuvent également avoir un rôle comme agents de conservation des aliments. Leur pouvoir antimicrobien peut être attribué à divers facteurs :

- Compétitions nutritionnelle et spatiale.
- Production d'un ensemble de métabolites possédant des propriétés antimicrobiennes. Ces métabolites sont des acides organiques (principalement l'acide lactique), le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle (2,3-butanedione) et les bactériocines (Ammor et al., 2006 ; Dalié et al., 2010).

5.1. Compétition nutritionnelle et spatiale

Les bactéries lactiques peuvent inhiber la multiplication de certains microorganismes d'altération et/ou pathogènes par leur propre présence. En effet, il s'agit du phénomène de compétitions nutritionnelle et spatiale vis-à-vis d'autres espèces. Du fait de leurs importantes exigences nutritionnelles, les bactéries lactiques envahissent complètement le milieu. Elles limitent alors la multiplication des autres colonisateurs (Castellano et al., 2008).

5.2. Synthèse de métabolites antimicrobiens

5.2.1. Acides organiques

L'acide lactique est le métabolite principal des bactéries lactiques. Il cause la réduction du pH, ce qui inhibe la croissance de certaines bactéries entre autres les bactéries

indésirables (**Eklund, 1989 et Schnurer et Magnusson, 2001**). Les bactéries lactiques hétéro-fermentaires produisent en plus, de l'acide acétique qui possède un plus haut pKa que l'acide lactique, et ont donc une proportion plus élevée d'acide non dissocié au même pH par rapport à l'acide lactique (**Eklund, 1989**).

En général, c'est la forme moléculaire non dissociée des acides qui a un effet toxique sur les bactéries, d'où l'acide acétique est plus toxique que l'acide lactique. La forme associée de ces acides traversent passivement la membrane cytoplasmique et, pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel, que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire est annulé (**Ammor et al., 2007**).

L'acidification interne peut aussi réduire l'activité des enzymes sensibles au pH acide, endommager les protéines et l'ADN. Enfin, l'accumulation dans le cytoplasme des dérivés anioniques des acides organiques dissociés, peut avoir un effet néfaste sur la physiologie cellulaire (**Van de Guchte et al., 2002 ; Dalié et al., 2010 ; Reis et al., 2012**).

5.2.2. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le H₂O₂ présente un effet antimicrobien qui peut être expliqué par la production de radicaux libres tels que le groupement superoxyde (O₂⁻) et le groupement hydroxyle (OH⁻) capables d'endommager l'ADN bactérien. En outre, le pouvoir inhibiteur du H₂O₂ pourrait être dû à des réactions d'oxydation des groupes sulfhydriles provoquant une modification de la conformation des protéines et donc la perte de fonction des enzymes. De plus, il peut engendrer la peroxydation des lipides membranaires, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane du microorganisme cible (**Ammor et al., 2006 ; Dalié et al., 2010**).

5.2.3. Le dioxyde de carbone (CO₂)

Le CO₂ est principalement formé pendant la fermentation des hexoses suivant la voie hétérofermentaire. Le pouvoir antimicrobien du CO₂, produit par les bactéries lactiques, s'explique par la création d'une atmosphère anaérobie qui inhibe la croissance de certains microorganismes aérobies telle que la flore d'altération psychrophile à Gram négatif. De plus, l'accumulation du CO₂ dans la membrane lipidique de la cellule cible pourrait modifier sa perméabilité (**Ammor et al., 2006 ; Salminen et Von Wright, 2009**).

5.2.4. Le diacétyle (C₄H₆O₂)

Il est produit par des souches de *Lactococcus lactis* ssp *Lactis* biovar *diacetylactis* par la fermentation du citrate (Lindgren et Dobrogosz, 1990 ; Cogan et Hill, 1993). De nombreuses bactéries lactiques comprenant des souches, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et de *Lactobacillus* peuvent produire le diacétyle bien que la production soit réprimée par la fermentation des hexoses (Cogan, 1986). Son utilisation pratique en tant que conservateur est limitée. Cependant, le diacétyle peut agir synergiquement avec d'autres facteurs antimicrobiens (Jay, 1992) et contribuer aux systèmes combinés de conservation dans les aliments fermentés. Le mécanisme d'action du diacétyle n'est pas encore connu précisément, néanmoins il est possible qu'il interagisse avec les résidus arginine des enzymes fonctionnelles (Olasupo et al., 2003).

5.2.5. Acétaldéhyde

Les bactéries lactiques hétérofermentaires produisent de l'acétaldéhyde actif par décarboxylation du pyruvate. Ce produit se combine alors avec du pyruvate, formant du α -acétolactate qui est converti par la α -acétolactate-synthase en diacétyle. Les concentrations d'acétaldéhyde atteignant 25 ppm dans le yaourt peuvent entraîner une inhibition de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *E. coli* (Piard et Desmazeaud, 1992).

5.2.6. Bactériocines

Les bactériocines sont des molécules de nature protéique synthétisées par voie ribosomique, et sécrétées dans le milieu extracellulaire. Elles sont douées d'une activité antimicrobienne envers des espèces microbiennes phylogénétiquement proches de l'espèce productrice (Ammor et al., 2005 ; Castellano et al., 2008 ; Dalié et al., 2010).

Leur spectre d'activité varie d'une bactériocine à une autre mais avec une activité dirigée principalement contre les bactéries à Gram positif. Les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes aux bactériocines car elles sont protégées par leur membrane externe qui empêche les bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Dortu et Thonart, 2009). D'une manière générale, les bactériocines sont thermostables, solubles et actives à pH acide (Labioui et al., 2005), non toxiques pour les cellules eucaryotes et sensibles aux enzymes protéolytiques du tractus gastro-intestinal (Wijaya et al., 2006), ce qui permet d'éviter les interférences avec la microflore intestinale (Castellano et al.,

2008). Les différentes classes de bactériocines produites par les bactéries lactiques sont rassemblées dans le tableau I.

Tableau I : Classes et sous classe des bactériocines produites par les bactéries lactiques (Heng *et al.*, 2007).

Classe	Sous classe
Classe I : Lantibiotiques	Type A : bactériocines à peptides linéaires Sous type AI : bactériocines « Nisine-like » Sous type AII : bactériocines « SA-FF22-like »
	Type B : bactériocines à peptides globulaires
	Type C : bactériocine à deux peptides
Classe II : peptides (≤ 10 KDa) non modifiés	Type IIa : bactériocines « pediocin-like »
	Type IIb : bactériocines à deux peptides
	Type IIc : bactériocines ne pouvant pas être classées ni dans le type IIa ni dans le type IIb
Classe III : Bactériocines de haut poids moléculaires (≥ 10 kDa)	Type IIIa : Les bactériolysines
	Type IIIb : Les bactériocines non lytiques
Classe IV : peptides cycliques	

II. Les bactéries pathogènes

1. *Escherichia coli*

1.1. Historique et caractéristiques

C'est en 1885 que le pédiatre allemand Théodore Escherich isole et décrit pour la première fois le bacille *Bacterium coli*, fréquemment présent dans les selles des nourrissons. En 1919, en hommage aux travaux d'Escherich, Castellani et Chalmers proposent de renommer cette bactérie *Escherichia coli* qui appartient à la famille des entérobactéries. C'est un bacille Gram négatif, oxydase négative, anaérobie facultatif, possédant des flagelles péritriches (Jean *et al.*, 1992).

Escherichia coli est considéré comme un indicateur d'une contamination fécale, sa présence fournit une indication sur l'éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive (ex. *Salmonella enteric Typhimurium*, *E. coli* O157: H7...) (**Federighi, 2005**).

1.2. Classification

Les souches d'*E.coli* sont différenciées à l'aide de la classification fondée en grande partie sur les travaux de Kauffman en 1944, qui se base sur la détermination des antigènes de surface (**Nataro et Kaper, 1998**). Principalement, deux antigènes sont pris en compte : les antigènes O somatiques et les antigènes H flagellaires. Il existe 174 antigènes O (**Stenutz et al., 2006**) et 56 antigènes H différents chez *E. coli*. Une combinaison spécifique d'un antigène O et d'un antigène H définit le sérovar. Des souches d'*E.coli* appartenant à des sérotypes spécifiques sont régulièrement associées à des pathologies, mais en général, ce ne sont pas les antigènes eux-mêmes qui confèrent la virulence aux bactéries (**Gyles, 2007**).

Par ailleurs, bien que la majorité des souches d'*Ecoli* soient commensales, certaines d'entre elles sont associées à des pathologies intestinales ou extra-intestinales très diverses chez l'Homme (**Levine, 1987**). Les pathovars à l'origine d'infections extra-intestinales, comme les UPEC (pour Uropathogenic *E.coli* »), responsables d'infections du tractus urinaire, et les souches d'*E.coli* associées à des méningites (MNEC pour « Meningitis-associate d'*E.coli* ») ou à des septicémies, ont été regroupées sous le terme de ExPEC (pour « Extra-intestinal pathogenic *E.coli* ») (**Russoet Johnson, 2000**).

2. *Staphylococcus aureus*

2.1. Historique

Les staphylocoques étaient connus comme étant la cause des inflammations de la peau jusqu'au 1870. C'est à partir de 1884 qu'ils ont été associés aux intoxications alimentaires, lorsque Vaughan et Sternberg ont isolé le germe d'un cheddar lié à 300 cas d'intoxications alimentaires dans le Michigan. En 1954, la relation entre les empoisonnements alimentaires à *Staphylococcus aureus* et la production de toxines a été établie par Baber (**Elliot, 2011**).

2.2. Caractéristiques générales

Les staphylocoques sont des bactéries aéro-anaérobies facultatifs, cocci Gram positif, catalase positive, de forme sphérique, de 0,5 à 1,0 µm de diamètre, asporulée, immobile, coagulase positive et ils se regroupent en amas ou en paires.

C'est un chimioorganotrophe qui a un métabolisme respiratoire et fermentatif et qui peut se développer entre 7 et 47°C, mais sa croissance optimale est de 30°C (**Bremeret *al.*, 2004**).

Pour inhiber sa croissance, il faut un pH maximal de 4,0 en aérobiose et de 4,6 en anaérobiose. Les souches peuvent croître entre pH 4,0 et pH 9,8. Les souches de *S. aureus* tolèrent une concentration de NaCl comprise entre 2,5 et 15% NaCl, mais leur croissance est beaucoup plus faible à 15%. Ces souches présentent des exigences nutritionnelles particulières. Elles ont besoin d'une source d'azote (5 à 12 acides aminés) et de vitamines (**Lamprell, 2003**).

2.3. Classification et taxonomie

Le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des firmicutes, à la classe des bacilli, ordre des Bacillales, famille des staphylococcaceae (**Bergey, 2007**).

Les espèces du Genre *Staphylococcus* peuvent être divisées en deux groupes : les staphylocoques à coagulase positive et les Staphylocoques à coagulase négative :

- Les staphylocoques à coagulase positive sont caractérisés par leur capacité de produire une coagulase libre, une protéine extracellulaire produite par certaines espèces de staphylocoques. Il existe sept espèces et sous-espèces du genre sont des staphylocoques à coagulase positive : *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. delphini*, *S. schleiferi ssp.*, *S. aureus ssp. anaerobius* et *S. hyicus*. Néanmoins, toutes les souches de *S. hyicus* ne sont pas coagulase positive (**Lamprell, 2003**).
- Les staphylocoques à coagulase négative dont la plus fréquente est *S. epidermidis* (**Schaerchter *et al.*, 1993**).

2.4. Caractères cultureux de *Staphylococcus aureus*

Il existe de nombreux milieux sélectifs pour *Staphylococcus aureus* et on distingue des milieux solides d'isolement et des milieux liquides d'enrichissement. Le milieu d'isolement le plus employé actuellement est le milieu Baird Parker. Les colonies de *S. aureus* présentent un aspect caractéristique sur ce milieu : elles sont noires, brillantes et

entourées d'une auréole d'éclaircissement. Cependant, ce milieu est faiblement sélectif. Afin d'éviter ces tests laborieux des variantes de ce milieu ont été proposées, par exemple en remplaçant le jaune d'œuf par le Tween 80 plus $MgCl_2$. D'autres auteurs remplacent le jaune d'œuf par du plasma de lapin ou de porc, puis on ajoute du fibrinogène bovin et on abaisse la concentration de tellurite. Un précipité opaque entoure les colonies productrices de coagulase. Le milieu au plasma de lapin et au fibrinogène est recommandé en cas de difficulté de lecture avec le milieu Baird Parker (**Bourgeois et al., 1996**).

L'isolement sélectif peut aussi se faire sur le milieu Chapman mannité qui contient une forte teneur en NaCl (7,5%) et inhibe la croissance de nombreuses bactéries autres que les *Micrococcus* et *staphylococcus*. Il donne une indication de l'action de la souche isolée sur le mannitol : l'utilisation de mannitol avec production d'acide se traduit par un virage du rouge au jaune du rouge de phénol contenu dans le milieu. L'incubation dure de 24 à 48 heures à 30-37°C (**Galzy, 1980 ; Avril et al., 2000**).

*Matériel et
méthodes*

290962

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie 1 de l'université de Bejaïa pendant une durée allant du 1/02/2018 jusqu'au 10/05/2018.

Parmi les objectifs de cette étude :

- L'évaluation de l'activité antibactérienne de certaines souches lactiques isolées envers d'autres bactéries pathogènes (*S.aureus* et *E.coli*).
- Le suivi de la cinétique de croissance des souches lactiques et effet antagonisme dans le lait.

1. Origine des souches

1.1. Les bactéries lactiques :

Neuf souches de bactéries lactiques utilisées étaient déjà isolées et conservées à 4°C dans du bouillon MRS à pH 5,4. Le tableau suivant présente l'origine des différentes souches utilisées.

Tableau II : Origine des souches de bactéries lactiques utilisées.

Souche	Origine
S6, S11, 3Br, 13Br, 15Br, <i>Lactobacillus plantarum</i>	Beurre
16Lb, 8Lb1	L'ben
S35	Smen

1.2. Les bactéries pathogènes

Un total de 20 souches de bactéries pathogènes appartenant aux (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) ont été utilisées dans cette étude. Et qui sont d'origine médicale et alimentaire et conservées à 4°C dans 9ml du bouillon BHI (Indicia. Version 03.2012).

Tableau III : origine des souches des bactéries pathogènes utilisées

Souche	origine	Souche	origine
St1, St2, St5, L3z1, E1, E4, E5	Lait	St07, St17	Médicale (gorge)
St3, St4, St6, E2, E3, E6	L'ben	St18, St20, St21	Médicale (selles)
		E7, E9, E20	Médicale (urine)

2. Revivification et vérification de la pureté des souches bactériennes :

a- Revivification des bactéries

Les souches lactiques sont conservées dans du bouillon MRS à 4°C, puis repiquées dans 9ml du bouillon MRS (Liofilchim, 610192-500GR) et incubées à 37°C/24h.

Les souches pathogènes sont conservées dans du bouillon BHI à 4°C et repiquée dans BHIB (Indicia. Version 03.2012) incubées à 37°C /24h

b- Vérification de la pureté des souches utilisées

Il est obligatoire de vérifier la pureté des souches avant toute utilisation. Après des repiquages successifs, un ensemencement sur gélose MRS, Chapman et EMB est réalisé. Ainsi des tests simples et rapides sont réalisés. Et ils sont basés sur :

- Observation macroscopique de l'aspect des colonies.
- La coloration de Gram.
- Test de catalase.

a. Observation macroscopique :

Cette observation a été réalisée pour décrire l'aspect des colonies obtenues sur la gélose MRS (Liofilchim, 610192-500GR). Les caractères pris en compte sont : la taille, la couleur, l'aspect (collant, muqueux), l'odeur, la transparence et l'allure des contours.

b. Observation microscopique :

L'examen microscopique est effectué par le microscope optique au grossissement (10X100). Il permet d'observer la forme des cellules : leur mode de regroupement, et pour cela nous avons effectué la coloration de Gram d'une culture fraîche de 24h.

L'étude morphologique des bactéries nécessite la préparation d'un frottis coloré. Ce dernier consiste en un étalement de la colonie à étudier sur une lame propre, suivi d'un séchage, d'une fixation et d'une coloration.

- **La coloration de Gram**

La coloration de Gram a pour but de classer les bactéries selon leur Gram (G-, G+), leur forme (cocci, bacille), et leur mode d'association (en chaînette, libre, en amas).

Elle s'effectue à l'aide de réactifs spécifiques, en commençant par l'application du violet de gentiane pendant 30s à 1min. Après recouvrement direct avec Lugol de ce frotti, on procède à une décoloration en versant l'alcool éthylique à 96% goutte à goutte sur la lame inclinée obliquement, puis au rinçage avec l'eau distillée et à la recoloration par la fuschine (30s à 1min). Après cette coloration, un rinçage et un séchage sont effectués en utilisant l'eau distillée et le papier absorbant.

Pour l'observation microscopique au grossissement (10 X100), une goutte d'huile à immersion est ajoutée.

c. Test de catalase :

Une goutte d'eau oxygénée H_2O_2 à 10V est déposée sur une colonie développée pendant 24h à 48h sur gélose MRS. Le résultat est immédiat et se caractérise par un dégagement gazeux ou effervescence.

3. Standardisation des souches test (bactéries lactiques) :

La standardisation est une étape importante qui a pour but d'encercler la charge de micro-organismes du départ pour garder la même charge tout au long du travail réalisé.

A partir d'une boîte MRS qui a été déjàensemencée, des colonies sont prises et mises dans du bouillon MRS (pH=5,4), suivi d'une incubation à 37°C/24h. La culture lactique obtenue a servi d'avantage pour ensemencer sur une autre gélose MRS, puis elle a été mise à une incubation à 37°C/48h.

Après croissance, 05 colonies sont prélevées et mise dans 9ml du bouillon MRS puis incubées à 37°C/24h. Les cultures fraîches obtenues ont servi d'autre part pour réaliser des dilutions dans 9ml d'eau physiologique. Puis 1ml des deux dernières dilutions (10^{-8} et 10^{-9}) a été prélevés pour ensemencer en masse nos boîtes MRS qui ont été ensuite incubées à 37°C/48h.

Le résultat du dénombrement est exprimé en UFC/ml.

Les étapes sont expliquées dans la **figure 2**

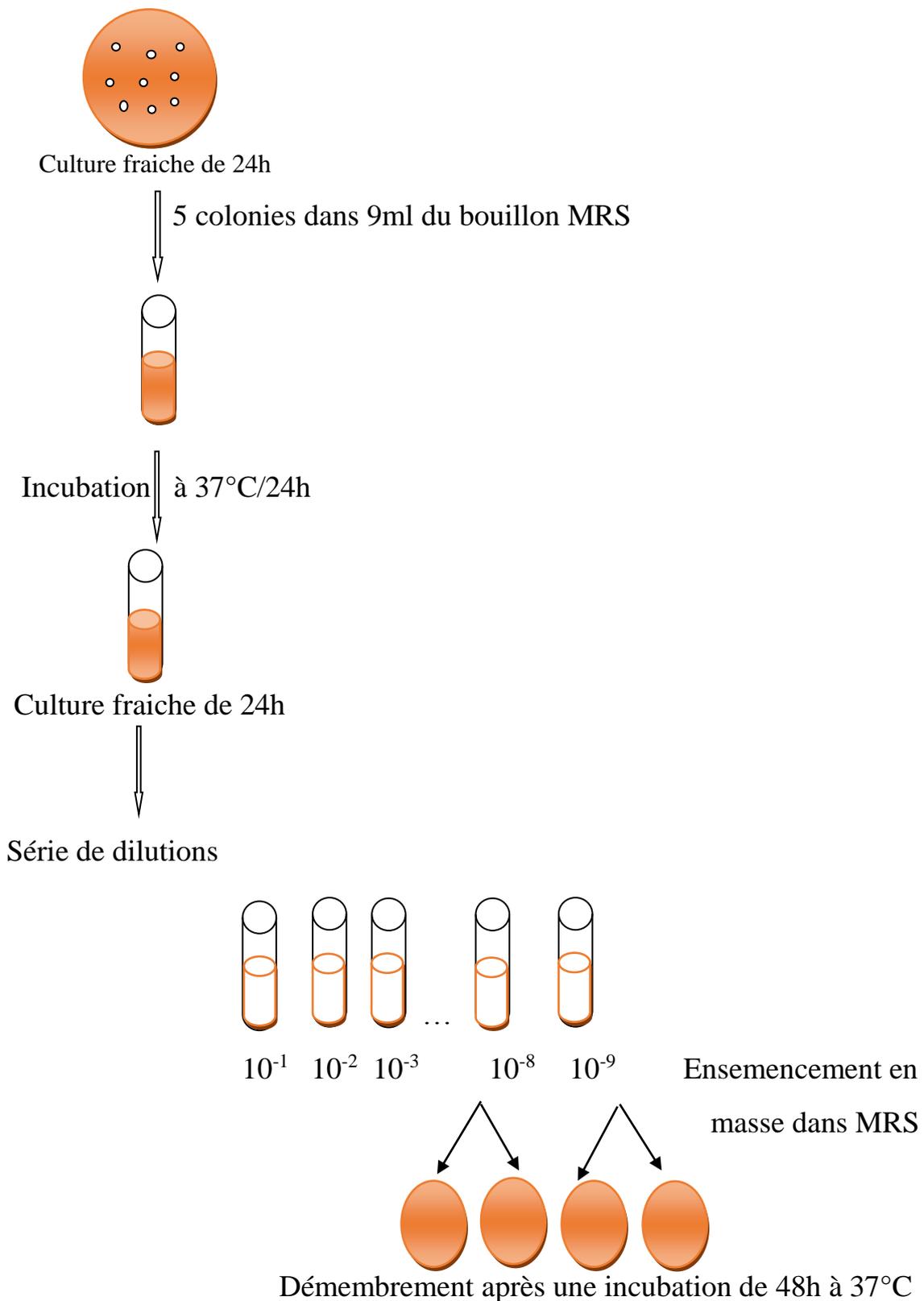


Figure 2 : Schéma illustrant les étapes de standardisation des bactéries lactiques dans MRS

4. Etude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques :

4.1.Méthodes directe (Test des spots) :

Pour tester l'activité antimicrobienne des souches lactiques à l'égard des souches pathogènes (*E.coli* et *S.aureus*), le test des spots est réalisé.

Le test consiste à déposer un volume de 5µL de la culture fraîche de 24h de chaque souche lactique d'une concentration de 10⁹ UFC/ml sur une gélose MRS (solidifiée et séchée), les spots sont séchés près du bec bunsen pendant quelques minutes puis incubés à 37°C pendant 18h à 24h. En parallèle, une culture fraîche de bactéries pathogènes à tester est préparée en la cultivant dans 9ml du BHIB et incubée à 37°C /24h(**Figure3**).

Après incubation, 9mL de gélose Mueller Hinton en surfusion sont inoculés par 1mL (10⁷UFC/ml) de la souche cible. Ensuite, le mélange est coulé sur la gélose MRS, en contact avec les spots. Les boîtes sont incubées à 37°C/24h (**Fleming et al., 1975**).

Au terme de l'incubation, les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés.

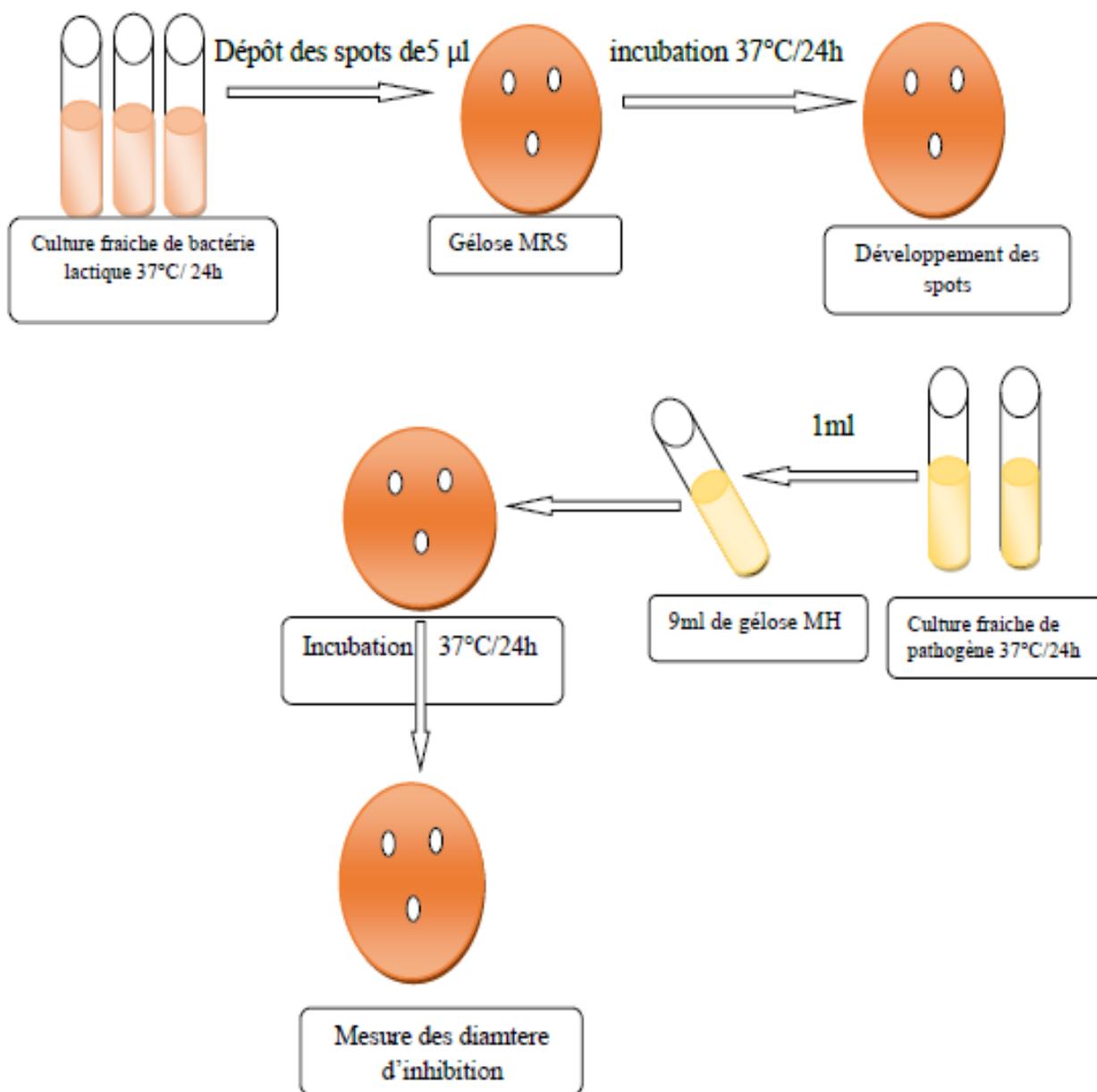


Figure3 : Schéma illustrant les étapes du test des spots

4.2.Méthode indirecte (Test des puits) :

a. Cas du surnageant natif :

Pour démontrer l'activité antibactérienne des souches lactiques détectée dans la méthode de double couche, la méthode des puits est appliquée.

Une fine couche de gélose nutritif est coulée en premier, dans des boîtes de Pétri pour le maintien de la gélose à utiliser (MH). Après solidification, une couche de 18ml de gélose MH en surfusion est inoculée avec 2 ml de la souche cible 10^7 UFC/ml, et est coulée sur la surface.

Des puits de 6mm sont creusés dans la gélose à l'aide d'un embout d'une micropipette, ces puits sont remplis de 100 μ l du surnageant natif de la culture des souches lactiques. Les surnageant sont obtenus par centrifugation (centrifugeuse de type sigma) des cultures fraîches de bactéries lactiques à 8000t/min pendant 20min à 4°C. Les boîtes sont laissées par la suite à une température de 4°C pendant deux heures pour la diffusion du surnageant, puis incubée à 37°C/24h (**Tagg et Mac Given., 1971 ; Barfoot et Klaenhammer., 1989 ; Kim et al., 2001**).

L'activité antibactérienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits. Les diamètres des zones d'inhibition apparus sont mesurés en millimètres, et le diamètre des puits n'est pas pris en compte dans l'expression des résultats.

b. Cas du surnageant neutralisé :

Pour éliminer l'effet des acides organiques, notamment des acides lactique et acétique, dans le but de déterminer l'origine de l'activité antibactérienne, le surnageant récupéré après centrifugation est neutralisé par la soude (NaOH) 1N de façon à obtenir un pH de 7 (**Kimetal., 2001 ; Labioui et al.,2005**). Puis l'activité est testée par la méthode des puits comme détaillée précédemment (**La figure 04**).

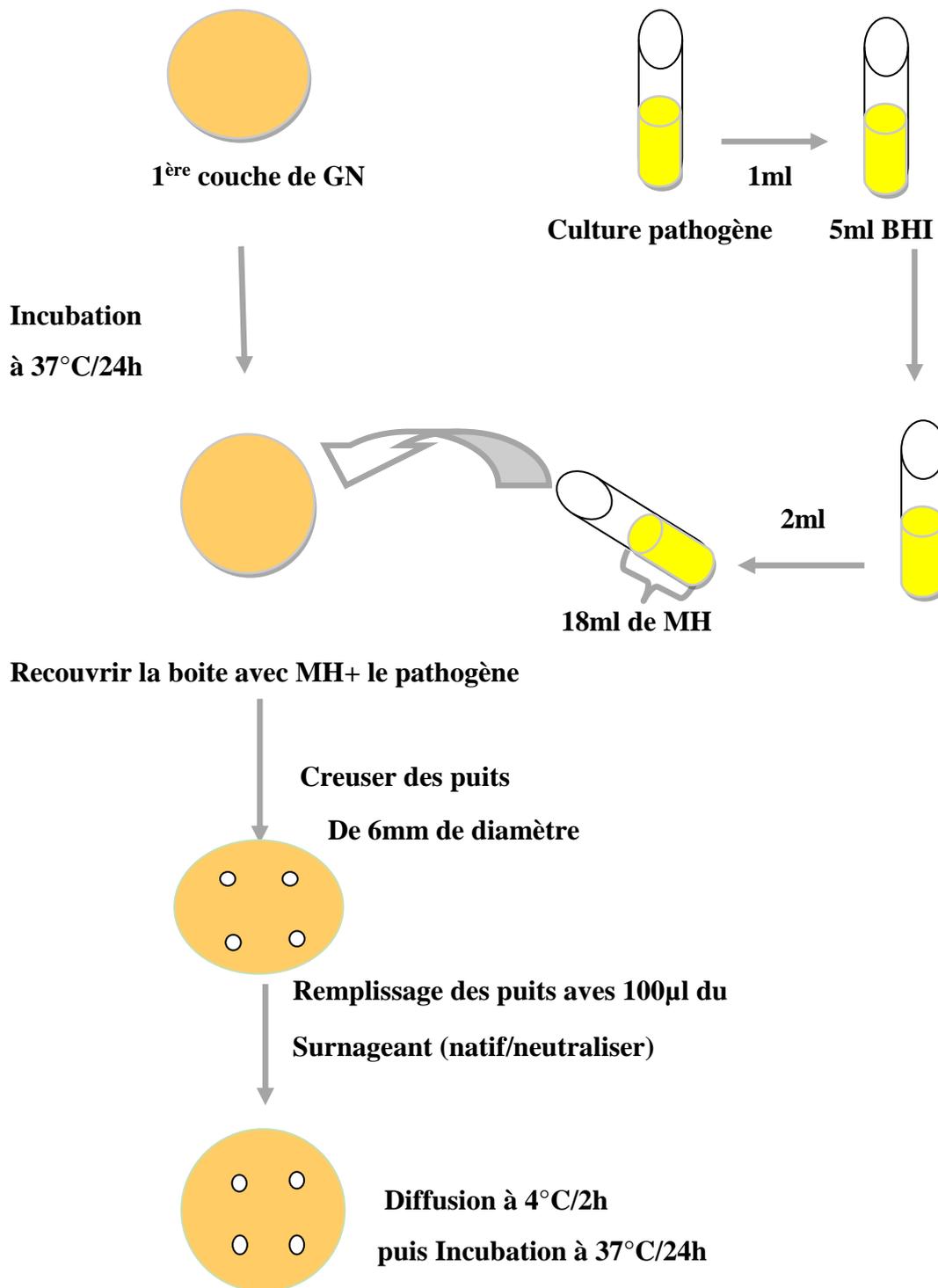


Figure 4 : Schéma illustrant les étapes du test des puits

4.3. Méthode de microplaque :

Afin de tester l'effet du surnageant des bactéries lactiques sur les souches pathogènes en milieu liquide. Deux microplaques de 96 puits ont été utilisées, une pour *E.coli* et l'autre pour *Staphylococcus aureus*.

La concentration cellulaire des bactéries pathogènes est de 10^7 UFC/ml. Au départ tous les puits sont remplie par 25 μ du bouillon BHI stérile, ensuite 25 μ l de la souche pathogène est mise dans les puits, enfin 100 μ l du surnageant natif ou neutralisé est ajouté (**figure 5**).

Les tests sont réalisés trois fois.

Une lecture de la densité optique a été faite à $t=0$ h et après 24h d'incubation à une longueur d'onde de 620nm.

Les deux figures 06 et 07 résument le principe de la microplaque

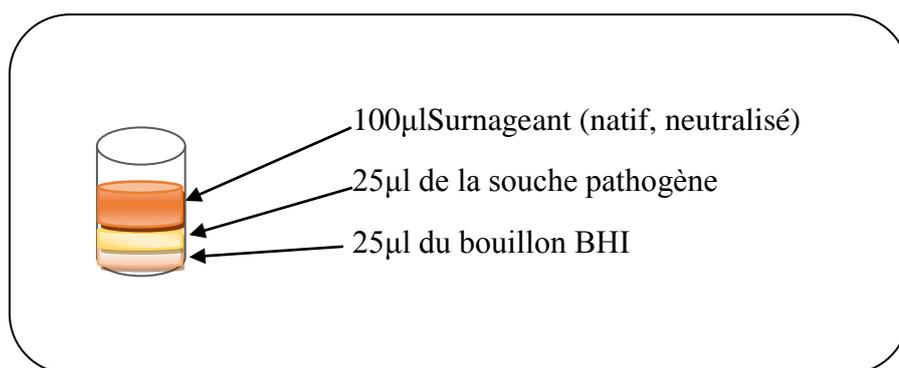


Figure 5 : Schéma illustrant le remplissage d'un puits de la microplaque

		3Br	16Lb	Plan	8Lb ₁	15Br	13Br	S ₆	S ₁₁	S ₃₅			
Neutralisée	S1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
	S2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
	S3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
Témoin	BHI + Surnageant	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
	BHI + Surnageant	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
Natif	S1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
	S2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
	S3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○

Figure 6 : Microplaque utilisée pour tester l'effet du surnageant de bactéries lactiques sur *Staphylococcus aureus*

		3Br	16Lb	Plan	8Lb ₁	15Br	13Br	S ₆	S ₁₁	S ₃₅			
Neutralisé	A=E ₂	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
	B=E ₄	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
	C=E ₅	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
Témoin	BN+ Surnageant	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
	BN + Surnageant	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
Natif	A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○

Figure 7: Microplaque utilisée pour tester l'effet du surnageant de bactéries lactiques sur *E.coli*

4.4. Antagonisme dans le lait

Dans le but de tester l'effet antagonisme de nos bactéries lactiques dans le lait, une souche a été choisie (8Lb1) comme étant la plus active pour tester son effet vis-à-vis de *S.aureus* en culture mixte. La culture mixte est contenue dans un flacon de 100ml de lait écrémé stérile (Soummam) qui estensemencée par 8Lb1 et *S.aureus* à raison de 4ml, 10^9 UFC/ml et 10^7 UFC/ml respectivement. En parallèle, les deux souches test et cible sont cultivées séparément (culture pure) dans 100ml de lait écrémé stérile.

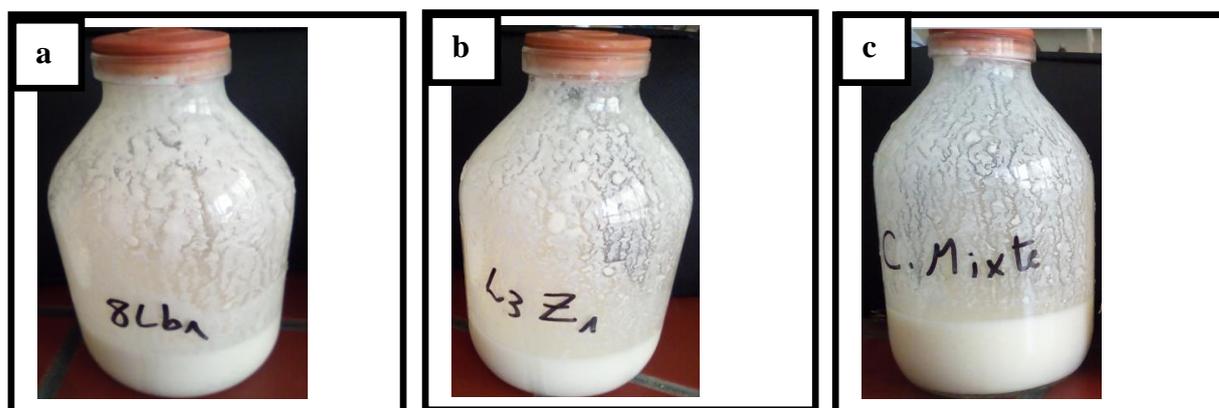


Figure 8 : Flacons utilisés dans le suivi de la croissance d'une culture mixte dans le lait

a : culture pure souche lactique + lait

b : culture pure *S.aureus* + lait

c : culture mixte les deux souches dans le lait

La croissance dans les trois flacons est suivie par la réalisation de dénombrements et une mesure d'acidité Dornic et de pH.

a- Dénombrement

Des prélèvements de 1ml à $t=0h$ et après 24h de chaque flacon ont subi des dilutions décimales dans l'eau physiologique allant jusqu'à 10^{-9} . Un volume de 1ml des dilutions 10^{-8} et 10^{-9} estensemencé en masse, dans la gélose MRS pour la souche lactique et dans Chapman pour *S.aureus* et la culture mixte. Un dénombrement est effectué à 0h et après 24h d'incubation, à raison de deux boîtes par dilution, qui sont incubées à $37^{\circ}C/24h$

à 48h. Au terme de la période d'incubation les colonies sont dénombrées et le résultat est exprimé en UFC/ml en utilisant la formule suivante :

$$N = \frac{(\Sigma c)}{(n1 + 0.1n2)} * (1/d)$$

Dont :

N : concentration bactérienne en UFC/ml

Σc : nombre de colonies comptées sur toutes les boîtes retenues

n1 : nombre de colonies retenues de la première dilution

n2 : nombre de colonies retenues de la deuxième dilution

d : dilution

b- Mesure de pH : le pH des deux cultures, mixte et culture pure, est mesuré à l'aide d'un pH mètre type(HANNA).

c- Mesure d'acidité Dornic : Cette méthode a pour but de déterminer par titration la concentration molaire en ions H_3O^+ cette concentration est exprimée en « degré Dornic ». Cette mesure se fait par la méthode normalisée par titrimétrie en utilisant une solution de NaOH à 1/9 normale après avoir ajouté 3 à 4 gouttes de phénol phtaléine (1%), et le titrage sous agitation.

Résultats et discussion

95201221011

1. Les souches lactiques :

1.1. Aspect macroscopique :

Après 24h d'incubation, le résultat sur milieu liquide bouillon MRS apparaît sous forme d'un trouble avec une zone claire en haut du tube. Cependant, sur milieu solide après 48h d'incubation, la croissance apparaît sous forme de petites colonies blanchâtres crémeuses (figure 9).

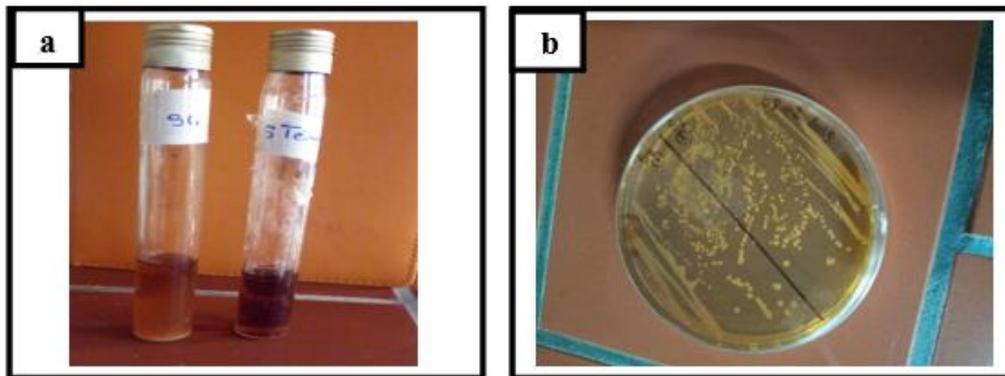


Figure 9 : Aspect des bactéries lactiques sur milieu MRS

a- Sur bouillon MRS

b- Sur gélose MRS

1.2. Test de catalase :

Les souches étudiées sont catalase négative car il n'y a pas de dégagement gazeux. Elles sont dépourvues d'activité catalasique. Les résultats obtenus confirment la pureté et l'appartenance des souches au groupe lactique (figure 10).



Figure 10 : Résultat du test de catalase

1.3. Aspect microscopique :

L'étude microscopique est basée sur la coloration de Gram qui nous a permis de confirmer que les bactéries étudiées sont de Gram positif (figure11) et se

présentent sous forme de bacilles (les Lactobacilles) avec différents modes d'associations. Les résultats sont illustrés dans le **tableau I en annexe I**. La figure suivante présente l'aspect d'une des souches utilisées sous microscope optique (Gx100)

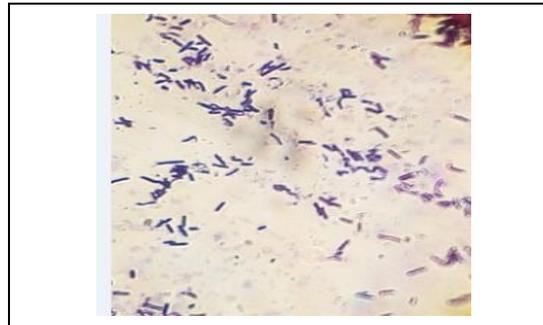


Figure 11 : Aspect microscopique d'une souche de bactéries lactiques sous microscope optique (Gx100)

Les résultats de la coloration de Gram et du test de catalase réalisés sur les colonies des bactéries lactiques qui sont développées sur la gélose MRS montrent que ce sont des souches pures.

2. Les bactéries pathogènes :

Deux souches de bactéries pathogènes ont été utilisées dans ce travail sont ensemencé chacune dans son milieu appropriée (Chapman, EMB), leurs aspect après incubation est présenté dans la **figure 12**.

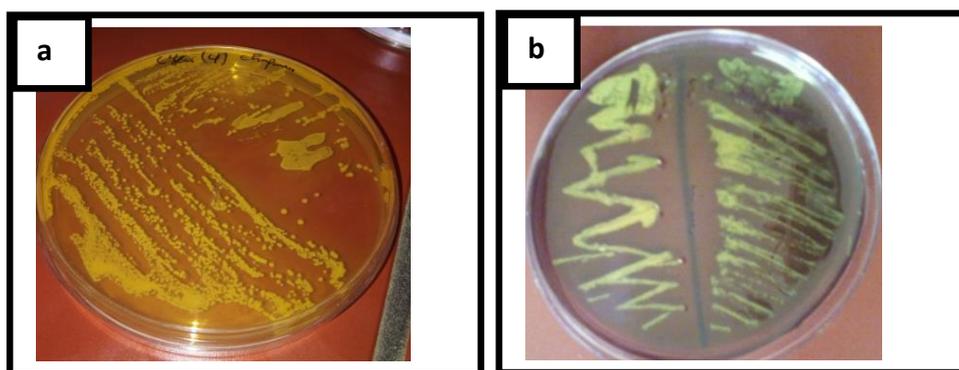


Figure 12 : Aspect macroscopique des souches de bactéries pathogènes

a/ Aspect de *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman.

b/ Aspect d'*Escherichia coli* sur milieu EMB.

- Sur milieu Chapman la croissance apparaît sous forme de colonies jaune dorée et changement de la couleur du milieu qui est due à la dégradation des sucres (mannitol).
- Sur milieu EMB la croissance apparaît sous forme de colonies verdâtres avec un éclat vert métallique caractéristique d'*E.coli*.

3. Résultats de la standardisation des souches test (bactéries lactiques) :

Les résultats de la standardisation de l'inoculum ont montrés que 5 colonies prélevées sur gélose MRS (48h/ 37°C), puis ensemencées sur bouillon MRS (Liofilchim, 610192-500GR), ensuite incubées à 37°C/24h à 48h, donnent un inoculum aux alentours de 10^9 UFC/ml (**TableauIII**).

Les résultats rapportés par **Bekka** et **Benmaouche** en **2017**, dans leur travail, où 4 colonies ont servi pour la standardisation des bactéries lactiques dans MRS, ont abouti à des résultats proches de nos résultats où la concentration cellulaire varie entre 10^8 et 10^9 UFC/ml.

Tableau IV : Résultats de la standardisation des bactéries lactiques prélevées :

Souche bactérienne	Nombre de colonies prises	Concentration cellulaire
S6	05	$1,2 \cdot 10^9$ UFC/ml
S11	05	$2,3 \cdot 10^8$ UFC/ml
S35	05	$4,2 \cdot 10^9$ UFC/ml
13Br	05	$6,4 \cdot 10^9$ UFC/ml
15Br	05	$5,6 \cdot 10^8$ UFC/ml
3Br	05	$3,8 \cdot 10^8$ UFC/ml
8Lb1	05	$2,7 \cdot 10^8$ UFC/ml
16Lb	05	$7,1 \cdot 10^9$ UFC/ml
<i>Lb.plantarum</i>	05	$2,5 \cdot 10^9$ UFC/ml

4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques :

4.1. Méthode directe (Test des spots) :

L'activité antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis des pathogènes apparaît sous forme de zones claires autour de chaque spot et qui diffèrent par leur diamètre.

a- A l'égard de *S.aureus* :

Le test de spot a révélé une bonne activité antibactérienne des bactéries lactiques à l'égard des souches de *S.aureus* (**figure14**). On note que la meilleure activité inhibitrice est observée chez la souche S35 sur la St4, avec une zone d'inhibition de 23mm. Egalement la souche 16 Lb a eu une bonne activité à l'égard de St20 avec une zone d'inhibition de 22mm, *Lb.plantarum* à l'égard de St1 avec une zone d'inhibition de 23mm. Néanmoins, les plus faibles zones d'inhibition sont obtenues par la souche 3Br. Les souches S6 et S11 ne présentent aucun effet inhibiteur sur la St6 (**figure13 et 14**).

En effet, **Labioui et al. (2005)** ont rapporté que les diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques à l'égard de *S.aureus* varient dans un intervalle de 23 ± 0.3 .

Selon **Dal Bello, (2009)** les bactéries lactiques sont douées d'une activité antibactérienne vis-à-vis de *S.aureus* par la production de plusieurs métabolites (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, et les bactériocines).

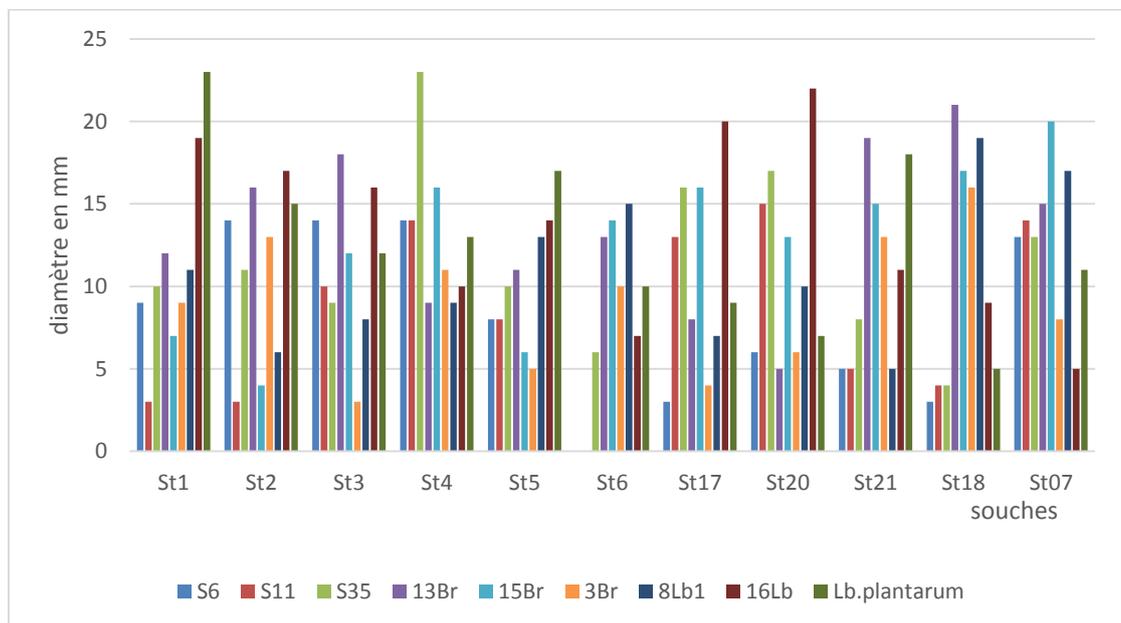


Figure 13 : Activité antibactérienne des différentes souches du genre *Lactobacillus* à l'égard de *S.aureus* obtenus par le test des spots

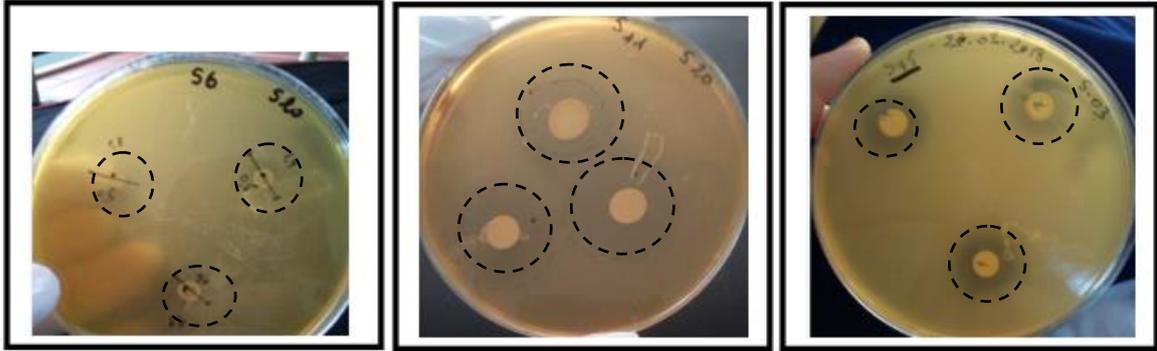


Figure 14 : Exemples de résultats obtenus par le test de spots à l'égard de *S.aureus*

b- A l'égard d'*E.coli* :

Dans le cas d'*E.coli*, le test a révélé également une bonne activité antibactérienne pour toutes les souches (**figure 15**). Notant que la meilleure activité est enregistrée chez la 13Br contre la souche E7 avec une zone d'inhibition de 22mm. Dans un second lieu, vient la souche S6 à l'égard de la souche E7 avec une zone d'inhibition de 20mm. D'autre côté la plus faible activité est celle de 15Br contre E20 avec une zone d'inhibition de 3mm (**figure 16**).

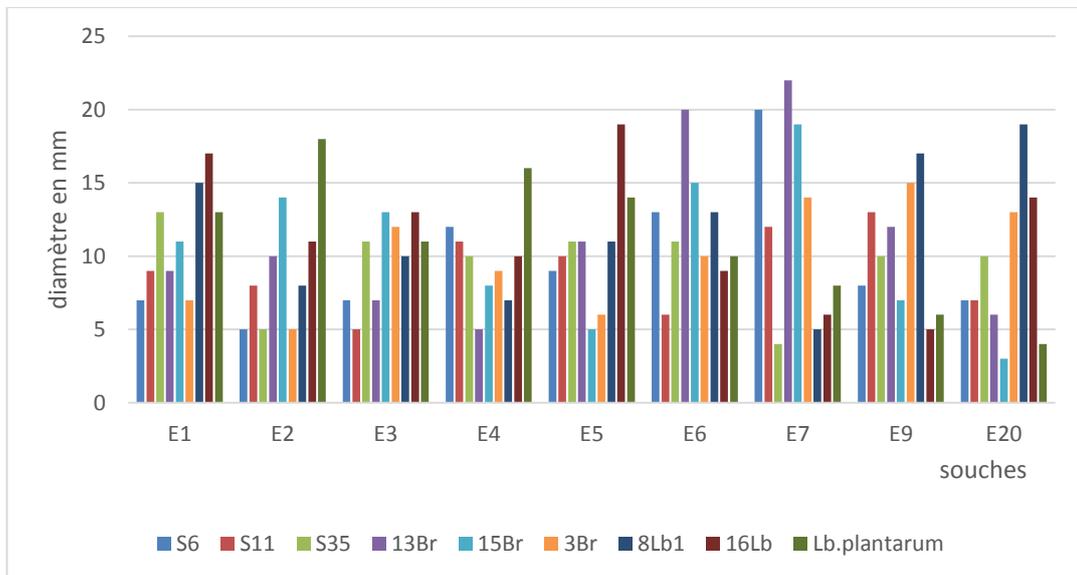


Figure 15 : Activité antibactérienne des différentes souches du genre *Lactobacillus* à l'égard d'*E.coli* obtenus par le test des spots

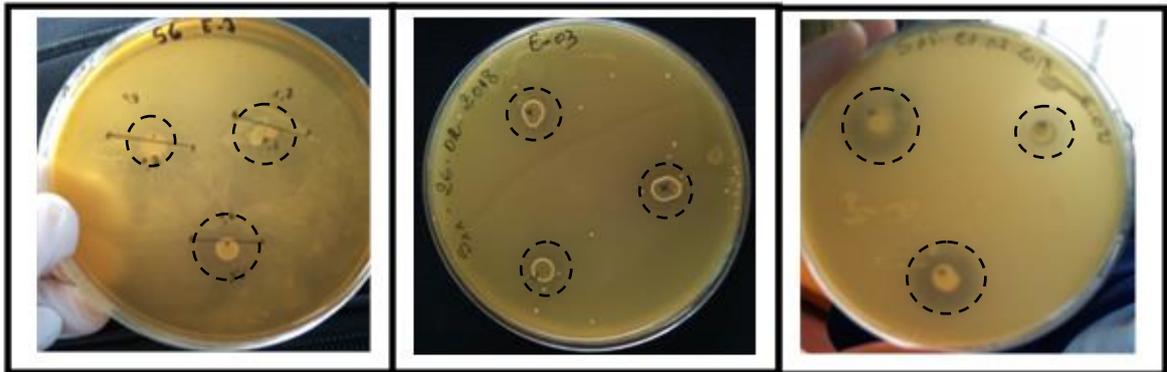


Figure 16 : Exemples de résultats obtenus par le test de spots à l'égard d'*E.coli*

A travers le test de spot réalisé, nous avons constaté que toutes les bactéries lactiques utilisées présentent un effet antibactérien vis-à-vis des bactéries pathogènes, et qui se résume par les zones d'inhibition autour de chaque spot. On peut attribuer ce phénomène aux différents métabolites excrétés tels que : l'acide lactique, d'autres acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, les bactériocines et le dioxyde de carbone (Leveau *et al.* 1991 ; Klaenhammer *et al.* 1994 ; De Vuyst et Leroy, 2007).

Des résultats similaires à cette étude (où les bactéries lactiques isolées à partir de certains produits laitiers) présentent un effet antagoniste vis-à-vis d'*E.coli* et *S.aureus*, ont été rapportés par Allouche *et al.*, 2010.

Savadojo *et al.*, (2004) ont rapporté que les diamètres des zones d'inhibitions des bactéries lactiques sont de l'ordre de 8 à 9mm à l'égard d'*E.coli*. Nos tests ont révélé des diamètres plus importants qui sont de 8 à 22mm.

4.2. Méthode indirecte (Test des puits) :

➤ Cas du surnageant natif :

a. A l'égard de *S.aureus* :

D'après les résultats représentés dans la **figure17**, les surnageants des trois souches S6, S11, S35 ne présentent aucune inhibition vis-à-vis des souches sauf pour la St6. La souche 13Br présente une meilleure activité contre St18 avec une zone d'inhibition de 18mm.

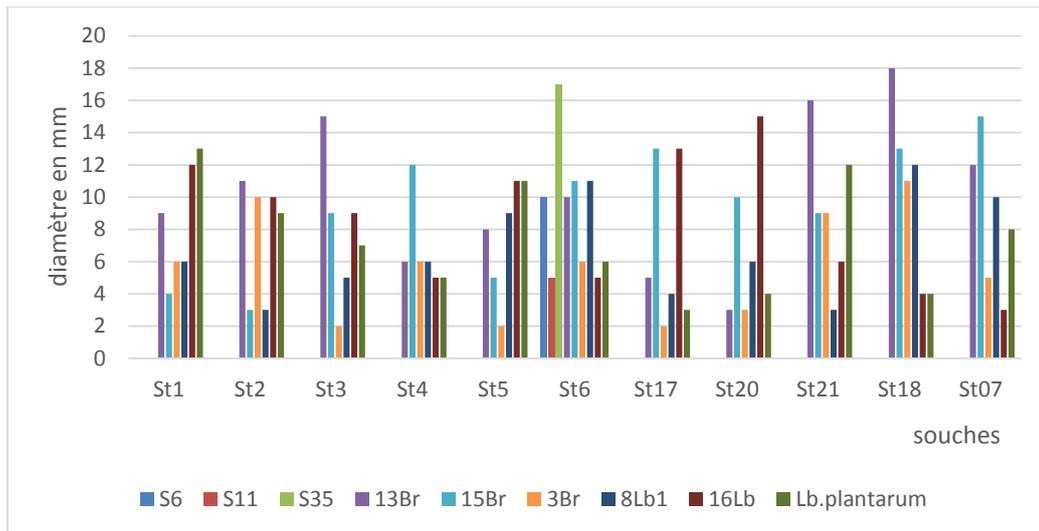


Figure17 : Activité antibactérienne des différentes souches du genre *Lactobacillus* à l'égard de *S.aureus* obtenus par le test des puits (surnageant natif)

b. A l'égard d'*E.coli*

D'après les résultats représentés dans les figures 18 et 19, la souche 13Br présente un effet antibactérien important vis-à-vis la souche E7 avec une zone d'inhibition de 16mm.

L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1 mm (Schillinger et Lucke, 1901)

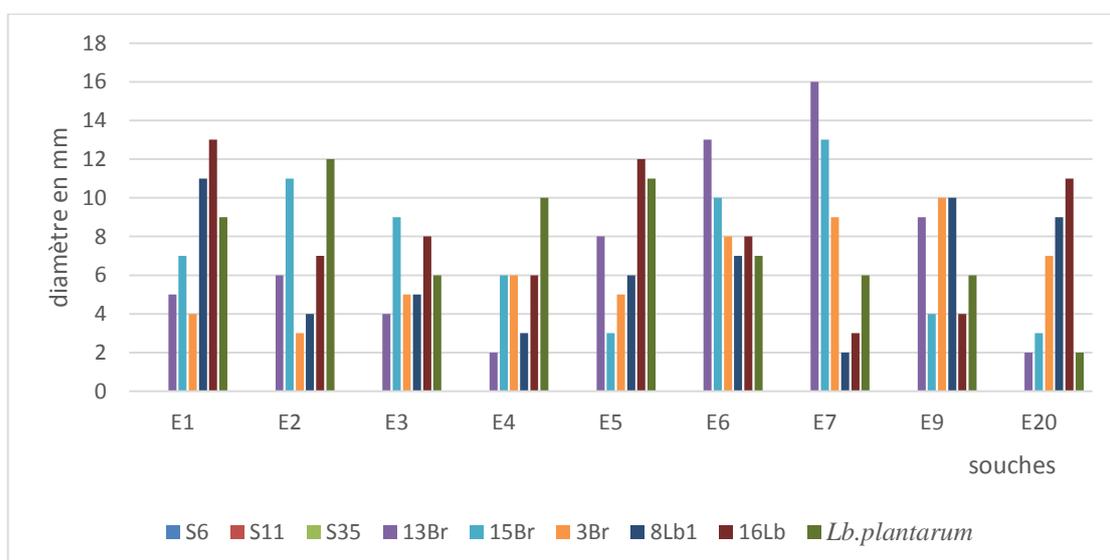


Figure 18 : Activité antibactérienne des différentes souches du genre *Lactobacillus* à l'égard d'*E.coli* obtenus par le test des puits (surnageant natif)

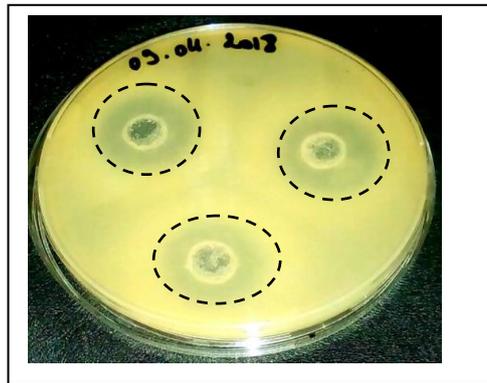


Figure 19 : Exemple de résultats obtenue par le test de puits avec le surnageant natif

➤ Cas du surnageant neutralisé :

a. A l'égard de *S.aureus* :

Dans ce cas, également la souche S35 présente un effet inhibiteur important sur la St6 avec une zone d'inhibition de 18mm. Alors qu'avec les autres souches, elle ne présente aucune inhibition.

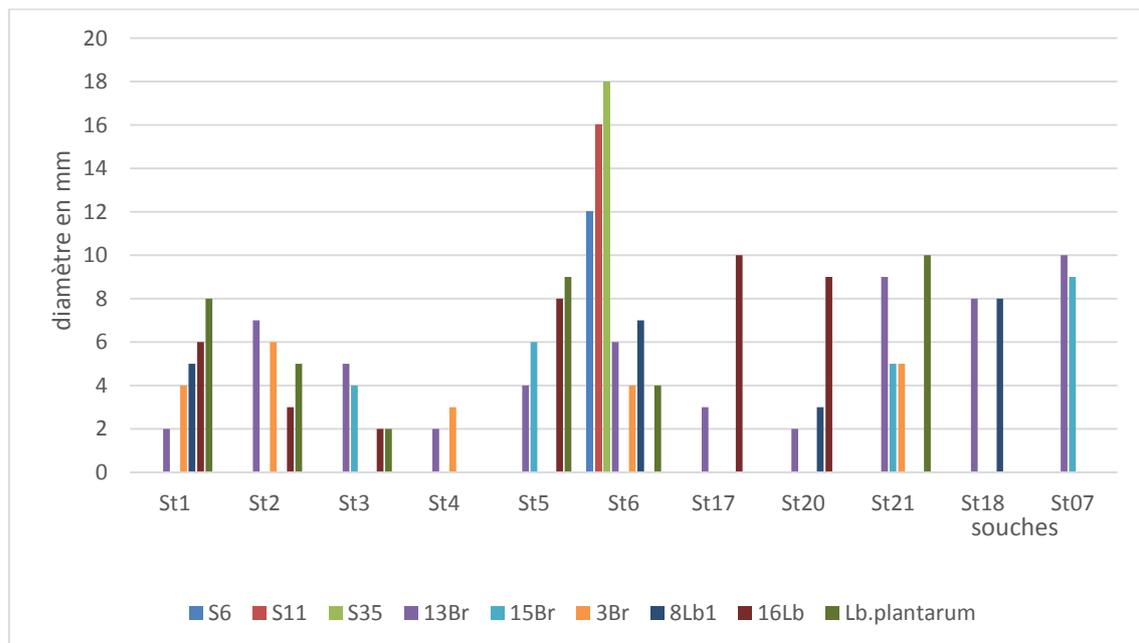


Figure 20 : Activité antibactérienne des différentes souches du genre *Lactobacillus* à l'égard de *S.aureus* obtenus par le test des puits (surnageant neutralisé)

b. l'égard d'*E.coli* :

L'activité n'est pas très importante sauf pour quelques souches tels que : 16Lb, 13Br, 15Br, S35 avec des zones d'inhibition de 10mm (**figure 22**), alors que avec la 8Lb₁ et 3Br aucune zone d'inhibition n'est observée (**figure 21**).

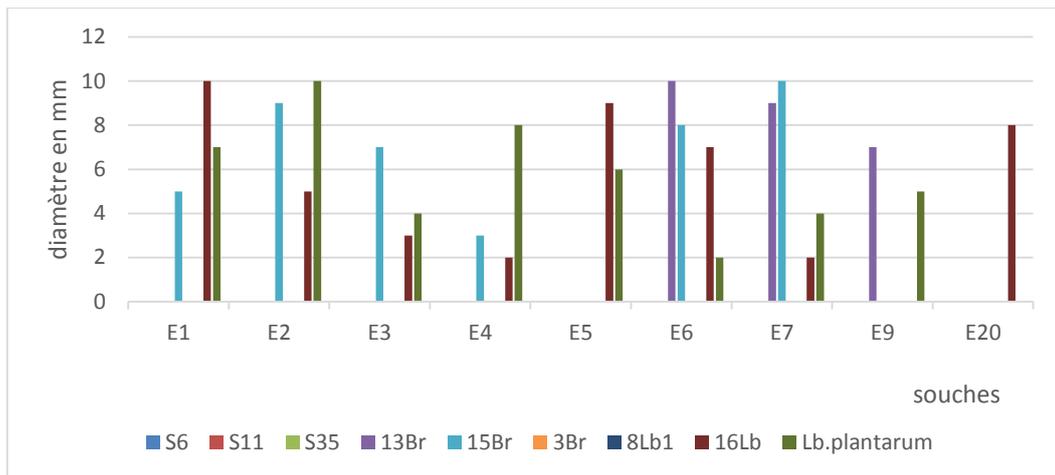


Figure 21 : Activité antibactérienne des différentes souches du genre *Lactobacillus* à l'égard d'*E.coli* obtenus par le test des puits (surnageant neutralisé)



Figure 22 : Exemple de résultats obtenu par le test de puits cas du surnageant neutralisé

Nos résultats apportent que l'effet antibactérien des lactobacilles à l'égard d'*E.coli* est dû probablement aux bactériocines. Alors que **Abedi et al. (2012)** ont montrés que l'inhibition de la croissance d'*E.coli* par *Lactobacillus* est liée principalement à l'acide lactique.

En travaillant dans des conditions expérimentales éliminant l'influence de l'acide lactique, l'activité antimicrobienne due à l'action de la bactériocine pour les différentes souches de *Lactobacillus* utilisées, a révélé un spectre d'inhibition étroit, dirigé notamment vis-à-vis des germes cibles: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Il est important de relever que les résultats obtenus à travers l'utilisation des souches *Lactobacillus* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* se rapprochent de ceux cités dans la littérature de **Muriana et al.(1987)**, **Barefoot et al.(1994)**, **Tenbrink et al.(1994)**, **Kanatani et al.(1995)**, **Zamfir et al.(1999)**.

4.3. Antagonisme en microplaque :

Le but de cette étape est de chercher l'activité antibactérienne dans le surnageant de culture de bactéries lactiques, et de savoir également s'il s'agit d'un effet bactériostatique ou bactéricide. L'antagonisme est recherché dans le surnageant natif et neutralisé.

Les deux figures **23** et **24** représentent les résultats obtenus après avoir mesuré la densité optique des deux microplaques à $t=0h$ et à $t=24h$. Une différence d'absorbance est observée, ce qui indique d'une différence d'activité antibactérienne. L'inhibition de *S.aureus* et de celle d'*E.coli* sont différentes que ce soit en surnageant natif ou neutralisé.

a. A l'égard de *S.aureus* :

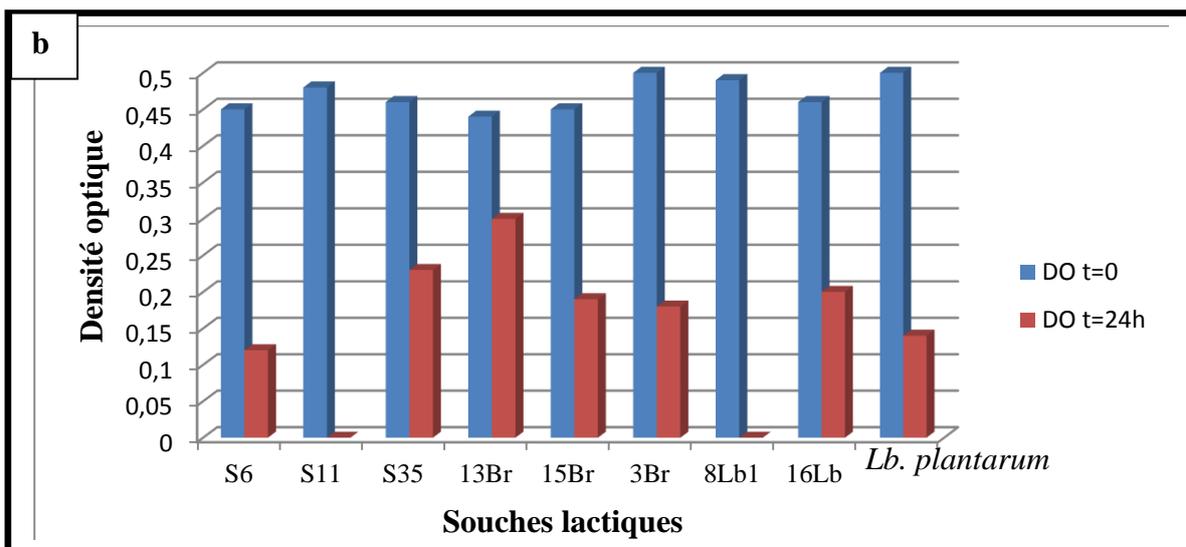
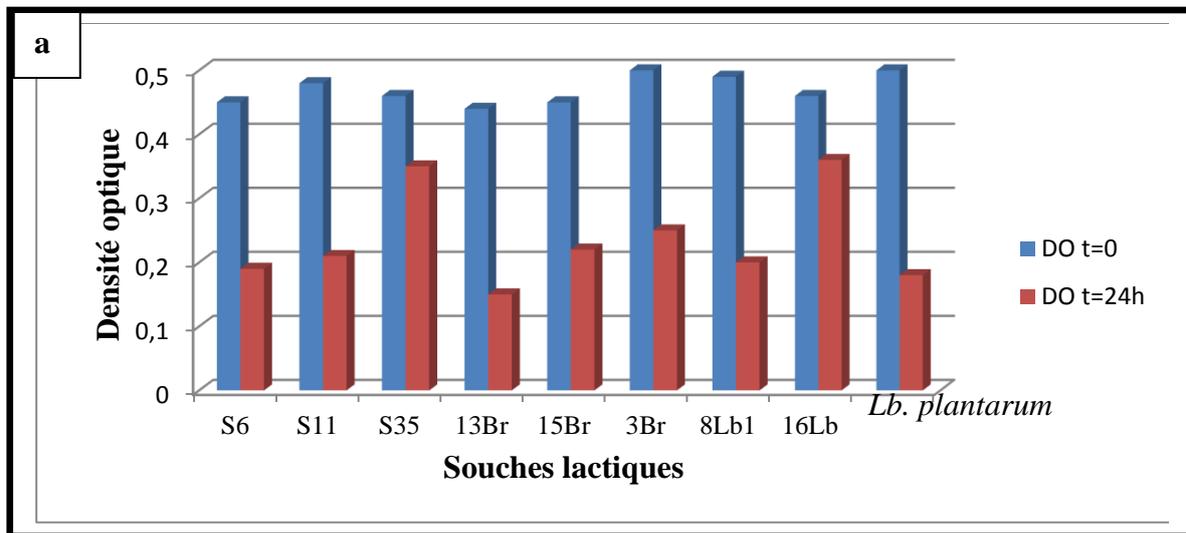


Figure 23 : Résultats de l'effet antagoniste des surnageant natif et neutralisé des bactéries lactiques vis-à-vis de *S.aureus*

a/ Surnageant natif

b/ Surnageant neutralisé

Les différences de la densité optique sont toutes négatives que ce soit en surnageant natif ou neutralisé donc l'activité des lactobacilles est noté positive sur *S.aureus* (**tableaux X et XI, annexe III**)

Les souches S11 et 8Lb1 après 24h d'incubation, et après avoir mesuré la densité optique aucune absorbance n'est enregistré ce qui signifie l'élimination totale des bactéries (*S.aureus*) après 24h.

b. A l'égard d'*E.coli* :

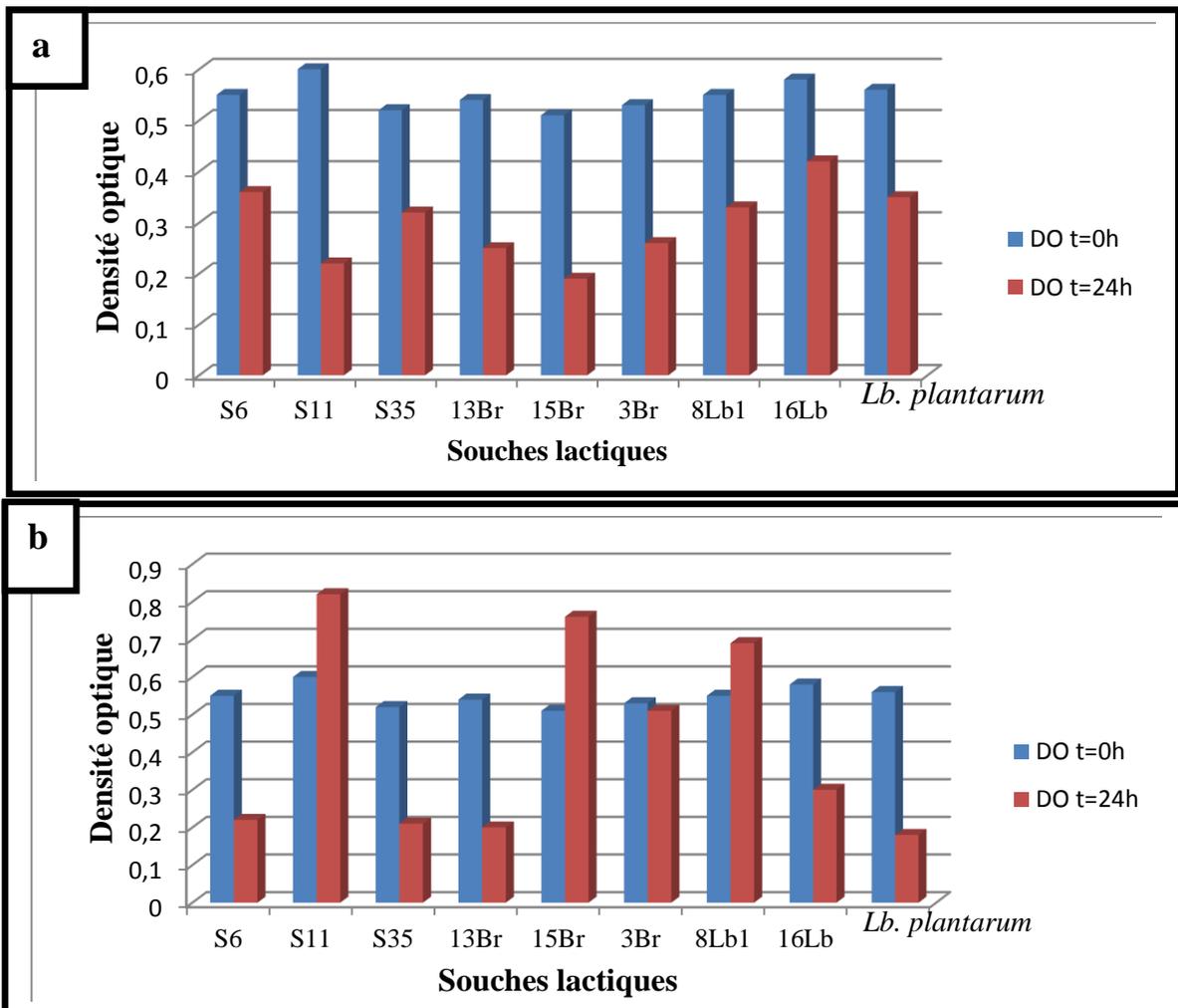


Figure 24 : Résultats de l'effet antagoniste des surnageant natif et neutralisé des bactéries lactiques vis-à-vis d'*E.coli*

a/ Surnageant natif

b/ Surnageant neutralisé

En comparant les différences d'absorbances pour *E.coli*, en utilisant un surnageant natif, on remarque que toutes les valeurs sont négatives ce qui se traduit par une diminution d'absorbance de 0,34, 0,31, 0,38 pour les souches 13Br, S35 et *Lb.plantarum* respectivement, donc l'effet inhibiteur est enregistré. Des diminutions d'absorbance similaire en surnageant neutralisé ont été révélées sauf pour les souches : S11, 15Br, 8Lb₁ qui ne présentent pas d'effet antibactérien. (Tableaux XII et XIII, annexe III)

4.4. Etude de l'antagonisme dans le lait écrémé :

- **Suivi de la croissance :**

Pour l'étude de l'antagonisme dans le lait en culture mixte et pure, une de nos bactéries lactiques a été choisie pour ce dernier, la 8Lb₁, à l'égard de *S.aureus* (L3z₁) et cela est effectué en culture mixte dans le lait écrémé (Soummam). Les cultures pures de L3z₁ et 8Lb₁ ont servi comme témoin. Un dénombrement a été réalisé à t=0h et t=24h après incubation à 37°C/24h à 48h. **La figure 25** montre les résultats obtenus dont la souche L3z₁ en culture pure présente une croissance normale en comparant entre t=0h et t=24h. **Rousseau(2004), Charlier et al.(2009)** ont trouvés que certains bactéries lactiques pouvaient inhiber le *S.aureus* par compétition nutritionnelle, **landolo et al.(1965)** ont montrés qu'en culture mixte, la diminution de la disponibilité des nutriments intervenait dans l'inhibition de *S.aureus*. La figure suivante présente la cinétique de croissance en culture pure et en culture mixte de *S.aureus*.

S.aureus L3z₁ en culture pure présente une croissance normale alors qu'en culture mixte y'a eu un abaissement, donc cela peut être interpréter que la croissance de *S.aureus* L3z₁ est inhibée par la souche 8Lb₁

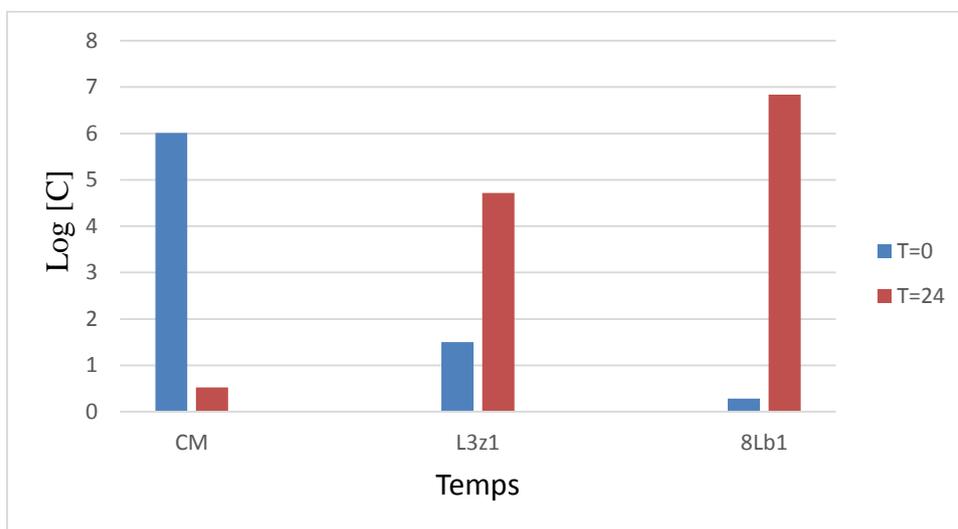


Figure 25 : Cinétique de croissance de L3z₁ et 8Lb₁ en culture pure et en culture mixte dans le lait écrémé

- Mesure de pH et d'acidité Dornic :

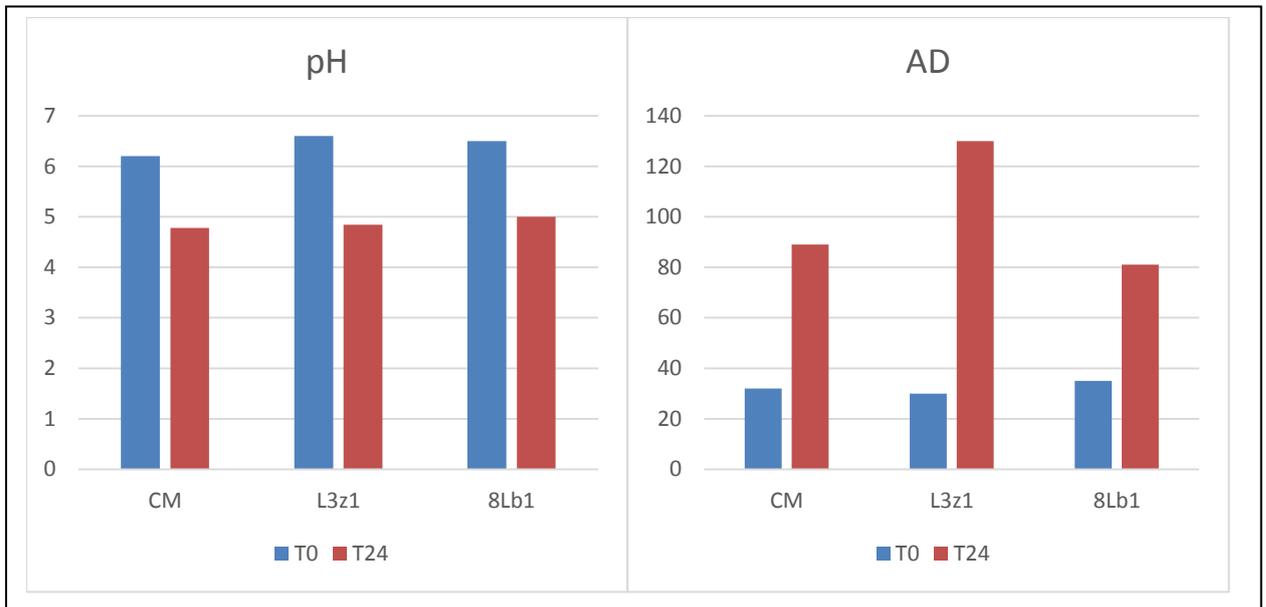


Figure 26 : Evolution du pH et de l'acidité Dornic (AD) de L3z1 et 8Lb1 en culture pure et en culture mixte dans le lait écrémé

S.aureus (L3z1) présente une acidité Dornic importante de 130 °D en culture pure alors que la souche 8Lb1 avec une valeur de 81 °D, d'autre part, elle est de valeur 89 °D en culture mixte après 24h d'incubation. Un abaissement de pH est enregistré dans les cultures et cela peut être expliqué par l'acidification et la coagulation du lait (**figure 26**).

Conclusion

Conclusion :

Ce travail a été basé sur la recherche de l'activité antibactérienne de 09 bactéries lactiques, isolées de différents produits tels que : le lait, le lben, le smen..... À l'égard de deux types de bactéries pathogènes: *S.aureus* et *E.coli* qui sont de deux origines médicale et alimentaire en utilisant le test de spots et le test de puits, également pour déterminer la nature de cet effet inhibiteur on a opté à tester le surnageant neutralisé et aussi l'antagonisme en microplaque.

Les tests effectués ont abouti aux résultats suivants :

- **Pour le test de spots :** qui est un test directe, la majorité des souches lactiques utilisées ont révélées une bonne activité antibactérienne sur les pathogènes utilisées citant que les meilleures activités est enregistrée chez la 13Br contre la souche E7 avec une zone d'inhibition de 22mm et la souche S35 sur la St4, avec une zone d'inhibition de 23mm.
- **Pour le test de puits :** qui est la méthode indirecte en utilisant les surnageant de culture neutralisé pour les souches ayant déjà présentais un effet inhibiteur vis-à-vis des pathogènes pour déterminer la nature de la substance inhibitrice. La souche S35 présente un effet inhibiteur remarquable sur la St6 avec une zone d'inhibition de 18mm et les souches 8Lb₁ et 3Br ne présentent pas d'activité à l'égard des souches d'*E.coli* testées.

Les résultats obtenus affirment que nos bactéries lactiques sont dotés d'une activité antibactérienne dont elle a attribuée à une substance protéique qui est probablement les bactériocines, d'après les résultats du surnageant neutralisé.

Pour cela, et en perspective, nous suggérons de :

- Rechercher la nature exacte des facteurs inhibiteurs (bactériocines, polysaccharides...)
- Déterminer le mode d'action à l'égard d'*E.coli* et de *S.aureus* (bactéricide ou bactériostatique).
- Tester sur une large gamme de souches d'*E.coli* et *S.aureus*.

*Références
bibliographique*

A

- **Abedi D, Feizizadeh S, Akbari V and Jafarin-Dehkordi A. (2012).** *In vitro* anti bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 8(4) : 261-268.
- **Allouche F.N., Hellal A., Laraba A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie*, 03 : 13 - 20
- **Ammor S., Dufour E., Zagorec M., Chaillou S. et Chevallier I. (2005).** Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food microbiology*, 22 : 529–538.
- **Ammor S., Tauveron G., Dufour E. et Chevallier I. (2006).** Antibacterial 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 Control*, 17:454–461.
- **Ammor M. S., Mayo B. (2007).** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production, an update. *Meat Science*, 76 : 138-146.
- **Aymerich (M.T.), Garriga (M.), Monfort (J.M.), Nes (I.), Hugas (M.)- (2000)** Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. - *Food Microbiol.*, 17(1), 33-45

B

- **Barefoot S.F, T.achen. Ying-ruhughes, A.B. Bodine. M.Y., Shearer M.D. Hughes (1994),** Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Appl..Environ Microbiol*, 60 3522–3528.

- **Blanco J. E., Blanco M., Mora A et Blanco J. (1997).** Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with *in vivo* pathogenicity. *Journal of Clinical Microbiology* 35:2953-2957.
- **Bekka S et Benmaouche C, 2017.** Etude de l'activité anti-*Staphylococcus aureus* de souches de bactéries lactique isolées de quelque produit laitier fabriqué artisanalement. P 26

C

- **Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., et Vignolo, G. (2008).** A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79 :483–499.
- **Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., et Vignolo, G. (2008).** A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79 : 483–499.
- **Cogan T.M. et Hill C. (1993).** Cheese starter cultures. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese Chemistry Physics and Microbiology*. Vol. 1, Second Edition, *Chapman and Hall, London*, pp. 193-471.
- **Cogan T.M. (1986).** The leuconostocs: Milk products. In : Gilliland, S.E. (Ed.), *Bacterial Starter Cultures for Foods*, *Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, Florida*, pp 25-40.
- **Collins M., Samelis J., Metaxopoulos J., et Wallbanks S. (1993).** Taxonomic studies of some *Leuconostoc* like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology*. (75) : 595-603.

D

- **Dalie D. K. D., Deschamps A. M. et Richard F. (2010).** Lactic acid bacteria– Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21: 370–380.
- **Dellaglio F., de Roissard H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D., (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage*. **1** : 25-116.
- **Dortu C et Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13 (1) : 143-154.

E

- **Eklund, T., (1989).** Organic acids and esters. In: Gould, G.W. (Ed.), Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures, *Elsevier Applied Science*, London, pp. 161- 200.

F

- **Federighi, M. (2005).** Bactériologie Alimentaire compendium d'hygiène des aliments. 2^{ème} Edition, Economica. 292 p.

G

- **Gyles C.L. (2007).** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* : an overview. *Journal of Animal Science*, 85(13 Suppl) : 45-62.

H

- **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. Ed by : Riley M.A. et

Chavan M.A :Bacteriocins :Ecology and Evolution, Eds. Springer Science Business Media, Heidelberg, 45-92.

- **Ho .N.T ., Tuan N ., Deschamps A. et Caubet R.(2007).** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *International. Workshop on Food Safety and Processing Technology.* 134-142.

J

- **Jasniewski J. (2008).** Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous-classe Ia, Thèse :Procédés Biotechnologiques et Alimentaires, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, Institut National Polytechnique de Lorraine, France,p 155.
- **Jay M.J. (1992).** Modern Microbiology, Van Nostrand Reinhold, 4th ed., New York. 37 1-409
- **Jean L. A., Henry D., François D., Henri M. (1992).** bactériologie clinique 2ème édition,pp152, 507
- **Johnson, T. J., et L. K. Nolan. (2009).** Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and. Molecular. Biology. Review.* 73:750-774.
- **Juillard V .,Spinnler H.E ., Desmazeaud J ., Boquien C.V. (1987).** Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Lait*, 67(2) : 149-172

K

- **Kanatani K, M. Oshimura et K..Sano (1995),** Isolation and characterisation of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol*, 61: 1061–1067.

- **Karska-Wysocka B., M Bazon, W. Smoragiewicz (2010)**, Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Microbiological Research Available online* 29 January .
- **Khalid N.M. et Marth E.H., (1990)**. Lactobacilli, their enzymes and role. In : Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* 73: 158-167.
- **Klaenhammer (T.R.) (1988)**-Bacteriocins of lactic acid bacteria. - *Biochimie*, 70, 337-349.
- **Klein G., Pack A., Bonaparte C. ET Reuter G. (1998)**. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 103-125.

L

- **Labioui H. Elmoualdi L. El Yachoui M. et Ouhssine M (2005)**. Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. vol. 2, n°144, pp. 237-250.
- **Landolo J. Carol W. Clark, Leslie B, John Ordal Z (1965)**. Repression of *Staphylococcus aureus* in associative Culture. Vol. 13, n°5, pp. 646-649
- **Leclerc H., Gaillard F L. ET Simonet M., (1994)**. Les grands groupes de bactéries. In : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. *DOIN*. Paris. 445p.
- **Léonard L. (2013)**. Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique, Thèse : Sciences de l'Alimentation, Université de Bourgogne, France, pp 8-18.
- **Leveau J-Y., Bouixmrielle, De Roissart H., (1991)**. La flore lactique on Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Bourgois C.M., Leveau J-Y. Tec&Doc, Lavoisier, 152p

- **Levine, M.M. (1987).** *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *The Journal of Infectious Diseases*, 155(3), p.377-389.
- **Lindgren S.E. et Dobrogosz W.J. (1990).** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology. Review.* 87: 149-164.

M

- **Magusson, J. et Schnurer, J. (2001).** *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1-5.
- **Mellata M., Jeffrey W.T. et Roy.C (2009).** Full Sequence and Comparative Analysis of the Plasmid pAPEC-1 of Avian Pathogenic *E-coli* chi 7122 (O78 : K80 :H9). *PLoS One* 4(1) : 32- 42.
- **Muriana.P.M, T.R. Klaenhammer (1987),** Conjugal transfer of plasmid encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol*, 53 :553– 560.

N

- **Nataro J. P. et Kaper J.B. (1998).** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology. Review*, 11 : 142-201

O

- **Olasupo N. A., Fitzgerald D. J., Gasson M. J. et Narbad, A. (2003).** Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enteric* serovar Typhimurium. *Letters In Applied Microbiology*, 37: 448–451.

P

- **Piard J.C. et Desmazeaud M. (1992).** Inhibitory factors produced by lactic acid bacteria. *Bacteriocins and other antibacterial substances*, 72 (2) : 113-142.

R

- **Reis J. A., Paula A. T., Casarotti S. N. et Penna, A. L. B. (2012).** Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, 4 :124-140.
- **Russo T.A. et Johnson J. R. (2000).** Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5) :1753-1754.

S

- **Salminen S. et Von Wright A. (2009).** Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. *Third Edition Taylor & Francis*.
- **Savadogo, A., Ouattara, C.A.T, Savadogo, P.W., Ouattara, A.S., Barro, N. and Traore, A.S (2004),** microorganisms involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso, vol.3, n°2, p.134-139.
- **Schillinger et F.K. Luke (1989),** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1901–1906.
- **Stenutz R., Weintraub A. et Widmalm G. (2006).** The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 30(3) : 382-403.
- **Stiles M. et Holzappel W.H. (1997).** Review article Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of food microbiology*. 36:1-29

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
- **Ten brink B, M. Mineku S, J.M. B.M. Vander Vossen, R.J. Leer et J.H.J. Huis IN'T Veld (1994),** Antimicrobial activity of *Lactobacilli*: preliminary characterisation and optimisation of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol*, 77: 140–148.

V

- **Van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S. D. et Maguin E. (2002).** Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 187–216.

W

- **Wijaya A., Neudeker C., Holzapfel W. et Franz C. (2006).** Influence of bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* BFE 1071 on *Lactobacillus* spp. In the rat gastrointestinal tract. *Proceedings of Food Microbiology, August 2006, University of Bologna, Bologna, Italy*, p124

Z

- **Zamfir M., R. Cailewaert, P.C Cornea, L savu, L Vatafu. et L. Devuyst (1999),** Purification and characterisation of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *J. Appl. Microbiol*, 87:923–931.
- **Zagorec M et Christians S. (2013).** Flore protectrice pour la conservation des aliments. *QUAI. Paris*. 145p.

Annexes

Annexe I

Observation microscopique

Tableau I : Résumé de l'observation microscopique des souches isolées sur milieu MRS

Souche	Gram	Catalase	Forme	Mode de regroupement
3Br	+	-	Bacilles, courte, allongé, bâtonnet, filamenteuses,	Isolé, en paires ou en chainettes
13Br	+	-		
15Br	+	-		
8Lb₁	+	-		
16Lb	+	-		
<i>Lb. Plantarum</i>	+	-		
S6	+	-		
S11	+	-		
S35	+	-		

Annexe II

Les milieux de cultures

Milieu MRS (De man Rogossa et sharp,) : utilisé pour la culture des Lactobacilles (Liofilchim, 610192-500GR)..

Ingrédients	Poids g/ml
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Peptone	10g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Citrate de sodium	2g
Acétate de sodium	1g
Sulfate de manganèse	0.05g
Phosphate potassique	2g
Eau distillée	1000ml

pH 7.2

Autoclavage 120°C pendant 20min

Gélose nutritif

Ingredients	Poids g/ml
Peptone	5g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
NaCl	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH 7

Autoclavage à 121°C pendant 30min

Mueller Hinton (Mueller et Hinton) (Indicia. Version 01.2012).

Ingrédients	Poids g/ml
Hydrolysate acide de caséine	17.5g
Extrait de viande	2g
amidon	1.5g
agar	17g
Eau distillée	1000ml

pH final à 25°C : 7,3 ± 0,1

Autoclavage à 121°C pendant 30min

Eau physiologique

Ingrédients	Poids g/ml
NaCl	9g
Eau distillée	1000ml

Chapman (indicia Version 02.2010)

Ingrédients	poids (g/L)
Extrait de viande de bœuf	1
Peptones	10
Mannitol	10
Chlorure de sodium	75
Rouge de Phénol	0.025
Agar	15

pH 7

Autoclavage à 121°C pendant 30min

Bouillon BHI (Bouillon Coeur Cervele) (Indicia. Version 03.2012)

Ingrédients	poids (g/L)
Extrait de coeur	5
Extrait de cervelle	12.50
Peptone	10
Glucose	2
Chlorure de sodium	5
Phosphate disodique	2.5

pH final à 25°C : 7,4 ± 0,2

Autoclavage à 121°C pendant 30min

Matériel utilisé

1. Produits chimiques et réactifs	2. Autre matériel
<ul style="list-style-type: none">• Violet de Gentienne ;• Fushine ;• Lugol ;• Alcool ;• L'huile à émersion pour l'observation microscopique ;• Phénol phtaléine (1%) et la soude Dornic (N/9) ;• HCl (1N) et NaOH (1N) : pour l'ajustement du pH• Eau oxygénée 10V	<ul style="list-style-type: none">• Autoclave ;• Bain marie ;• Balance ;• Vortex ;• pH mètre ;• Centrifugeuse ;• Etuve (Memmert) ;• Four pasteur ;• Microscope optique ;• Réfrigérateur ;• Pipette pasteur, micropipette, burette, bécher, anse de platine ;• Boite Pétri, tubes à essais, flacons.

Annexe III

Résultats

I. Cinétique de croissance :

Tableau II : Acidité Dornic et le pH de *Lactobacillus* dans le lait écrémé

Temps (heures)	0	24
Acidité dornic	31	81
pH	6.5	5.00

Tableau III : Cinétique de croissance de *S.aureus* (**log du nombre de cellules/ml**) en culture mixte et en culture pure dans le lait écrémé

Temps (heures)	0	24
LogN de <i>S.aureus</i>/ml <i>Lactobacillus</i> + <i>S.aureus</i>	6.01	0.52
<i>S.aureus</i>	1.5	4.72
<i>Lactobacillus</i>	0.28	6.84

II. Résultats du test des spots :

Tableau IV : Résultats du test des spots à l'égard de *S.aureus*

	St1	St2	St3	St4	St5	St6	St17	St20	St21	St18	St07
S6	09	14	14	14	08	00	03	06	05	03	13
S11	03	03	10	14	08	00	13	15	05	04	14
S35	10	11	09	23	10	06	16	17	08	04	13
13Br	12	16	18	09	11	13	08	05	19	21	15
15Br	07	04	12	16	06	14	16	13	15	17	20
3Br	09	13	03	11	05	10	04	06	13	16	08
8Lb1	11	06	08	09	13	15	07	10	05	19	17
16Lb	19	17	16	10	14	07	20	22	11	09	05
<i>Lb.plantarum</i>	23	15	12	13	17	10	09	07	18	05	11

Tableau V : Résultats du test des spots à l'égard d'*E.coli*

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E9	E20
S6	07	05	07	12	09	13	20	08	07
S11	09	08	05	11	10	06	12	13	07
S35	13	05	11	10	11	11	04	10	10
13Br	09	10	07	05	11	20	22	12	06
15Br	11	14	13	08	05	15	19	07	03
3Br	07	05	12	09	06	10	14	15	13
8Lb1	15	08	10	07	11	13	05	17	19
16Lb	17	11	13	10	19	09	06	05	14
<i>Lb.plantarum</i>	13	18	11	16	14	10	08	06	04

III. Résultats du test des puits

III.1. Avec le Surnageant natif :

Tableau VI : Résultats du test des puits à l'égard de *S.aureus* avec le surnageant natif.

	St1	St2	St3	St4	St5	St6	St17	St20	St21	St18	St07
S6	00	00	00	00	00	10	00	00	00	00	00
S11	00	00	00	00	00	05	00	00	00	00	00
S35	00	00	00	00	00	17	00	00	00	00	00
13Br	09	11	15	06	08	10	05	03	16	18	12
15Br	04	03	09	12	05	11	13	10	09	13	15
3Br	06	10	02	06	02	06	02	03	09	11	05
8Lb1	06	03	05	06	09	11	04	06	03	12	10
16Lb	12	10	09	05	11	05	13	15	06	04	03
<i>Lb.plantarum</i>	13	09	07	05	11	06	03	04	12	04	08

Tableau VII : Résultats du Test des puits à l'égard d'*E.coli* avec le surnageant natif

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E9	E20
S6	ID								
S11	ID								
S35	ID								
13Br	05	06	04	02	08	13	16	09	02
15Br	07	11	09	06	03	10	13	04	03
3Br	04	03	05	06	05	08	09	10	07
8Lb1	11	04	05	03	06	07	02	10	09
16Lb	13	07	08	06	12	08	03	04	11
<i>Lb.plantarum</i>	09	12	06	10	11	07	06	06	02

III.1. Avec le Surnageant neutralisé :**Tableau VIII** : Résultats du Test des puits à l'égard de *S.aureus* avec le surnageant neutralisé

	St1	St2	St3	St4	St5	St6	St17	St20	St21	St18	St07
S6	00	00	00	00	00	12	00	00	00	00	00
S11	00	00	00	00	00	16	00	00	00	00	00
S35	00	00	00	00	00	18	00	00	00	00	00
13Br	02	07	05	02	04	06	03	02	09	08	10
15Br	00	00	04	00	06	00	00	00	05	00	09
3Br	04	06	00	03	00	04	00	00	05	00	00
8Lb1	05	00	00	00	00	07	00	03	00	08	00
16Lb	06	03	02	00	08	00	10	09	00	00	00
<i>Lb.plantarum</i>	08	05	02	00	09	04	00	00	10	00	00

Tableau IX : Résultats du Test des puits à l'égard d'*E.coli* avec le surnageant neutralisé

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E9	E20
S6	ID								
S11	ID								
S35	ID								
13Br	00	00	00	00	00	10	09	07	00
15Br	05	09	07	03	00	08	10	00	00
3Br	00	00	00	00	00	00	00	00	00
8Lb1	00	00	00	00	00	00	00	00	00
16Lb	10	05	03	02	09	07	02	00	08
<i>Lb.plantarum</i>	07	10	04	08	06	02	04	05	00

IV. Résultats des microplaques :

Tableau X : Résultats de l'effet antagoniste des surnageant natif des bactéries lactiques vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

Souches	DO T=0	DO t=24h	Δ DO
S6	0,45	0,19	-0.26
S11	0,48	0,21	-0.27
S35	0,46	0,35	-0.11
13Br	0,44	0,15	-0.29
15Br	0,45	0,22	-0.23
3Br	0,5	0,25	-0.25
8Lb1	0,49	0,2	-0.29
16Lb	0,46	0,36	-0.1
<i>Lb.plantarum</i>	0,5	0,18	-0.32

Tableau XI : Résultats de l'effet antagoniste des surnageant neutralisé des bactéries lactiques vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

Souches	DO T=0	DO t=24h	Δ DO
S6	0,45	0,12	-0.33
S11	0,48	0	-0.48
S35	0,46	0,23	-0.23
13Br	0,44	0,3	-0.14
15Br	0,45	0,19	-0.26
3Br	0,5	0,18	-0.32
8Lb1	0,49	0	-0.49
16Lb	0,46	0,2	-0.26
<i>Lb.plantarum</i>	0,5	0,14	-0.36

Tableau XII : Résultats de l'effet antagoniste des surnageant natif des bactéries lactiques vis-à-vis *E.coli*

Souches	DO T=0	DO t=24h	Δ DO
S6	0,55	0,36	-0.19
S11	0,6	0,22	-0.38
S35	0,52	0,32	-0.2
13Br	0,54	0,25	-0.29
15Br	0,51	0,19	-0.32
3Br	0,53	0,26	-0.27
8Lb1	0,55	0,33	-0.22
16Lb	0,58	0,42	-0.16
<i>Lb.plantarum</i>	0,56	0,35	-0.21

Tableau XIII : Résultats de l'effet antagoniste des surnageant neutralisé des bactéries lactiques vis-à-vis *E.coli*

Souches	DO T=0	DO t=24h	Δ DO
S6	0,55	0,22	-0.33
S11	0,6	0,82	0.22
S35	0,52	0,21	-0.31
13Br	0,54	0,2	-0.34
15Br	0,51	0,76	0.28
3Br	0,53	0,51	-0.02
8Lb1	0,55	0,69	0.14
16Lb	0,58	0,3	-0.28
<i>Lb.plantarum</i>	0,56	0,18	-0.38

Résumé

Au cours de notre étude 09 souches de bactéries lactiques isolées de différents produits ont été testé pour leurs activités antibactériennes à l'égard des souches pathogènes entre *S.aureus* et *E.coli*.

Matériels et méthodes : La recherche de l'effet inhibiteur de ces bactéries a été mise en évidence par des méthodes directes telle que le test de spots et méthode indirecte par le test de puits. Le travail est poursuivi en utilisant lesurnageantneutralisé pour déterminer la nature de la substance inhibitrice.

Résultats et discussion : Les résultats ont montrés que la majorité des souches présentent un effet inhibiteur à l'égard de ces pathogènes avec des zone d'inhibition comprises entre (03-23 mm), et que cet effet est due à des substances protéiques.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un autre test, celui de l'antagonisme en microplaque, qui a montré l'effet inhibiteur desurnageant des souches pathogènes.

Mots clés : Bactéries lactiques, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, activité antibactérienne

Abstract

During our study, 09 strains of lactic acid bacteria, which are isolated from different products, has been tested for their antibacterial activity against pathogenic strains *S.aureus* and *E.coli*. The research for the inhibitory effect of theses bacteria has been demonstrates by direct methods as the agar spot test, and indirect method by the agar well diffusion assay .Then well tests were carried out with culture supernatants neutralized to determine the nature of the inhibitory substance. The results showed that the most of the strains has an inhibitory effect to these pathogens with zone of inhibition between (03-23mm) and that this effect is due to protein substance. The results obtained were the subject of another test,that of the antagonism in to microplate, which showed the inhibiting effect of the supernatantsof some strains of lactic bacteria against to the strain of *Saureus*.

Key words: Lactic bacteria, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, antibacterial activity