

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



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

MASTER

Thème

Etude de l'activité anti-*E. coli* de souches de bactéries lactiques isolées de différents produits laitiers

Présenté par M^{rs}:

MEBARKI Bilal et AOUGHLIS Amar

Soutenu le : 16 Juin 2016

Devant le jury composé de :

M^r BENDJEDDOU Kamel

MAA President

M^{lle} BENDALI Farida

MCA Encadreur

M^{me} LOUAILECHE –TETILI Fatiha

MAA Examinatrice

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Nous tenons à remercier tout d'abord le Dieu le tout puissant qui nous a procuré du courage et de la volonté pour mener à terminé ce travail.

Nous tenons vivement à remercier notre promotrice M^{elle} BENDALI Farida pour la qualité de son encadrement et de son soutien permanent.

Nos remerciements vont également à : M_{er} :Bendjeddou Kamel. d'avoir accepter de présider le jury et M^{me} Louilache Fatima d'avoir accepter d'examiné ce travail.

Nous remercions vivement les enseignants de département Microbiologie qui ont su nous former et nous initier à la recherche. A vous tous un grand merci.

Nos sincères remerciements et notre profonde reconnaissance sont adressés à tous ceux qui ont contribué, de près ou de de loin, à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce travail réalisé grâce à l'aide de dieu le tout puissant à

Mes parents qui m'ont toujours soutenu, encouragé et qui m'ont donné toutes les chances pour réussir. Merci pour tout !

« Que Dieu les protège »

Ma sœur Noura, pour son soutien sans faille.

Mon frère Tarek.

Ma famille dans son ensemble, parce que même si on ne la choisit pas, la mienne est exceptionnelle !

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, mes proche amis Oualid et Mustafa.

Aux membres de l'association « ERRACHED » et « ASSIREM ».

Mon camarade Amar et sa famille ;

Tous ceux qui me connaissent de loin ou de près et je que n'ai pas pu citer ;

Merci à tous pour tous les bons moments que nous avons partagé ensemble.

Dédicaces

Avant toute chose, je remercie ALLAH qui m'a donné la patience, le courage et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Je dédie ce travail à :

La mémoire de mon père que Dieu l'accueillera dans son vaste paradis.

Ma mère, en témoignage de son sacrifice et son encouragement dans les moments difficiles. « Que Dieu me la protège ».

Mes frères et mes sœurs et leur petite famille.

Toute la famille AOUGHILIS et BOUAAZA du petit au grand.

Aux membres de l'association « ASSIREM », «ITHREN N'TMURT» et « ERRACHED ».

Mon camarade Bilal et sa famille.

Tous ceux qui me connaissent de près ou de loin et que j'ai oublié de citer.

AMAR

Liste des Tableaux en annexe

N	Intitulé	Annexe
I	Principaux genres de bactéries lactiques	I
II	Classes et sous classes des bactériocines produites par les bactéries lactiques	I
III	Code des différentes souches lactiques utilisées dans cette étude	II
IV	Diamètres des zones d'inhibition (test des spots et puits)	II
V	Valeurs des pH des surnageants de culture des souches lactique	II

Liste des figures

N	Intitulé	page
1	Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre « <i>Lactobacillales</i> » dans la classe des « <i>Bacilli</i> »	4
2	Mise en évidence de l'activité anti - <i>E. coli</i> par la méthode des spots	13
3	Mise en évidence de l'activité anti - <i>E. coli</i> par la méthode des puits	14
4	Aspect des souches lactiques sur bouillon MRS et d' <i>E. coli</i> sur BN	16
5	Aspect des souches lactiques sur gélose MRS et d' <i>E. coli</i> sur GN	16
6	Activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard d' <i>E. coli</i> (test des spots)	17
7	Activité antibactérienne des différentes souches du genre <i>Lactobacillus</i> à l'égard d' <i>E. coli</i>	18
8	activité antibactérienne des différentes souches du genre <i>Enterococcus</i> à l'égard d' <i>E. coli</i> .	19
9	activité antibactérienne des différentes souches du genre <i>Lactococcus</i> à l'égard d' <i>E. coli</i> .	19
10	Activité antibactérienne du surnageant de culture natif des souches lactiques à l'égard d' <i>E.coli</i>	20
11	Activité antibactérienne de surnageant des différentes souches du genre <i>lactobacillus</i> à l'égard d' <i>E.coli</i>	21
12	Activité antibactérienne des surnageants de culture des souches du genre <i>Eeterococcus</i> à l'égard d' <i>E.coli</i> .	22
13	activité antibactérienne des surnageants de culture des souches du genre <i>Lactococcus</i> à l'égard d' <i>E.coli</i> .	22

Liste des abréviations

E: Escherichia

GN : gélose nutritive

GRAS : Generally Recognized As Safe

LMA : laboratoire de microbiologie appliquée

MRS : Man–Rogosa–Sharpe

NSLAB : No Starter Lactic Acid Bacteria

P.C.A : Plate Count Agar

rpm : rotation par minute

SUH : Syndrome Hémolytique et Urémique

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des tableaux en annexe
Liste des figures
Liste des abréviations

Sommaire

Introduction	1
Partie 1 : Synthèse bibliographique	
I. Les bactéries lactiques.....	2
I. 1. Caractéristiques générales.....	2
I. 2. Habitat.....	2
I. 3. Classification.....	3
II. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques.....	3
II. 1. Compétition nutritionnelle.....	4
II. 2. Synthèse de métabolites antimicrobiens.....	5
II. 2. 1. Acides organiques.....	5
II. 2. 2. Peroxyde d'hydrogène.....	5
II. 2. 3. Dioxyde de carbone.....	5
II. 2. 4. Diacétyle.....	6
II. 2. 5. Acétaldéhyde.....	6
II. 2. 6. Bactériocines.....	6
III. <i>Escherichia coli</i>	7
III. 1. Historique et caractéristiques.....	7
III. 2. Classification.....	7
III. 3. Différents pathovars d' <i>E. coli</i>	8
III.4. Epidémiologie	10

Partie 2 : Partie pratique

Matériel et méthodes	12
I. Souches bactériennes et conditions de culture.....	12
II. méthodes	
II.1 Revivification des souches	12
II.2. Isolement sur gélose et vérification de la pureté.....	12
II.3. Standardisation des <i>inocula</i>	12
III. Test d'activité anti- <i>E.coli</i>	13
III. 1. Test des spots	13
III. 2. Test des puits.....	14
III. 3. Neutralisation du surnageant de culture	15
III. 4 .concentration du surnageant de culture.....	15

Partie 3 : Résultats et discussion

I. Revivification des souches.....	16
II. Isolement sur gélose (vérification de la pureté)	16
III. Standardisation des <i>inocula</i>	17
IV. Test d'activité anti- <i>E.coli</i>	17
IV.1. Test des spots.....	17
IV.2. Test des puits.....	20
IV.3 Test de neutralisation.....	25
IV.4. concentration du surnageant de culture.....	25

Conclusion Générale	26
----------------------------------	----

Références bibliographiques	27
--	----

Annexes

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales et occupent des niches écologiques extrêmement variées. Leur capacité à fermenter les sucres et, à un moindre degré, de dégrader les protéines et les lipides, mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que des acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exopolysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (**Fernanda et al., 2010**).

En plus de l'effet protecteur de l'acide lactique, l'acide acétique, le diacétyl et du peroxyde d'oxygène, la découverte des bactériocines a donné un élan pour le développement d'aliments de meilleure qualité sanitaire (**Axelsson, 2004 ; Djadouni et Kihal, 2012**). Les bactériocines font l'objet d'une recherche intensive du fait de leur incorporation étendue comme bio-conservateurs modèles. Pour cela les scientifiques exploitent les interactions microbiennes des bactéries lactiques dans le contexte de réduire le risque dû à différentes bactéries pathogènes telle qu'*Escherichia coli*.

Escherichia coli est une bactérie Gram-négative aéro-anaérobie, commensale de l'intestin de l'Homme et des animaux (**Jean et al., 1992**). Cependant, certaines souches telles que celles appartenant au pathovar producteur de Shiga-toxines (STEC) ont été reconnues comme des agents pathogènes d'origine alimentaire responsables de maladies humaines, dont la plupart se manifestent en gastroentérites et les Shiga-toxines qu'elles produisent causent des manifestations graves (**Leonardo et al., 2012**).

Selon plusieurs auteurs, l'effet anti-*E. coli* des bactéries lactiques serait le résultat de l'effet combiné des substances antimicrobiennes produites par ces dernières tels que les acides organiques essentiellement l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl ou d'autres substances antimicrobiennes de nature protéique (Bactériocine) (**Lozo et al., 2007**).

Cette étude s'insère dans ce contexte et a comme objectif principal l'évaluation de l'activité anti-*E. coli* de souches de bactéries lactiques récemment isolées de différents produits laitiers.

Pour ce faire et afin de cerner le contexte de cette étude, une synthèse bibliographique relative au sujet est confectionnée donnant un aperçu sur les bactéries lactiques et leur antagonisme et les risques encourus à travers la consommation de produits contaminés par les souches pathogènes d'*E. coli*. Par la suite, la méthodologie adoptée dans cette étude sera détaillée suivie des résultats obtenus étayés par une discussion.

Synthèse bibliographique

I. Bactéries lactiques

I. 1. Caractéristiques générales

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes (**Labioui et al., 2005**), dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique suite à la fermentation des glucides. Elles sont non pathogènes et considérées, pour la majorité, parmi les microorganismes « GRAS » (Generally Recognized As Safe) par la « Food and Drug Administration » (**Trias et al., 2008**). Néanmoins, certaines espèces de *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des agents pathogènes opportunistes (**Aguirre et Collins, 1993**).

Ces bactéries sont à Gram-positives dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont immobiles, non sporulées, anaérobies facultatives ou microaérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C (**Salminen et al., 1999**). Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase, ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent pas d'indole, seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine. Ces bactéries montrent des exigences nutritionnelles complexes en acides aminés et en vitamines (**Leroi, 2010**) et exigent aussi des sucres fermentescibles, des acides gras et des sels pour leur croissance (**Shihata et Shah, 2000; Björkroth et Holzapfel, 2003 ; Hammes et Hertel, 2003**).

Les bactéries lactiques peuvent être divisées en deux groupes, homo-fermentaires et hétéro-fermentaires en se basant sur les produits de la fermentation du glucose (**Priyanka et Prakash, 2009**) :

- Homo-fermentaires : l'acide lactique est le produit majoritaire de la fermentation du glucose.
- Hétéro-fermentaires : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO₂ et autres acides organiques.

I. 2. Habitat

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 telle que la microflore intestinale ou génitale humaine et animale (**Klein et al., 1998**). Elles sont ubiquitaires, fréquemment retrouvées dans certains aliments tels que le lait et ses dérivés, la viande, les fruits et les légumes (**Trias et al., 2008 ; Leroi, 2010**).

I. 3. Classification

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique /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... La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (**Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho et al., 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 (tous les autres genres). 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 *Bacilli* et l'Ordre des *Lactobacillales* renfermant trente cinq genres répartis sur six familles (Fig.1). Les principaux genres utilisés dans le domaine alimentaire sont rassemblés dans le tableau I (annexe I).

II. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques, utilisées habituellement en tant que ferments ou non ferments (NSLAB) 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**).

II. 1. Compétition nutritionnelle

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**).

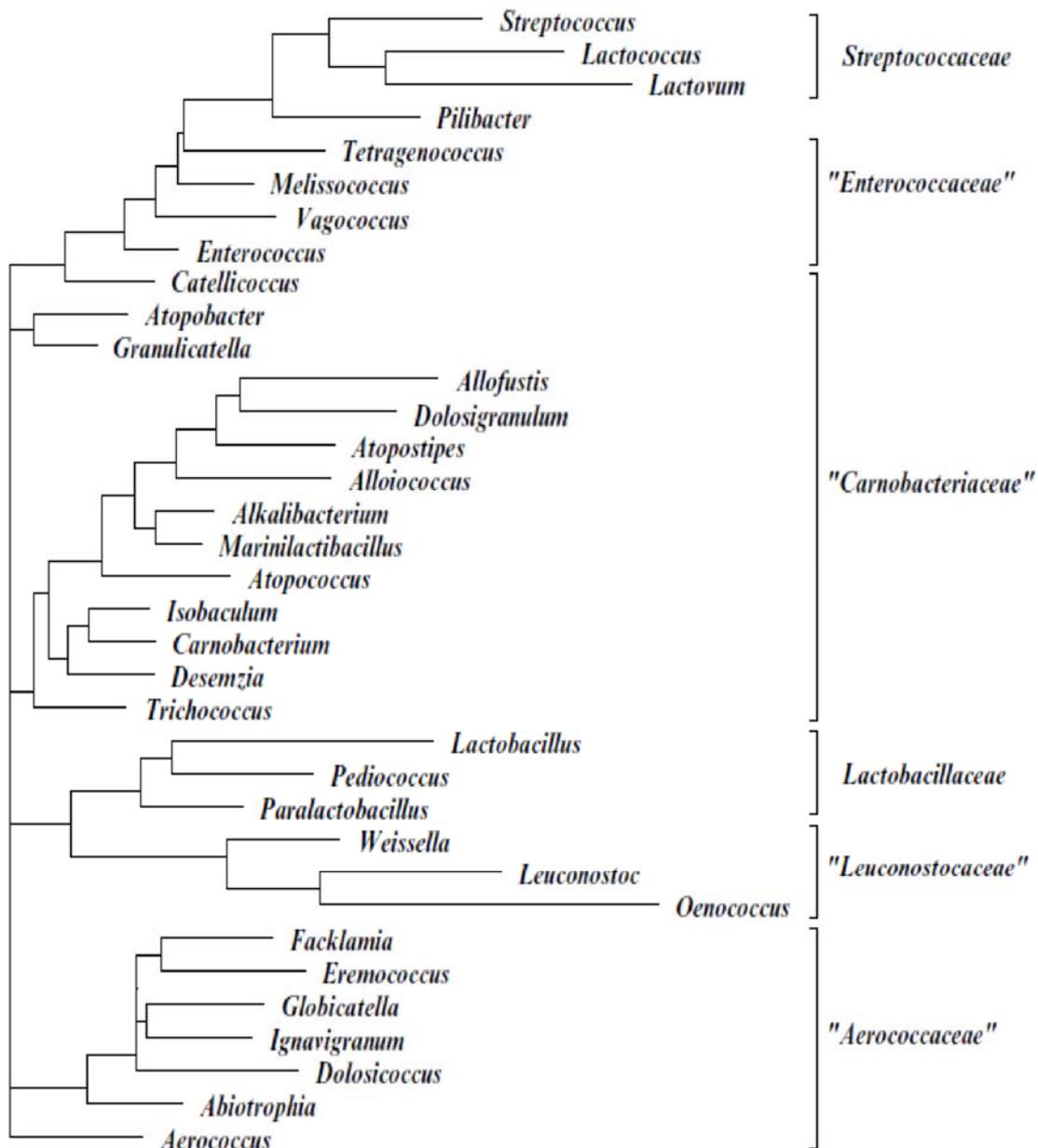


Fig . 1. Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre « *Lactobacillales* » dans la classe des « *Bacilli* » (**de Vos et al., 2009**).

II. 2. Synthèse de métabolites antimicrobiens

II. 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. 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.

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 par des interactions chelatantes avec des éléments essentiels (**Van de Guchte et al., 2002 ; Dalié et al., 2010 ; Reis et al., 2012**).

II. 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**).

II. 2. 3. Le dioxyde de carbone (CO₂)

Le CO₂ est principalement formé pendant la fermentation des hexoses suivant la voie hétéro-fermentaire. 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 tels 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).

II. 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).

II. 2. 5. Acétaldéhyde

Les bactéries lactiques hétéro-fermentaires produisent de l'acétaldéhyde actif par décarboxylation du pyruvate. Ce produit se combine alors avec du pyruvate, formant du α -acetolactate qui est converti par la α -acetolactate-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).

II. 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 (Laboui *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 II (annexe I).

III. *Escherichia coli*

III. 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*. Elle 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 enterica* Typhimurium, *E. coli* O157: H7...) (**Federighi, 2005**).

III. 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'*E. coli* 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-associated *E. coli* ») ou à des septicémies

ont été regroupées sous le terme de ExPEC (pour « Extra-intestinal pathogenic *E. coli* ») (**Russo et Johnson, 2000**).

III. 3. Différents pathovars d'*E. coli*

Les souches d'*E. coli* **entérotoxigènes (ETEC)** sont une cause majeure de diarrhée infantile dans les pays en voie de développement. Ils sont aussi responsables de la « diarrhée des voyageurs » ou « turista ». L'Homme est le principal réservoir des ETEC humains. Les ETEC adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle suite à l'action d'adhésines fimbriaires, facteurs de colonisation (CFA) (**Cassels et Wolf, 1995**). La diarrhée de type aqueuse est provoquée par une entérotoxine thermostable (ST) et/ou une entérotoxine thermolabile (LT) pénétrant à l'intérieur de la cellule après liaison à leurs récepteurs respectifs (**Levine, 1987**).

Les souches d'*E. coli* **entéroaggrégatives (EAEC)** ont été récemment reconnues comme responsables de diarrhées persistantes. Les EAEC colonisent l'épithélium de l'intestin grêle et du gros intestin en produisant une adhésion dite « auto-aggrégative » en « briques empilées » à l'aide d'adhésines fimbriaires appelées « aggregative adherence fimbriae » (AAF) et formant des biofilms épais provoquant des dommages à la muqueuse intestinale. Les EAEC sécrètent plusieurs toxines dont la « Shigella enterotoxin 1 » (ShET1) et la toxine EAST1 « EnteroAggregative heat-Stable Toxin 1 » homologue à l'entérotoxine thermostable des ETEC (**Kaper et al., 2004**).

Les souches d'*E. coli* **entéroinvasives (EIEC)** sont proches des shigelles du point de vue génétique, biochimique et pathogénique. Elles provoquent des diarrhées aqueuses évoluant rapidement en une dysenterie (selles contenant du sang et du mucus). Leur principal réservoir est l'Homme. Les EIEC pénètrent à l'intérieur des entérocytes et se multiplient, provoquant la mort cellulaire. Elles sont capables de se mouvoir dans le cytoplasme et de pénétrer ensuite dans la cellule adjacente par la polymérisation de l'actine cellulaire à un de leur pôle (**Brenner et al., 1972**).

Les souches d'*E. coli* **entéropathogènes (EPEC)** sont responsables de diarrhées infantiles sévères dans les pays en voie de développement, particulièrement chez les enfants de moins de 1 an. L'être humain constitue un réservoir important de ces bactéries. Les EPEC adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle et provoquent des lésions d'attachement/effacement (A/E), caractérisées par l'effacement des microvillosités intestinales et par une adhésion étroite des

bactéries sur la membrane cytoplasmique des entérocytes. Plusieurs gènes dont le gène *eae* (attaching and effacing *E. coli*) et le gène *bfp* porté sur le plasmide pEAF (« EPEC adhesion factor ») sont impliqués dans la virulence (**Bugarel et al., 2011**).

Les souches d'*E. coli* entérohémorragiques (EHEC) produisent des toxines Shiga (Stx) anciennement appelées vérotoxines (VT). Plusieurs espèces animales (bovin, ovin, chat, chien, lapin) sont considérées comme des réservoirs (**Verweyen et al., 2000**). Les EHEC causent des colites hémorragiques et le syndrome urémique-hémorragique chez l'Homme, le sérovar O157:

H7 étant le plus mis en cause et le premier identifié aux USA en 1982. L'ingestion d'aliments contaminés par EHEC entraîne après 3-4 jours d'incubation des symptômes, tels que la fièvre, la diarrhée aqueuse et hémorragique, des vomissements, des douleurs abdominales, et le tableau clinique peut s'aggraver avec l'apparition d'un syndrome hémolytique et urémique et des troubles neurologiques. Deux toxines sont principalement impliquées dans la pathogénie de la maladie (Stx1 et Stx2), elles entraînent une mort cellulaire en inhibant la synthèse intracellulaire des protéines (**Nataro et Kaper, 1998**).

Les souches d'*E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) ont été associées à des diarrhées pouvant être aqueuses et contenir du mucus, chez les jeunes enfants, en particulier entre 1 et 5 ans. Ce pathovar est également associé à des infections urinaires. Environ 75 % des souches

DAEC produisent une adhésine fimbriaire leur conférant un phénotype d'adhésion « diffuse ». Cette adhésine se lie à une protéine de surface des entérocytes de l'intestin grêle. Les DAEC induisent un effet cytopathique caractérisé par le développement de longues extensions entourant les cellules bactériennes (**Cookson et Nataro, 1996**).

Les souches d'*E. coli* pathogènes à tropisme extra-intestinal (ExPEC) ont souvent été décrites comme des souches opportunistes chez l'Homme et les animaux. Elles ont la capacité de se développer dans des milieux pauvres en fer et en présence des défenses immunitaires de l'hôte. Bien que pathogènes facultatives, les ExPEC sont associées à plusieurs types d'infections, notamment des infections urinaires, des septicémies (**Nakazato et al., 2009**) chez l'Homme et des méningites néonatales chez l'enfant (**Overall, 1970**).

Les souches d'*E. coli* pathogènes aviaires (APEC) sont responsables de nombreuses pathologies aviaires dont, les aérosacculites, les péricardites, les péritonites, les salpingites, les ostéomyélites, les omphalites, l'infection la plus importante étant celle des voies respiratoires. Les sérovars prédominants sont O1: K1; O2:K1 et O78: K80 (**Janben et al., 2001; Blanco et al., 1997**).

Plusieurs facteurs de virulence ont été décrits chez les APEC, on distingue principalement les adhésines, les systèmes d'acquisition du fer, les capsules K1 et K80, l'hémagglutinine thermosensible et les protéines de la membrane externe. Plusieurs gènes de ces facteurs de virulence sont portés par de grands plasmides qui sont communs chez les APEC (**Mellata et al., 2009; Johnson et al., 2009; Mellata et al., 2010**).

III. 4. Epidémiologie

Depuis les années 80, *Escherichia coli* O157 :H7 a été responsable de nombreuses épidémies de toxi-infections d'origine alimentaire dans le monde entier causant des milliers de malades et des dizaines de morts. L'incidence des cas d'infections humaines à EHEC varie considérablement d'un continent à un autre et d'une région à une autre. Dont les pays les plus touchés sont les Etats-Unis, Canada, Ecosse, Angleterre, Allemagne, Suède, Argentine et Japon. En 2004, 2771, 795 et 702 cas de toxi-infections à EHEC ont été respectivement enregistrés au Japon, en Allemagne et Angleterre et Pays de Galles (**Chahed et al., 2007**) Aux Etats-Unis, la fréquence estimée des infections liées aux EHEC non-O157 est aussi importante que celles dues au sérotype O157. Les EHEC non-O157 causent environ 37000 cas d'infections annuellement.

Les sérotypes O26, O111 et O103 sont prédominants. STEC O111 est considéré comme le deuxième agent responsable des cas de SUH après EHEC O157:H7 (**Brooks et al., 2005**). En France, l'agence nationale de sécurité sanitaire des aliments, de l'environnement et du travail (Anses) a recensé 22 cas de SUH après ingestion de viande hachée de bœuf contaminée par EHEC O157 :H7 entre 2011 et 2012 (**Bertin et Forano, 2013**).

En Afrique, très peu de données sont disponibles. La première épidémie de diarrhée hémorragique est survenue en Afrique du Sud en novembre 1992. STEC O157 non mobile a été retrouvé dans l'eau et dans la viande de bœuf (probablement à l'origine de la contamination) (**Chahed et al., 2007**).

En Algérie, une enquête épidémiologique réalisée par **Faradji (2009)** sur les diarrhées infantiles dues à *E. coli* (EPEC), a montré des taux de morbidité et de mortalité par diarrhée infantile importants et instables au cours des années (1999-2008) que ce soit au niveau régional ou national. Toutes les tranches d'âge ont été touchées par la diarrhée, pour toutes les années, avec un plus grand nombre d'hospitalisations pour les tranches d'âge allant de 0 à 11 mois.

L'utilisation abusive des antibiotiques dans la thérapie des pathologies et des intoxications alimentaires d'origine bactérienne telle que celles dues aux souches pathogènes d'*E. coli* a induit

une antibiorésistance accrue chez les souches bactériennes. Cette résistance apparaît comme une des préoccupations majeures en santé publique (**Beneddine et Djebrit, 2015**).

De ce fait, et dans le but de réduire les cas d'intoxications alimentaires et de prévenir d'éventuelles épidémies et le phénomène d'antibiorésistance, les scientifiques essaient d'exploiter les interactions microbiennes en particulier celle des bactéries lactiques et de leurs métabolites pour la prévention des toxi-infections alimentaires.

Matériel et méthodes

I. Souches bactériennes et conditions de culture

Les 105 souches lactiques utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de différents produits laitiers et font partie de la collection des souches lactiques du laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA), université de Bejaia. Les souches ont été identifiées par des tests phénotypiques et assignées aux genres correspondants (tableau IV, annexe II).

Une souche d'*E. coli* de référence (*E. coli* ATCC 25922) est utilisée comme souche cible pour les tests d'activité antibactérienne. Les souches lactiques sont cultivées dans du bouillon et de la gélose de de Man-Rogosa- Sharpe (MRS, pH 6,5, Institut Pasteur d'Algérie) et la souche d'*E. coli* dans du bouillon nutritif (BN, Institut Pasteur d'Algérie) et de la gélose nutritive (GN, Institut Pasteur d'Algérie). Les cultures sont réalisées à 30°C (souches lactiques) et à 37°C (souche d'*E. coli*).

II. Méthode

Afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des souches lactiques, un protocole expérimental a été élaboré comme suit :

II. 1. Revivification des souches

Les souches lactiques, conservées à – 20°C dans des tubes contenant du glycérol, sont revivifiées dans 3 ml de bouillon MRS incubés à 30°C/24 h. La souche d'*E. coli* est repiquée dans 3 ml de (BN) puis incubée à 37°C/24 h.

II. 2. Isolement sur gélose et vérification de la pureté

L'isolement des bactéries lactiques est réalisé sur gélose MRS (pH 6,5) et incubation à 30°C/72 h. L'isolement de la souche d'*E. coli* est réalisé sur GN et incubation à 37°C/24 h. Après culture, l'aspect macroscopique des colonies est observé pour vérifier la pureté des souches.

II. 3. Standardisation des *inocula*

A partir des cultures sur gélose, une colonie de chaque souche lactique et deux colonies d'*E. coli* sontensemencées dans 5 ml de bouillon MRS ou 9 ml de BN et incubées à 30°C ou à 37°C/ 18 h respectivement. La culture de 18 h d'*E. coli* est par la suite dénombrée sur GN après incubation à 37°C/24 h.

III. Test d'activité anti -*E. coli*

III. 1. Test des spots

L'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard d'*E. coli* est mise en évidence par un test d'antagonisme direct : test des spots (Fig. 2).

Les boîtes de Pétri sont remplies avec la gélose MRS (solidifiée et séchée), 5 μ l de la suspension bactérienne de chaque souche lactique (10^9 UFC/ml) sont déposés en spots. Les boîtes sont séchées près du bec bunsen pendant 30 min puis incubées à 30°C pendant 18 h (Fernández et al., 2007). Après la période d'incubation, les boîtes sont recouvertes de 9 ml d'une gélose nutritive molle (8 g d'agar/l) en surfusion,ensemencée avec 1 ml de la culture fraîche d'*E. coli* (10^7 UFC /ml) puis incubée à 37°C/24 h. Au terme de la période d'incubation, la présence ou l'absence de zones d'inhibition autour des spots est notée.

L'inhibition est notée positive lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 2 mm (Schillinger et Lucke, 1989).

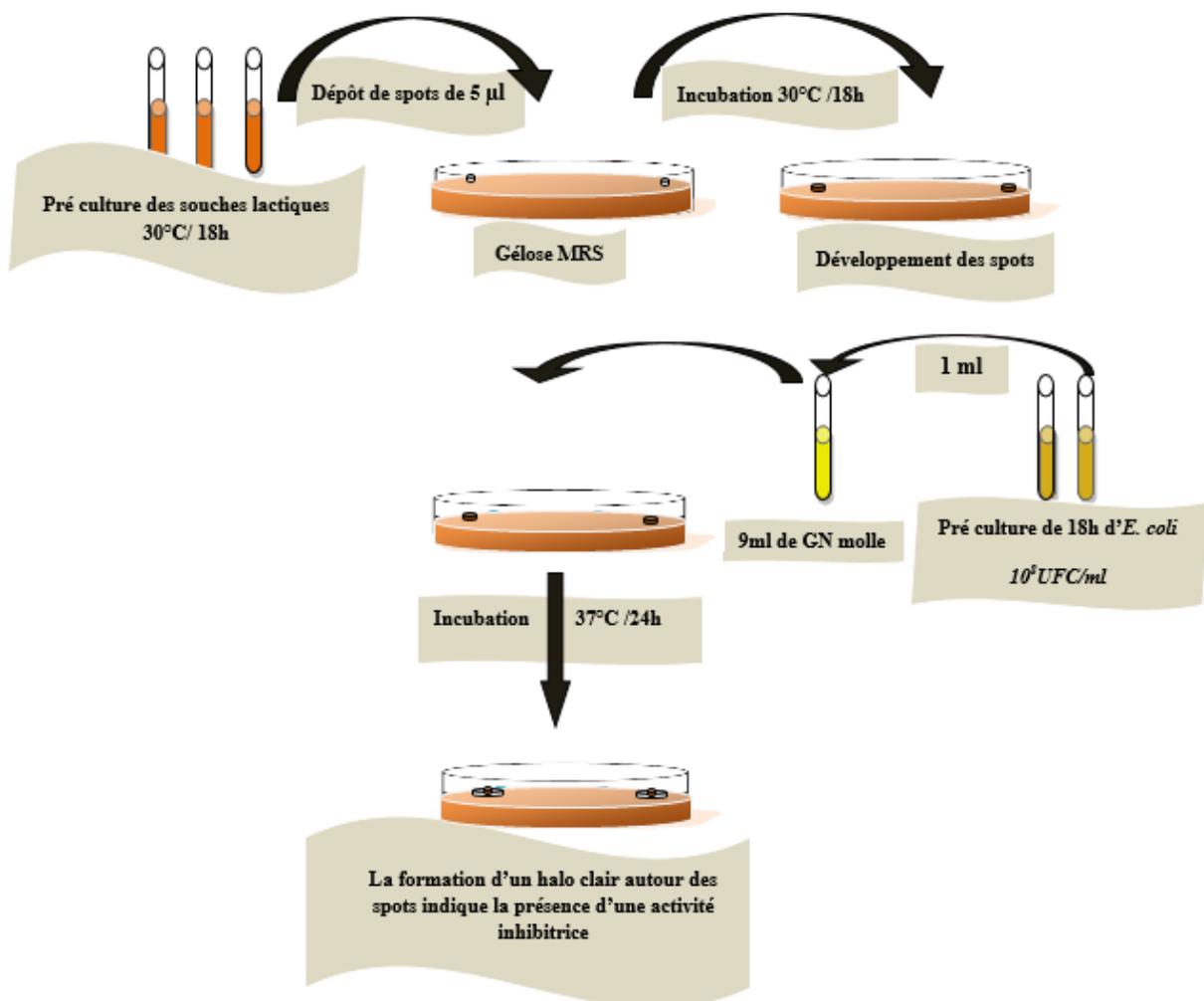


Fig. 2. Mise en évidence de l'activité anti -*E. coli* par la méthode des spots

III. 2. Test des puits

Afin de tester l'activité antibactérienne de surnageant de culture des souches lactiques à l'égard d'*E. coli*, des cultures de 18 h des souches lactiques sont préparées dans du bouillon MRS. Ces dernières sont par la suite centrifugées (centrifugeuse K3 series) deux fois à 8000 g pendant 20 min à 4°C. Après avoir mesuré le pH, l'activité du surnageant de culture à l'égard d'*E. coli* est testée avec la méthode décrite par **Barefoot et Klaenhammer (1983)**.

Un volume de 10 ml de gélose PCA (Plate Count Agar; Liofilchem, Allemagne) est versé dans des boîtes de Pétri stériles. Après solidification, 10 ml de GN molleensemencée avec 1 ml d'une culture d'*E. coli* (10^7 UFC/ml) sont coulés à la surface de la gélose PCA. Après solidification, des puits de 6 mm de diamètre sont creusés à l'aide d'un embout de micropipette (1000 µl) stérile.

Le fond de chaque puit est scellé avec une goutte de GN, par la suite les puits sont remplis avec 100 µl du surnageant de culture natif et laissés diffuser pendant 2 h à 4°C puis incubés à 37°C/24 h.

L'activité antibactérienne est révélée par la présence de zones d'inhibition autour des puits (Fig. 3).

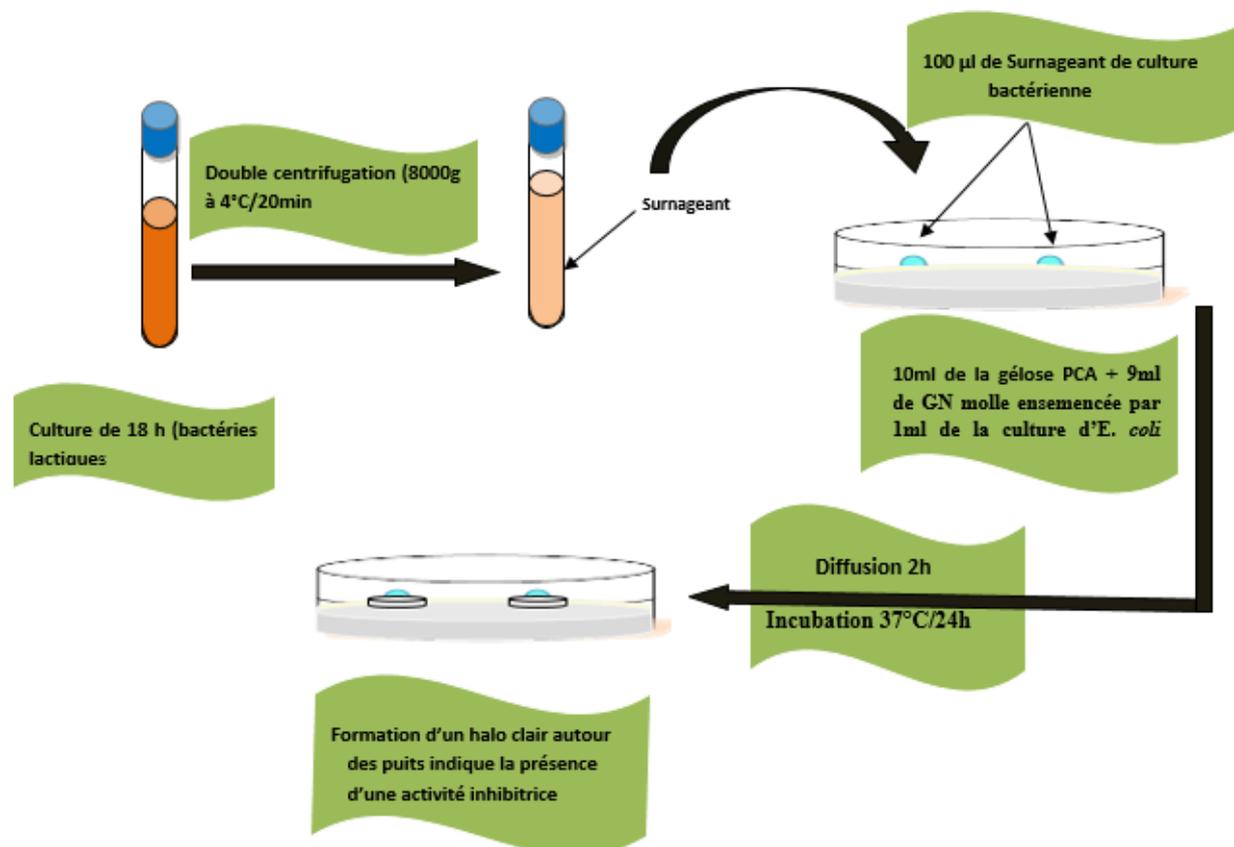


Fig. 3. Mise en évidence de l'activité anti -*E. coli* par la méthode des puits

III. 3. Neutralisation du surnageant de culture

Afin d'éliminer l'effet des acides organiques, le pH du surnageant natif est ajusté avec du NaOH (3 M) à une valeur de 6,5 et son activité anti-*E. coli* est réévaluée par la méthode des puits comme décrit en III.2.

III. 4. Concentration du surnageant de culture

Afin de vérifier tout effet de dilution des substances actives éventuellement produites par les souches lactiques, une concentration (10 x) au rotavapeur (Stuart, Angleterre) du surnageant de culture de ces souches est effectuée et son activité anti-*E. coli* est réévaluée par la méthode des puits.

Résultats et discussion

I. Revivification des souches

Après une incubation à 30°C/24 h, une croissance de toutes les souches lactiques dans le bouillon MRS et d'*E. coli* dans le BN a été remarqué. La croissance s'est traduite par un trouble sur toute la longueur du tube comme le montre la figure 4.



Fig. 4. Aspect des souches lactiques dans du bouillon MRS (A) et d'*E. coli* dans du BN (B)

II. Isolement sur gélose (vérification de la pureté)

L'ensemencement en stries sur gélose MRS (en quadrants) a permis d'isoler de petites colonies rondes blanchâtres après incubation à 30°C/72 h. De même, l'ensemencement en stries de la souche d'*E. coli* sur GN a permis d'isoler de petites colonies rondes blanchâtres après incubation à 37°C/24 h. L'aspect des cultures indique une pureté des souches (Fig. 5).

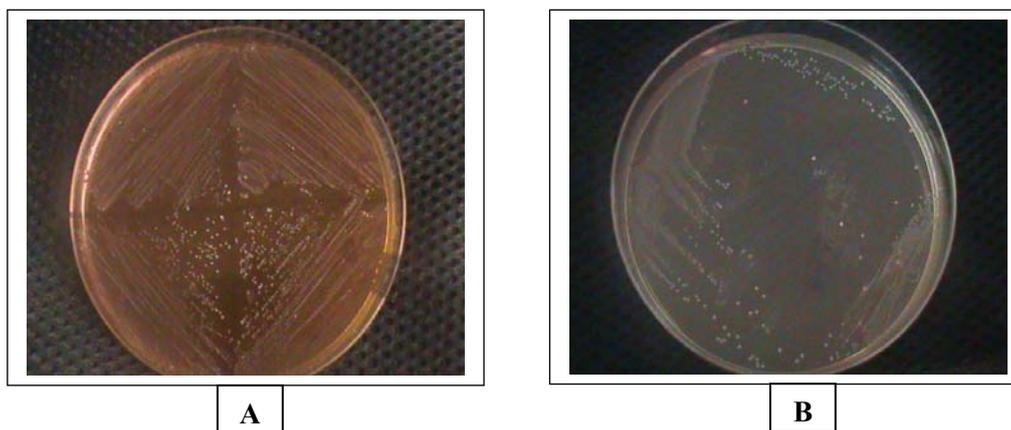


Fig. 5. Aspect des souches lactiques sur gélose MRS (A) et d'*E. coli* sur GN (B)

III. Standardisation des *inocula*

Vu le nombre élevé des souches lactiques à tester, un dénombrement n'a pas été inclus lors de la standardisation. Cependant, après incubation à 30°C/18 h dans le bouillon MRS, une croissance, traduite par un trouble homogène comparable, a été remarquée. Cette culture est considérée un standard pour tout les tests réalisés. En se basant sur des tests antérieurs réalisés sur les souches lactiques, ces cultures correspondent à des taux avoisinant 10⁹ UFC/ml.

Par contre, dans le cas d'*E. coli*, le dénombrement de la culture de 18 h, obtenue à 37°C en ensemençant deux colonies dans du BN, a permis l'obtention d'un taux de 10⁸ UFC/ml.

De ce fait les cultures de 18 h des souches lactiques (≈ 10⁹ UFC/ml) et d'*E. coli* (≈ 10⁸ UFC/ml) ont été utilisées telles quelles pour la réalisation des tests d'activité antibactérienne.

IV. Test d'activité anti-*E. coli*

IV.1. Test des spots

Les résultats du test des spots ont montré que la totalité des souches lactiques testées possède un effet inhibiteur contre *E. coli*. La figure 6 illustre des exemples de zones d'inhibition enregistrées avec les souches lactiques.



Fig. 6. Activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard d'*E. coli* (test des spots)

Le diamètre des zones d'inhibition varie entre 15 et 49 mm et cela en fonction du genre et de la souche (tableau III, annexe II).

Parmi les 73 souches qui appartiennent au genre *Lactobacillus*, on remarque que les souches B44 et B53 sont les plus actives avec une zone d'inhibition de 49 mm de diamètre. Les résultats sont présentés la figure 7.

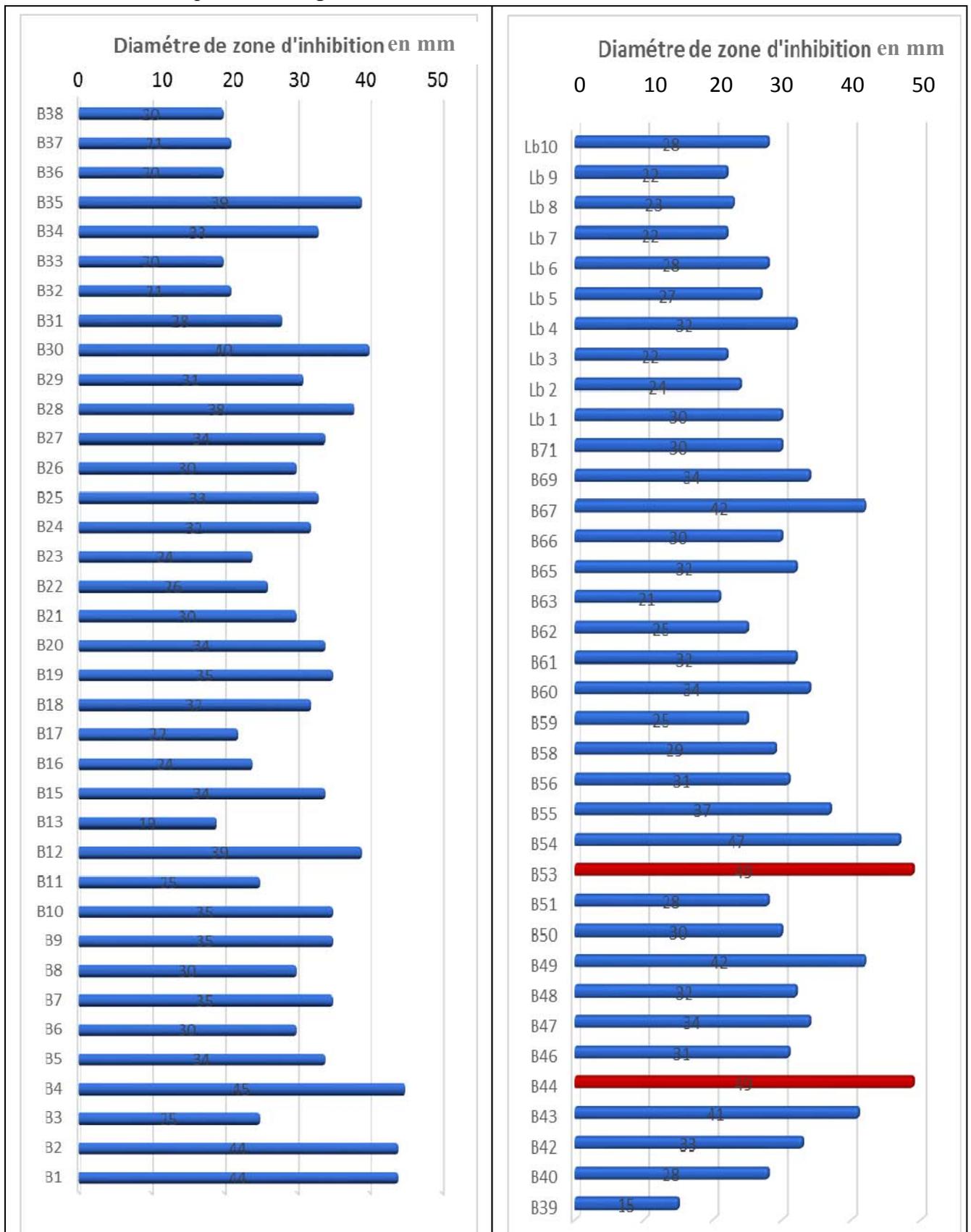


Fig. 7. Activité antibactérienne des différentes souches du genre *Lactobacillus* à l'égard d'*E. coli*.

Sur les 25 souches appartenant au genre *Enterococcus*, la souche En11 s'est montrée plus antagoniste vis-à-vis *E.coli* avec une zone d'inhibition de 37 mm comme indiqué sur la figure 8.

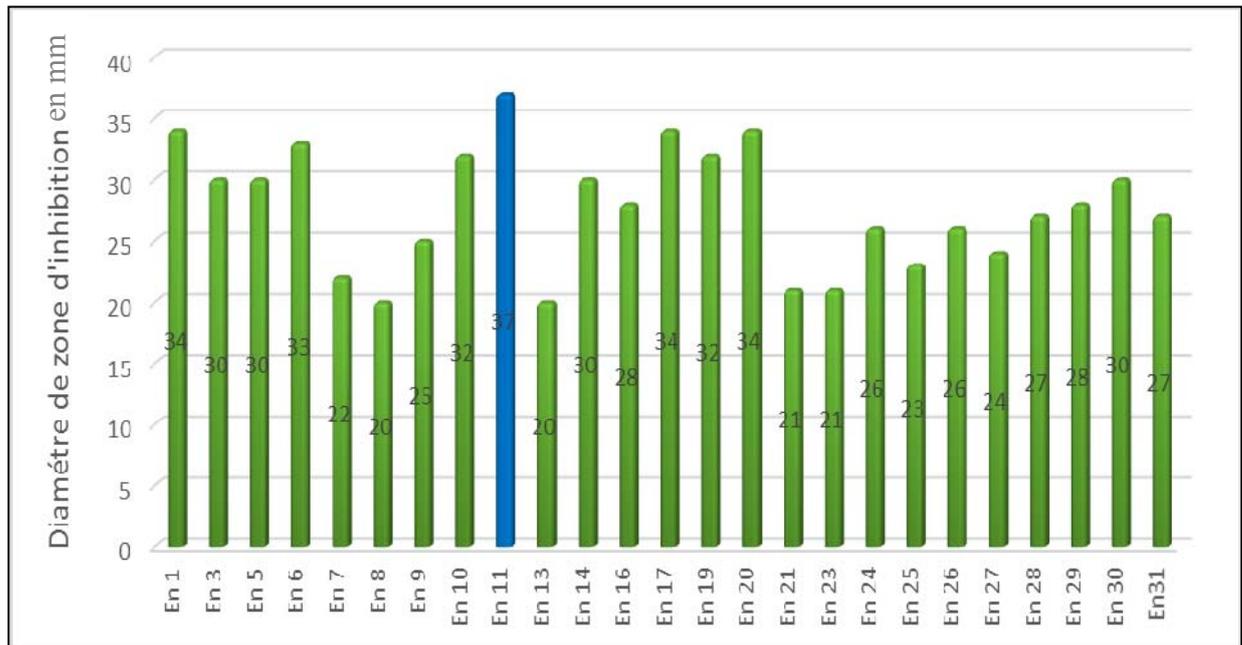


Fig. 8. Activité antibactérienne des différentes souches du genre *Enterococcus* à l'égard d'*E. coli*.

Pour le genre *Lactococcus*, la plus grande activité a été enregistrée avec la souche Lc1 qui a donné une zone d'inhibition de 29 mm, comme montré sur la figure 9.

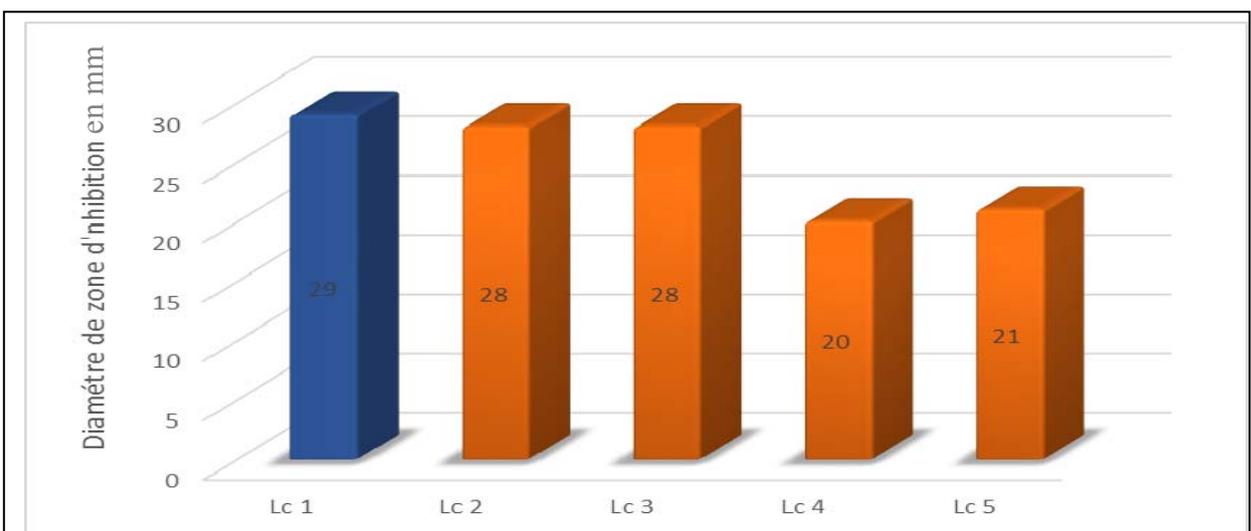


Fig. 9. Activité antibactérienne des différentes souches du genre *Lactococcus* à l'égard d'*E. coli*.

- La souche St1 a donné une zone d'inhibition de 25 mm, et la souche Ln1 a donné une zone d'inhibition de 32mm.

Selon plusieurs auteurs, cet effet antibactérien serait dû à l'effet combiné des 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'analyse des trois histogrammes et la comparaison entre les différents résultats obtenus avec le test des spots, ont montré que la souche d'*E.coli* est sensible à toutes les souches lactiques utilisées. Cependant les souches du genre *Lactobacillus* se sont avérées les plus antagonistes à l'égard de la souche cible, cela pouvant probablement être due à leurs pouvoir acidifiant élevé.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Labioui *et al.* (2005), qui ont trouvé une différence dans l'activité antimicrobienne vis-à-vis *E. coli* des souches appartenant aux différents genres (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Leuconostoc*). Cette différence d'activité a été reliée au pouvoir acidifiant de chaque souche.

IV. 2. Test des puits

L'activité des surnageants de cultures de 18 h des souches lactiques ($\approx 10^9$ UFC/ml) a été testée à l'égard d'*E. coli* (10^7 UFC/ml) par la méthode des puits. A pH natif, ce test a montré que la majorité des souches étudiées est douée d'activité antibactérienne vis-à-vis d'*E. coli*, avec des zones d'inhibition de diamètres variant entre 5 et 22 mm, tandis que 19 souches ne présentent aucune activité. Quelques exemples de résultats positifs sont présentés sur la figure 10 et l'ensemble des résultats sont illustrés sur les figures 11-13.

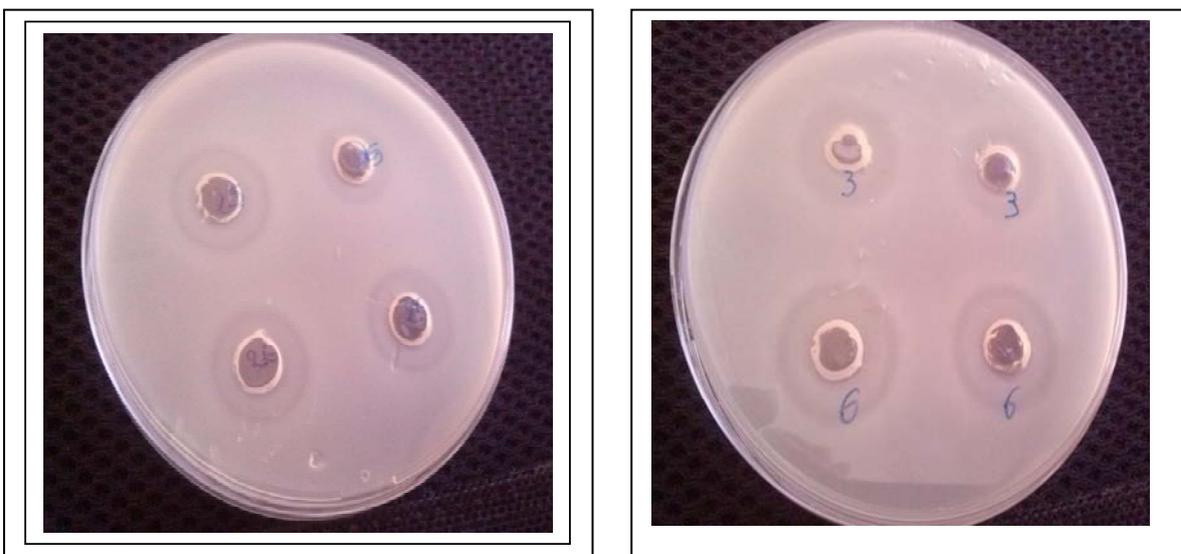


Fig. 10. Activité antibactérienne du surnageant de culture natif des souches lactiques à l'égard d'*E. coli*

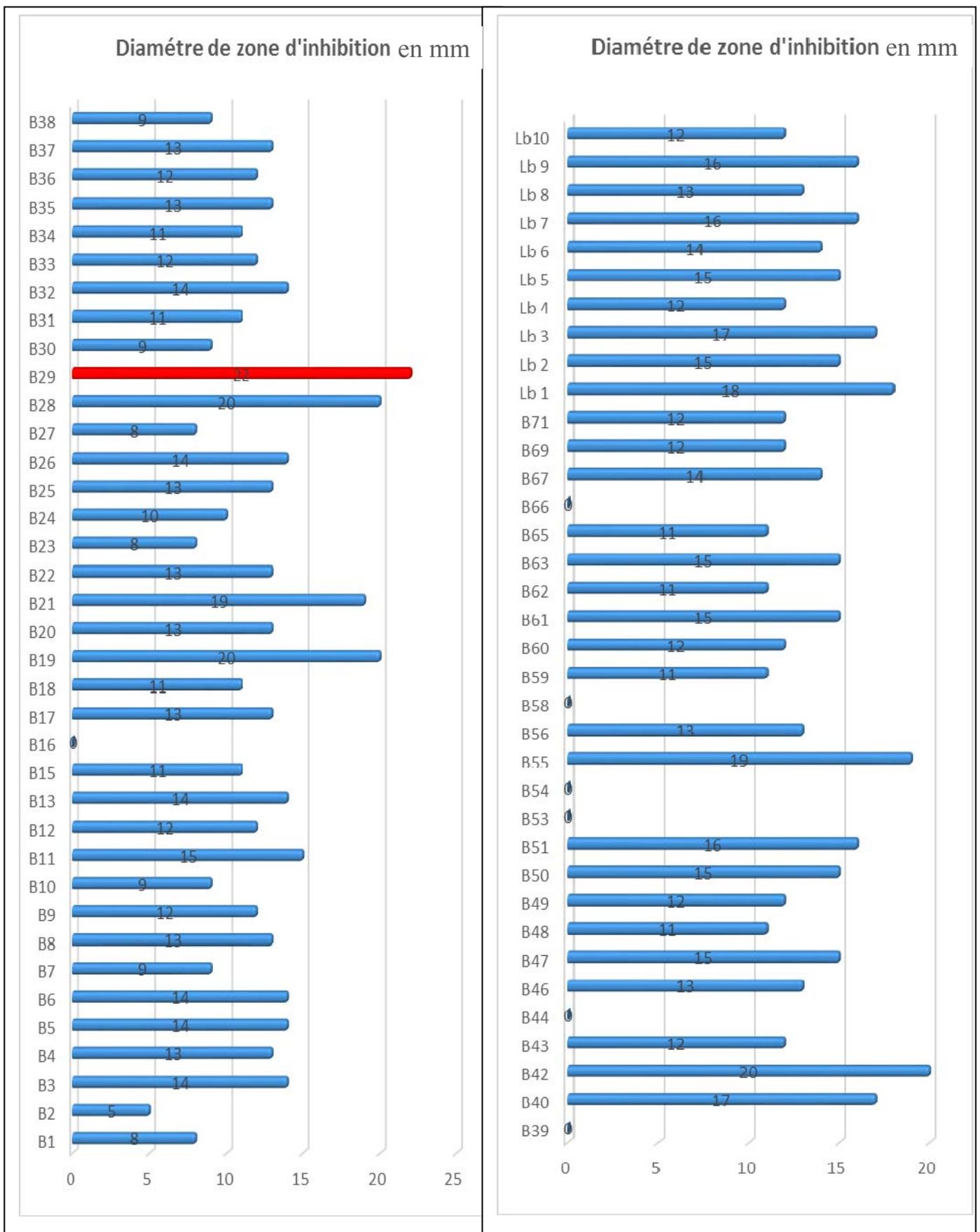


Fig. 11. Activité antibactérienne du surnageant des différentes souches du genre *Lactobacillus* à l'égard d'*E. coli*

La souche B29 du genre *Lactobacillus* a révélé la plus grande zone d'inhibition de 22 mm (Fig. 11). Par contre, chez *Enterococcus*, c'est la souche En10 qui montre la plus grande activité à l'égard d'*E. coli* avec un diamètre de zone d'inhibition de 15 mm (Fig. 12) et chez *Lactococcus*, c'est la souche Lc 3 qui montre la plus grande activité avec un diamètre de zones d'inhibition de 18 mm (Fig. 13).

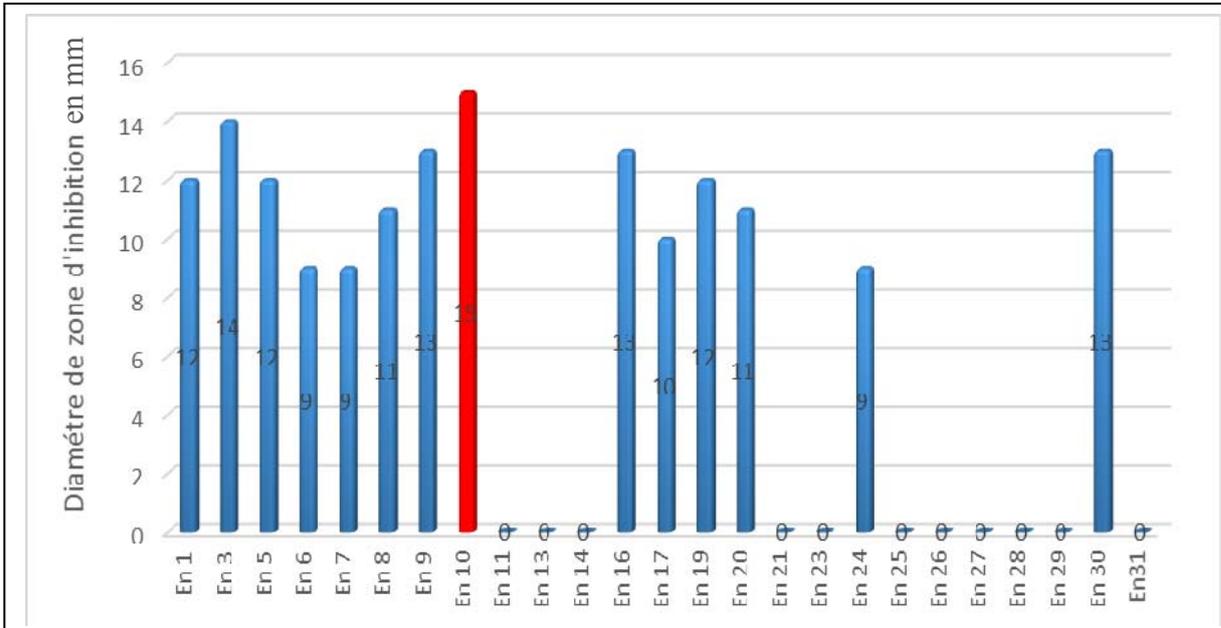


Fig. 12. Activité antibactérienne des surnageants de culture des souches du genre *Enterococcus* à l'égard d'*E. coli*.

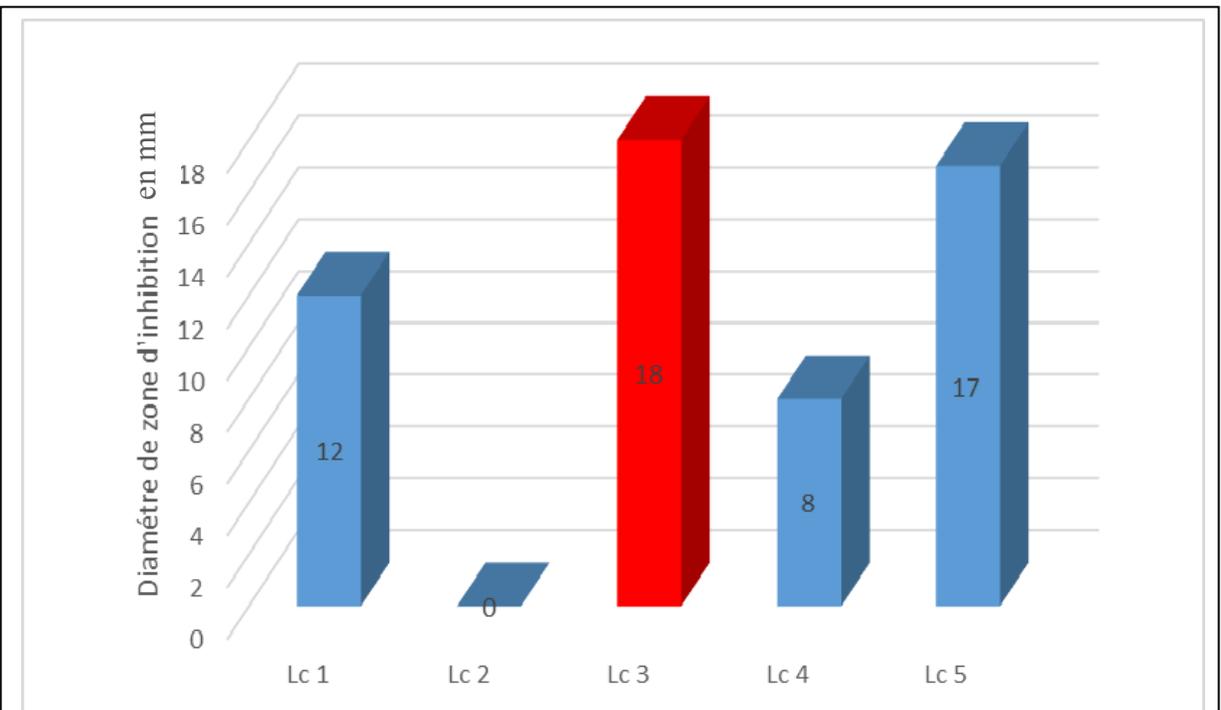


Fig. 13. Activité antibactérienne des surnageants de culture des souches du genre *Lactococcus* à l'égard d'*E. coli*.

- La souche St1 a donné une zone d'inhibition de 14 mm, et la souche Ln1 a donné une zone d'inhibition de 10 mm.

D'après ces résultats on remarque que :

Certaines souches possèdent des pH plus acides que d'autres, tandis que leurs zones d'inhibition sont moins importantes (tableau I).

Tableau I. Comparaison de certaines souches quant à leur activité antibactérienne

Souches	pH	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
B29 vs. B3	3,8 – 3,28	22-14
B11 vs. B37	4,0- 3,45	15- 13
Lc5 vs. Lc1	4,15-3,91	17-12
En10 vs. En1	4,66-4,03	15-12

Cela pourrait être dû probablement à la présence d'autres substances antibactériennes que les acides organiques tels que les bactériocines et le peroxyde d'hydrogène (**Labioui et al., 2005**).

La sakacine C2, une bactériocine produite par *Lb. sakei* C2, montre une activité antibactérienne à l'égard d'*E. coli* (**Gao et al., 2013**) ainsi qu'à la nisine, un peptide antibactérien produit par *Lactococcus lactis*. L'intérêt de cette dernière s'explique par son large spectre antimicrobien, incluant à la fois des bactéries Gram négatives que Gram positives et est reconnue active vis-à-vis d'*E. coli* O157: H7 (**Moosavy et al., 2013**).

L'effet antimicrobien du peroxyde d'hydrogène résulterait de l'oxydation des groupes sulfhydriques causant une dénaturation d'un certain nombre d'enzymes. Il limite ainsi la croissance des bactéries pathogènes (**Yüksekdağ et al., 2004**). Son action résulterait aussi de la peroxydation des lipides membranaires chez la bactérie cible, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane (**Konget Davison, 1981**).

Les souches ayant un pH plus faible ont engendré des zones d'inhibition de diamètres plus importants : Cas de la souche B2 qui possède un pH égal à 4,16 et a présenté une zone

d'inhibition de 5 mm, et la souche B1 (pH 4,01) qui a induit une zone d'inhibition de 8 mm, c'est le cas même pour quelques autres souches telles que B34, B33, B48 et B50.

Cela indique clairement que l'activité antibactérienne augmente avec la diminution des valeurs de pH.

Les souches B44, B66, En1 et B53 possèdent des pH presque égaux à (4,7-5,2) et ne présentent aucune activité anti- *E. coli* (absence des zones d'inhibition). Ceci indique que la souche d'*E. coli* résiste aux valeurs de pH supérieures ou égales à 4,7.

Quelques autres souches comme (B4 vs. B7 et B23 vs. B24) possèdent des pH égaux alors que les diamètres de leurs zones d'inhibition sont différents. Cela s'explique par le type d'acide organique (lactique ou acétique) produit par la souche lactique. Sachant qu'à un pH donné l'effet antibactérien de l'acide acétique est plus élevé que celui de l'acide lactique à cause de leur PKa.

Buchanan et Edelson (1999) affirment que l'acide lactique est efficace pour limiter la croissance *in vitro* des bactéries pathogènes comme *E. coli*. En effet, ont montré que l'inhibition de la croissance de cette dernière par *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (21,1 mm) est liée principalement à l'acide lactique (**Abedi et al., 2012**). L'acide acétique peut de même interagir avec les membranes cellulaires et causer une acidification intracellulaire et une dénaturation protéique (**Huang et al., 1986**). Son activité antimicrobienne est plus efficace que celle de l'acide lactique étant donné sa plus grande valeur de pKa (acide lactique 3,9 et acide acétique 4,75) et donc sa plus grande quantité sous forme non dissociée par rapport à l'acide lactique à un pH donné (**Earnshaw, 1992**). L'acide acétique agit de manière synergique avec l'acide lactique. Il a été montré qu'*E. coli* ne réagissait pas de la même manière en présence d'acide acétique ou d'acide lactique. Cela s'explique probablement par le fait que l'acide lactique acidifie le cytoplasme via l'accumulation de protons alors que l'acide acétique induit en plus une accumulation d'anions, augmentant ainsi le stress de la cellule cible (**King et al., 2010**).

IV.3. Test de neutralisation

Aucune activité anti-*E.coli* n'a été détectée, une fois le pH des surnageants de culture ont été neutralisés et ce même après concentration de 10 x. Ceci laisse penser que cette activité serait probablement due aux acides organiques, en particulier les acides lactique et acétique qui ont un effet inhibiteur sur les bactéries Gram-positives et Gram- négatives ou à des substances actives uniquement à pH acide (**de Vuyst et Vandamme, 1994**).

IV.4. concentration du surnageant de culture

Aucune activité anti-*E.coli* n'a été détectée, une fois les surnageants de culture ont été concentrés.

Conclusion

Conclusion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'activité antibactérienne de différentes souches de bactéries lactiques à l'égard d'*E. coli*. L'activité de ces dernières a été révélée par l'application de deux tests différents (test des spots et des puits). Les résultats obtenus avec ces deux tests ont révélé une importante activité anti-*E. coli* des souches testées avec des zones d'inhibitions bien distinctes dont le diamètre varie entre 15 et 49 mm et cela en fonction de la souche et du genre étudiés.

L'activité révélée par un test de spots (contact cellules/cellules) pourrait être attribué à plusieurs facteurs dont la compétition nutritionnelle et la synthèse de métabolites antibactériens. L'avantage du test des puits est de pouvoir mettre en évidence la nature de ces substances actives éventuellement produites dans le milieu de culture. Les résultats obtenus sont plus en faveur de l'effet pH mais n'excluent pas la possibilité de synthèse de substances actives uniquement à pH acide.

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

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

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.

Aguirre M. et Collins M. D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Microbiology*, 75: 95–107.

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.

Axelsson., (2004). Classification and physiology. In : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects ((Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. pp 1-66.

B

Bertin Y et Forano E. (2013). Sécurité microbiologique de la viande de bœuf. *Viandes et produits carnés*. 30 : 1-4.

Björkroth J. et Holzappel W. (2003). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In *The Prokaryotes* Edited by M. Dworkin. 3^{ème} édition New York, Springer-Verlag, pp.267-319, 1180p.

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.

Brenner D. J., Fanning G. R., Skerman F.J. et Stanley F. (1972). Polynucleotide sequence divergence among strains of *Escherichia coli* and closely related organisms. *Journal of Bacteriology*, 109(3) : 953-965.

Brooks J. T., Sowers E. G., Wells J. G., Green K. D., Griffin P. M., Hoekstra R. M., Stroockbin N. A. (2005). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *National Center for Infectious Diseases.*, 192 : 1422-1429.

Bugarel M., Annett M., Patrick F. et Lothar. (2011). Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *BioMed Central Microbiology*, 11 : 142.

C

Cassels F. J. et Wolf M. K. (1995). Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *Journal of Industrial Microbiology*, 15 (3): 214-226.

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.

Chahed A., China B., Daube G. (2007), Les *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines dans les toxi-infections d'origine alimentaire., 151: 215-246

Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F. et Chikindas M. L. (2001). Bacteriocins : safe ,natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology.*, 71: 1-20.

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. 193-255, 471p.

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.

Cookson S. T. et Nataro J. P. (1996). Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 21(6): 421-434.

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.

DeVos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whiteman W. B. (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg London, New York.

Diop M. B., Dibois D. R., Tine E., Jacqueline A. N., Thonart P. (2007). Bacteriocin producers from traditional food products. *Base* 11: 275-281

Djadouni F. et Kihal M. (2012). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria and the Spectrum of their Biopeptides against Spoiling Germs in Foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology* . 55. (3) : 435-443.

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.

F

Fernández M., Martínez B. M, Martín M. C., Valdivia E. et Maqueda M. (2007). Heterologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 102 :1350-1361

Fernanda M., Graciela M. Vignolo, et Raúl R. R. (2010). Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications Edition first published, Blackwell Publishing :381p

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

G

Gerson N., Tatiana. A.D. C., Eliana G. S., Marcelo B. et Wanderley. D. d. (2009). Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesquisa Veterinária Brasileira*.

Goa Y., Dapeng L., Xiaoyan L. (2013). Evaluation of the factors affecting the activity of sakacin C2 against *E. coli* in milk. *Food Control*. 30(2) :453–458.

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

H

Hammes W.P. et Hertel C. (2003). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Edited by M. Dworkin. New York. Springer-Verlag.

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

Janben T., Schwarz C., Preikschat P., Voss M., Philipp H C, et Wieler L H. (2001). Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *International Journal of Medical Microbiology*. 291:371-378

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 2éme édition*, pp152-159, 507p

Jiménez-Díaz R., Ruzi-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 plantaricin S_a

bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Environmental Microbiology.*, 61(12) : 4459-4463

Johnson, T. J., et L. K. Nolan. (2009). Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Review.* 73:750-774.

K

Kaper, James B., Nataro, James P. et Mobley H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Review Microbiology*, 2 (2) : 123-140.

Kaiser Gary .E. (1998). *Escherichia coli* entérobactériaceae : les bacilles fermentatifs, gram-négatifs, entériques microbiologie De Doc. Kaiser copyright septembre 23, 1998.

Klein G., Pack A., Bonaparte C. et Reuter G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology.* 41: 103-125.

L

Labioui H., Elmoualdi L., EL yachioui M. et Ouhssine M., 2005. Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de La Société de Pharmacie de Bordeaux.* 144 : 237-250.

Leonardo A, Gianluca P, Fernando S, Roberto D. M, Augusto B. (2012). A new hybrid bacteriocin, Ent35–MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Federation of European Biochemical Societies.*

2:12-19.

Leroi Françoise. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology.* 27 : 698- 709

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.

Lozo J., Jovcic B., Kojic M., Dalgalarondo M., Chobert J.M., Haertle T. et Topisirovic L.(2007). Molecular characterisation of a novel Bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* BGSJ2-8, a natural isolate from homemade cheese. *Current Microbiology.*, 55 :266-271.

M

Martin-Visscher L.A., Van Belkum M.J., Garneau- Tsodikova S., Whittall RM., Zheng J., McMullen LM. (2008). Isolation and characterization of Carnocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Applied Environmental Microbiology.* 74: 4756-4763.

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.

Mellata M., Keith A., Hua M. et R. C. (2010). Characterization of the Contribution to Virulence of Three Large Plasmids of Avian Pathogenic *Escherichia coli* X 7122 (O78 : K80:H9). *Infection and. Immunity* 78:1528-1541.

Moosavy M. H., Shavisi N. (2013). Determination of Antimicrobial Effects of Nisin and Mentha spicata Essential Oil against *Escherichia coli* O157 : H7 Under Various Conditions (pH, Temperature and NaCl Concentration). *Pharmaceutical Sciences*, 19(2) : 61-67



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

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.

O

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

Overall, J. C., Jr. 1970. Neonatal bacterial meningitis. Analysis of predisposing factors and outcome compared with matched control subjects. *Journal of Pediatr* 76:499-511.

P

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

Priyanka S. et Prakash A., (2009).Screening of Lactic Acid Bacteria for Antimicrobial Properties Against *Listeria monocytogenes* Isolated from Milk Products at Agra Region. *Internet Journal of Food Safety*, 11:81-87

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., Ouwehand A. C., Benno Y. et Lee Y. K.,(1999). Probiotics: How should they be defined Trends *Food Science Technology*.10: 107-110.

Salminen S. et Von Wright A. (2009). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. *Third Edition Taylor & Francis*.

Schillinger U., Lucke F K. (1989). antibacterial activity of *Lb. sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 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. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*. 70: 331-345

Stiles M. et Holzapfel W.H. (1997). Review article Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of food microbiology*. 36: 1-29

Shihata A. et Shah N.P. (2000). Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 10: 401-408

T

Trias R., Baneras L., Badosa E. et Montesinos E. (2008). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 123 : 50-60.

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.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., Devos P., Keresters K. et Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiology. Review*. 60 : 407

Verweyen H. M., H. Karch M. Brandis et L. B. Zimmerhackl. (2000). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections : following transmission routes. *Pediatr Nephrology* 14:73-83.

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*, 124

Annexe I

Tableau I : Principaux genres de bactéries lactiques (Dortu et Thonart, 2009)

Genre	Forme	Mobilité	Fermentation	Température optimale	Nombre d'espèces
<i>Lactobacillus</i>	Bacille	Immobilé	Homofermentaire ou Hétérofermentaire	Thermophile Ou Mésophile	GI : 23 GII : 16 GIII : 22
<i>Carnobacterium</i>	Bacille	Immobilé	Hétérofermentaire	Psychrotrophe	6
<i>Lactococcus</i>	Coque	Immobilé	Homofermentaire	Mésophile	5
<i>Streptococcus</i> <i>Thermophilus</i>	Coque	Immobilé	Homofermentaire	Thermophile ou Mésophile	01
<i>Enterococcus</i>	Coque	Immobilé	Homofermentaire	Mésophile	13
<i>Vagococcus</i>	Coque	Immobilé	Homofermentaire	Mésophile	2
<i>Pediococcus</i>	Coques en tétrades	Immobilé	Homofermentaire	Mésophile	2
<i>Tetragenococcus</i>	Coques en tétrades	Immobilé	Homofermentaire	Mésophile	7
<i>Leuconostoc</i>	Coque	Immobilé	Hétérofermentaire	Mésophile	9
<i>Oenococcus</i>	Coque	Immobilé	Hétérofermentaire	Mésophile	1
<i>Bifidobacterium</i>	Coque	Immobilé	Hétérofermentaire	Mésophile	1
<i>Weissella</i>	Bacille Coccobacille Coque ovoïde	Immobilé	Hétérofermentaire Strict	Psychrotrophe	6
<i>Aerococcus</i>	Coque	Immobilé	Hétérofermentaire	Mésophile	7

GI (groupe I), GII (groupe II), GIII (groupe III).

Tableau II : 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 peptide linéaires Sous type AI: bactériocines « Nisine –like » Sous type AII: bactériciones « SA-FF22-like »
	Type B : bactériocines à peptides globulaires
	Type C : bactériocine à deux peptides
Classe II : Petits 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	

Annexe II

Tableau III : Codes des différentes souches lactiques utilisées dans cette étude

Genre	<i>Lactobacillus</i>														
Code	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B15	B16
Code	B17	B18	B19	B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30	B31
Code	B32	B33	B34	B35	B36	B37	B38	B39	B40	B42	B43	B44	B46	B47	B48
Code	B49	B50	B51	B53	B54	B55	B56	B58	B59	B60	B61	B62	B63	B65	B66
Code	B67	B69	B71	LB1	LB2	LB3	LB4	LB5	LB6	LB7	LB8	LB9	LB10	/	
Genre	<i>Enterococcus</i>														
Code	En1	En3	En5	En6	En7	En8	En9	En10	En11	En13	En14	En16	En17	En19	En20
Code	En21	En23	En24	En25	En26	En27	En28	En29	En 30	En31	/				
Genre	<i>Lactococcus</i>														
Code	Lc1	Lc2	Lc3	Lc4	Lc5	/									
Genre	<i>Strptococcus thermophilus</i>														
Code	St1	/													
Genre	<i>Leuconostoc</i>														
Code	Ln1	/													

Annexe II

Tableau IV : Diamètres des zones d'inhibition (test des spots et puits).

Code de la souche	Diamètres en mm		Code de la souche	Diamètres en mm	
	Spots	Puits		Spots	Puits
B1	44	8	B22	26	13
B2	44	5	B23	24	8
B3	25	14	B24	32	10
B4	45	13	B25	33	13
B5	34	14	B26	30	14
B6	30	14	B27	34	8
B7	35	9	B28	38	20
B8	30	13	B29	31	22
B9	35	12	B30	40	9
B10	35	9	B31	28	11
B11	25	15	B32	21	14
B12	39	12	B33	20	12
B13	19	14	B34	33	11
B15	34	11	B35	39	13
B16	24	00	B36	20	12
B17	22	13	B37	21	13
B18	32	11	B38	20	9
B19	35	20	B39	15	00
B20	34	13	B40	28	17
B21	30	19	B42	33	20

Annexe II

Code de la souche	Diamètres en mm		Code de la souche	Diamètres en mm	
	Spots	Puits		Spots	Puits
B43	41	12	B69	34	12
B44	49	00	B71	30	12
B46	31	13	Lb1	30	18
B47	34	15	Lb2	24	15
B48	32	11	Lb3	22	17
B49	42	12	Lb4	32	12
B50	30	15	Lb5	27	15
B51	28	16	Lb6	28	14
B53	49	00	Lb7	22	16
B54	47	00	Lb8	23	13
B55	37	19	Lb9	22	16
B56	31	13	Lb10	28	12
B58	29	00	En 1	34	12
B59	25	11	En 3	30	14
B60	34	12	En 5	30	12
B61	32	15	En 6	33	9
B62	25	11	En 7	22	9
B63	21	15	En 8	20	11
B65	32	11	En 9	25	13
B66	30	00	En 10	32	15
B67	42	14	En 11	37	00

Annexe II

Code de la souche	Diamètres en mm		Code de la souche	Diamètres en mm	
	Spots	Puits		Spots	Puits
En 13	20	00	En28	27	00
En 14	30	00	En29	28	00
En 16	28	13	En30	30	13
En 17	34	10	En31	27	00
En 19	32	12	Lc 1	29	12
En20	34	11	Lc2	28	00
En21	21	00	Lc3	28	18
En23	21	00	Lc4	20	8
En24	26	9	Lc5	21	17
En25	23	00	St1	25	14
En26	26	00	Ln1	32	10
En27	24	00			

Annexe II**Tableau V** : Valeurs des pH des surnageants de culture des souches lactiques.

Code de la souche	pH de surnageant	Code de la souche	pH de surnageant
B1	4,01	B23	4,28
B2	4,16	B24	4,28
B3	3,28	B25	3,49
B4	4,09	B26	3,63
B5	4,3	B27	3,76
B6	3,87	B28	4,03
B7	4,09	B29	3,8
B8	3,90	B30	4,07
B9	4,15	B31	3,7
B10	4,26	B32	3,86
B11	4,0	B33	4,0
B12	3,42	B34	4,10
B13	3,51	B35	3,94
B15	3,67	B36	3,82
B16	4,97	B37	3,45
B17	3,62	B38	3,62
B18	3,56	B39	4,66
B19	3,78	B40	4,04
B20	3,87	B42	3,7
B21	3,94	B43	4,78
B22	3,85	B44	5,2
B46	3,61	En 6	4,56

Annexe II

B47	3,57	En 7	4,61
B48	4,2	En 8	4,33
B49	3,98	En 9	4,63
B50	4,01	En 10	4,66
B51	3,99	En 11	5,11
B53	5,0	En 13	4,78
B54	5,12	En 14	4,74
B55	3,66	En 16	4,6
B56	3,88	En 17	4,61
B58	4,76	En 19	4,23
B59	4,52	En 20	4,31
B60	3,98	En 21	4,85
B61	3,86	En 23	4,76
B62	4,52	En 24	4,55
B63	4,15	En 25	4,7
B65	3,95	En 26	4,75
B66	5,08	En 27	4,71
B67	4,35	En 28	4,81
B69	3,66	En 29	4,74
B71	4,01	En 30	4,51
En 1	403	En31	5,13
En 3	4,6	St1	4,51
En 5	4,66	Ln1	3,63

Annexe II

Code de la souche	pH de surnageant	Code de la souche	pH de surnageant
Lb 1	3,83	Lb 9	4,63
Lb 2	3,8	Lb10	3,94
Lb 3	3,73	Lc 1	3,91
Lb 4	3,9	Lc 2	4,83
Lb 5	3,53	Lc 3	3,55
Lb 6	3,78	Lc 4	4,19
Lb 7	4,03	Lc 5	4,15
Lb 8	4,26		

Composition des milieux de cultures (g/l)**P.C.A (Plate Count Agar) :**

Ingrédients	g /l
Hydrolysate tryptique de caséine	2,5
Extrait de viande	5
Glucose	1
Extrait de la levure	2,5
Agar	15
Eau distillée	1000 ml

pH = 7±0,2. Autoclavage : 121°C /20 min.

Bouillon MRS :

Ingrédients	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	8
Extrait de levure	4
Glucose	20
Acétate de sodium trihydraté	5
Citrate d'ammonium	2
Hydrogénophosphate de potassium	2
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,2
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0,05
Tween 80	1,0 ml
Eau distillée	1000 ml

pH = 6,2. Autoclavage : 121°C /20 min.

Pour avoir la gélose MRS : on ajoute 15g d'agar.

Bouillon nutritif :

Ingrédients	g/l
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Peptone	5
NaCl	5
Eau distillée	1000 ml

pH =7,4. Autoclavage 120°C, 20 min.

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

Pour avoir la GN molle : on ajoute 8g d'agar.

Résumé

Les bactéries lactiques sont très utilisées en industrie agroalimentaire grâce à leur rôle dans la fermentation et la conservation des aliments par production de plusieurs métabolites inhibiteurs tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines. L'objectif de ce travail était l'étude du pouvoir antagoniste de 105 souches lactiques, isolées de différents produits laitiers, vis-à-vis d'une souche de référence d'*E. coli*. Pour cela et dans un premier temps, un test de spots a été mis en œuvre. Ce test nous a permis de révéler l'action inhibitrice de toutes les souches lactiques testées à l'égard d'*E. coli*. Dans un deuxième temps et afin de mettre en évidence la nature des substances inhibitrices éventuellement produites par ces souches dans leur milieu de culture, un test des puits a été réalisé en testant les surnageants de culture à pH natif et neutralisé ainsi que les surnageants concentrés et neutralisés. Les résultats de ce test nous ont permis de déduire que l'effet anti-*E. coli* des souches lactique testées serait probablement dû à l'effet des acides organiques mais, l'hypothèse de l'implication d'autres substances inhibitrices actives uniquement à pH acide n'est pas à exclure et constitue une piste qui reste à explorer.

Mots clés : Bactéries lactiques, *Escherichia coli*, antagonisme, substances antibactériennes, acides organiques

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are largely used in the food industry thanks to their action in the fermentation and biopreservation of the food by production of many inhibitory metabolites as organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins. This work aimed to the study of the antagonistic power of 105 LAB strains, isolated from different dairy products, against a reference strain of *E. coli*. For this and in the first time, a spot-on-lawn test was undertaken. This test allowed us to note that all the tested LAB strains were inhibitory against *E. coli*. In the second time and in order to reveal the nature of the inhibitory substances eventually produced by the LAB strains in their culture medium, a well diffusion test was realized by testing the culture supernatants in their native and neutralized pH (with and without concentration). The results are in favor of organic acids action but they don't exclude the implication of other inhibitory substances, only active at acidic pH, an interesting hypothesis to be explored in the future.

Key words: Bactéries lactiques, *Escherichia coli*, antagonisme, substances antibactériennes, acides organiques