

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

**Optimisation de l'activité
antibactérienne de quelques souches de
bactéries lactiques**

Présenté par :
BEDJAOUI Taous et DJERROUD Fatma
Soutenu le : **24 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mme BOUKTIT Nadia	MAA	Président
Mme FARADJI-HAMMA Samia	MCA	Encadreur
Mme KERAMANE Badria	MAA	Examineur

Année universitaire : 2017 / 2018

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce travail à :

Mes chers parents qui m'ont toujours soutenu, encouragé et qui m'ont donné toutes les chances pour réussir (Que Dieu les protège).

Mes sœurs et leurs familles, à Asma et Naïma.

Mes frères et leurs familles, spécialement Fouad et Faris qui ont toujours m'encouragé et m'aidé.

Mes neveux et mes nièces, à Sabrina.

Ma proche amie et ma sœur Samia.

Tous mes ami(e)s : Fatma, Sarra et Dyhia. Mes camarades de la promotion de Microbiologie Appliquée.

Tous ceux qui me connaissent de près ou de loin.

Taous

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce travail à :

Mes chers parents Mourad et Fatíha aucune dédicace ne serait exprimer mon respect et mon amour. Puisse dieu, le très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

À la mémoire de ma grand-mère Djamála et à mon grand-père que dieu le protège.

Ma chère sœur Símla.

Mes chers frères Ayache et Takfarinas.

Une spéciale dédicace à Kamel qui compte énormément pour moi, un remerciement pour son soutien et son amour.

Mon oncle Mohand, sa femme et leurs enfants Yacine et Yanni.

Mes tantes, spécialement Bahía, Hakíma et Líla.

Mes cousin(e)s.

Mes proches amies et mon adorable binôme Taous.

Tous mes camarades de la promotion de Microbiologie Appliquée, spécialement Fatíma, Meriem, Hamída, Sarra et Dyhía.

Tous ceux qui me connaissent de près ou de loin.

Fatma

Remerciements

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

Nous tenons à remercier notre promotrice Mme : Faradj-Hamma pour ses conseils, son soutien et son encadrement afin de réaliser ce travail.

Nos remerciements vont également aux membres du jury : Mme : Bouktit d'avoir accepté de présider le jury et Mme : Keramane d'avoir accepté d'examiner ce travail.

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

La liste des tableaux

Le tableau	La page
Tableau I. Familles et principaux genres des bactéries lactiques.	02
Tableau II. Classification des bactériocines.	09
Liste des tableaux en Annexe	
Tableau I. Résultats de test de vérification de la pureté des souches lactiques.	Annexe I
Tableau II. Diamètres des zones d'inhibition (test des spots).	Annexe I
Tableau III. Diamètres des zones d'inhibition vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> (test des puits).	Annexe I
Tableau IV. Diamètres des zones d'inhibition vis-à-vis <i>Escherichia coli</i> (test des puits).	Annexe I
Tableau V. Diamètres des zones d'inhibition avec combinaison des souches sélectionnées (test des puits).	Annexe I
Tableau VI. Diamètres des zones d'inhibition avec les milieux optimisés.	Annexe I
Tableau X. pH non neutralisé et pH neutralisé des souches lactiques.	Annexe I
Tableau VII. Gélose et bouillon MRS (De Man, Rogosa et Sharpe).	Annexe II
Tableau VIII. Gélose et bouillon nutritif.	Annexe II
Tableau IX. Milieu Mueller Hinton (MH).	Annexe II

La liste des figures

La figure	La page
Figure 1. Formation de pores membranaires par le complexe Nisine-lipide II.	11
Figure 2. Standardisation des <i>inocula</i> .	14
Figure 3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des spots.	15
Figure 4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des puits.	16
Figure 5. Aspect du bouillon MRS après croissance des souches de bactéries lactiques.	18
Figure 6. Aspect des colonies des souches lactiques sur gélose MRS.	19
Figure 7. Aspect microscopiques des souches lactiques (coloration de Gram), A : forme bacille; B : forme cocci.	19
Figure 8. Résultats du test de spots des souches lactiques à l'égard des souches pathogènes cibles.	20
Figure 9. Résultats du test des spots à l'égard de <i>Staphylococcus aureus</i> .	21
Figure 10. Résultats du test des spots à l'égard d' <i>Escherichia coli</i> .	21
Figure 11. Activité antibactérienne du surnageant natif des souches lactiques à l'égard de <i>Staphylococcus aureus</i> .	23
Figure 12. Activité antibactérienne du surnageant non neutralisé des souches lactiques à l'égard d' <i>Escherichia coli</i> .	23
Figure 13. Activité antibactérienne du surnageant neutralisé des souches lactiques à l'égard de <i>Staphylococcus aureus</i> .	24
Figure 14. Activité antibactérienne du surnageant non neutralisé des souches combinées à l'égard de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i> .	25

Liste des figures

Figure 15. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de <i>Staphylococcus aureus</i> à différentes températures.	26
Figure 16. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard d' <i>Escherichia coli</i> à différentes températures.	27
Figure 17. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de <i>Staphylococcus aureus</i> à différents pH.	28
Figure 18. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard d' <i>Escherichia coli</i> à différents pH.	28
Figure 19. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de <i>Staphylococcus aureus</i> à différentes sources de carbone.	29
Figure 20. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard d' <i>Escherichia coli</i> à différentes sources de carbone.	30
Liste des figures en Annexe	
Figure 1. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de <i>Staphylococcus aureus</i> .	Annexe I
Figure 2. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard d' <i>Escherichia coli</i> .	Annexe I

SOMMAIRE

Dédicace	
Remerciements	
La liste des tableaux	
La liste des figures	
Introduction.....	1

LA PREMIÈRE PARTIE

Partie bibliographique

I. Les bactéries lactiques.....	3
I.1. Définition et caractéristiques.....	3
I.2. Habitat.....	3
I.3. Classification.....	3
I.4. Métabolisme des bactéries lactiques.....	4
I.5. Intérêt des bactéries lactiques.....	5
I.5.1. Biotechnologique.....	5
I.5.2. Alimentaire.....	5
I.5.3. Probiotique.....	6
II. Activité antibactérienne des bactéries lactiques.....	6
II.1. La compétition nutritionnelle.....	7
II.2. Les substances antibactériennes.....	7
II.2.1. Acides organiques.....	7
II.2.2. Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	7
II.2.3. Reutéline (β-hydroxypropionaldéhyde).....	8
II.2.4. Diacétyle (C ₄ H ₆ O ₂).....	8
II.2.5. Acétaldéhyde.....	9
II.2.6. Dioxyde de carbone (CO ₂).....	9
II.2.7. Bactériocines.....	9

LA DEUXIÈME PARTIE

Matériel et méthodes

I. Les souches utilisées.....	13
II. Les méthodes.....	13
II.1. Revivification des souches utilisées.....	13
II.2. Vérification de la pureté des souches utilisées.....	13

II.3. Standardisation des <i>inocula</i>	14
III. Test de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques	14
III.1. Test des spots.....	14
III.2. Test des puits.....	15
III.3. Test d'optimisation de l'activité antibactérienne	16
III.3.1. La synergie des activités des surnageants non neutralisés	17
III.3.2. L'activité antibactérienne à différentes températures (T°)	17
III.3.3. L'activité antibactérienne à différents pH.....	17
III.3.4. L'activité antibactérienne à différentes source de carbone	17

LA TROISIEME PARTIE

Résultats et discussion

I. Revivification des souches utilisées	18
III. Résultats de la standardisation des <i>inocula</i>	20
IV. Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	20
IV.1. Test des spots.....	20
IV.2. La méthode des puits	22
IV.2.1. Cas du surnageant non neutralisé	23
IV.2.2. Cas du surnageant neutralisé.....	24
V. Résultat de l'optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques	25
V.1. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques par synergie des activités des surnageants non neutralisés	25
V.2. L'activité antibactérienne à différentes conditions de production des substances antibactériennes	26
V.2.1. L'activité antibactérienne à différentes températures (T°)	26
V.2.2. L'activité antibactérienne à différents pH	27
V.2.3. L'activité antibactérienne à différentes sources de carbone.....	29
Conclusion	31

Annexe I

Annexe II

Résumé

Introduction

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires qui sont fréquemment retrouvés dans certains aliments tels que le lait et ses dérivés, la viande, les fruits et les légumes. Elles représentent aussi une partie de la microflore intestinale et génitale humaine et animale (Trias, 2008 ; Leroi, 2010). Ce sont des bacilles ou des coques à Gram positif, immobiles, non sporulées, aéro-anaérobies facultatifs ou anaérobies stricts et catalase négative (Salminen *et al.*, 2004 ; Settanni et Moschetti, 2010).

Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité à produire lors de leur croissance des composés actifs à savoir des acides organiques qui acidifient le milieu, des dérivés du métabolisme de l'oxygène (H₂O₂) et des substances naturelles de nature protéique douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération, leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes (Klaenhammer, 1988; Jack *et al.*, 1995; Matilla-Sandholm *et al.*, 1999).

Parmi ces substances synthétisées, des peptides dénommés bactériocines, sont produits puis excrétés à l'extérieur des cellules productrices. Ils présentent une activité bactéricide ou bactériostatique. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelquefois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices (Jack *et al.*, 1995; Chen et Hoover, 2003).

Les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs technologies pour répondre aux besoins de l'industrie alimentaire et pharmaceutique. De nos jours, il y a une forte tendance à réduire l'utilisation des substances chimiques et traitement thermique pour la conservation des aliments afin de préserver leurs propriétés organoleptiques (Rodgers, 2001 ; Vermeiren *et al.*, 2004).

En effet, les bactéries lactiques peuvent réduire et inhiber la croissance des bactéries pathogènes (Trias *et al.*, 2008), ainsi empêcher l'altération du lait et des produits laitiers.

Dans ce contexte s'inscrit notre étude qui a pour but en premier lieu d'étudier l'activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques vis-à-vis *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. En second lieu essai d'optimisation de production des substances antibactériennes de quelques souches de ces dernières à l'égard des deux bactéries pathogènes.

De ce fait, une partie bibliographique relative au sujet et comportant un aperçu sur les bactéries lactiques et leur pouvoir antibactérien est réalisée.

I. Les bactéries lactiques

I.1. Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques sont des organotrophes (Badis *et al.*, 2005). Elles produisent l'acide lactique comme produit final principal pendant la fermentation des carbohydrates (Kandler, 1983). Elles ont été isolées pour la première fois à partir du lait (Carr *et al.*, 2002). Elles sont habituellement connues comme des micro-organismes GRAS (Generally Reconized As Safe) (Cintas *et al.*, 2001).

Les bactéries lactiques sont de Gram positif, généralement immobiles, non sporulées et ont des exigences nutritionnelles complexes : les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Badis *et al.*, 2005). Elles peuvent avoir différentes formes : sphériques (coques : *Streptococcus*, *Lactococcus*), bâtonnets (bacilles : *Lactobacillus*) ou encore ovoïdes (coccobacilles : *Leuconostoc* sp) (Gálvez *et al.*, 2011). En général ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase. Elles sont également incapables de fermenter le glycérol (Salminen *et al.*, 2004).

Elles sont capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4,0 à 9,6 (Salminen *et al.*, 2004).

Les bactéries lactiques sont, selon la voie qu'elles empruntent pour fermenter les hexoses, homofermentaires ou hétérofermentaires (Scheleifer et Ludwig, 1995).

I.2. Habitat

Les bactéries lactiques colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les fruits, les légumes et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (Stiles *et al.*, 1997; Klaenhammer *et al.*, 2005; Trias, 2008 ; Leroi, 2010).

I.3. Classification

La première classification des bactéries lactiques basées sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen; cité par Belarbi (2011).

La taxonomie moderne basée sur les caractéristiques phénotypiques et génotypiques a eu comme conséquence la reclassification de beaucoup d'espèces de bactéries lactiques. Elles sont

un groupe phylogénétique divers avec un GC de 50% (guanine et cytosine) en leur ADN (Novel, 1993). La classification des bactéries lactiques est réalisée en fonction de leur morphologie, de leur type de fermentation et de leur température optimale de croissance (Cintas *et al.*, 2001).

Selon l'édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology* en (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 (Tableau I). Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. Parmi tous ces genres cités, seulement cinq (*Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*) répondent aux caractéristiques générales d'une bactérie lactique typique (Salminen *et al.*, 2004).

Tableau I. Familles et principaux genres des bactéries lactiques (Brenner *et al.*, 2005).

Familles	Principaux genres
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Pediococcus sp.</i>
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc sp.</i> , <i>Oenococcus sp.</i> , <i>Weissella sp.</i>
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus sp.</i> , <i>Lactococcus sp.</i>
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium sp.</i>
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus sp.</i> , <i>Tetragenococcus sp.</i> , <i>Vagococcus sp.</i>
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus sp.</i>

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* sont parfois considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de leurs propriétés physiologiques et biochimiques et à leur présence dans le même habitat écologique. Cependant, ces microorganismes appartiennent au phylum *Actinobacteria* et sont donc phylogénétiquement éloignées des bactéries lactiques (Trias, 2008). Les bactéries lactiques forment donc un groupe hétérogène en raison non seulement de leur métabolisme mais aussi de leur aspect, leur habitat.

I.4. Métabolisme des bactéries lactiques

Il existe deux principales voies de fermentation des hexoses qui sont utilisés pour classer les bactéries lactiques. Les bactéries lactiques homofermentaires et les bactéries lactiques hétérofermentaires :

Homofermentaires : Les espèces homofermentaires, telles que *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et quelques *Lactobacillus*, produisent majoritairement de l'acide lactique par fermentation des sucres (glycolyse) (Caplice et Fitzgerald, 1999).

Hétérofermentaires : Ce groupe de bactéries lactiques utilise la voie des pentoses phosphate (Salminen *et al.*, 2004). Quant aux espèces hétérofermentaires, telles que *Leuconostoc* et *Weissella*, elles produisent, outre l'acide lactique, plusieurs métabolites tels que d'autres acides organiques (acétate), de l'éthanol, de l'acétoïne, du dioxyde de carbone et des composés aromatiques (tels que le diacétyle, l'acétaldéhyde) (Caplice et Fitzgerald, 1999).

I.5. Intérêt des bactéries lactiques

I.5.1. Biotechnologique

Plusieurs applications des bactéries lactiques sont mises en évidence parmi lesquelles : l'affinage des fromages et la fabrication du yaourt en l'acidification, l'aromatisation et l'amélioration de la texture (Saxer *et al.*, 2013). Les cultures starters peuvent influencer chacune de ces propriétés par la production d'exopolysaccharides (Gentès *et al.*, 2011).

Les bactéries lactiques peuvent être ajoutées en combinaison à d'autres starters qui confèrent les propriétés organoleptiques désirables (Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007).

I.5.2. Alimentaire

Les bactéries lactiques constituent un groupe bactérien largement utilisé dans l'industrie alimentaire dont les principaux genres utilisés sont *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* (Carr *et al.*, 2002).

Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (Abee, 1995 ; Hugenholtz et Kleerbezem, 1999).

Elles fermentent les glucides en acide lactique, d'où une diminution du pH favorable à la conservation des aliments (Labioui *et al.*, 2005).

Si la bactérie lactique productrice de la bactériocine est appliquée en tant que culture protectrice, elle doit être capable de produire sa bactériocine sans modifier les propriétés organoleptiques (Rodgers, 2001).

I.5.3. Probiotique

La consommation des produits issus d'une fermentation lactique est de plus en plus accrue grâce aux propriétés probiotiques qui caractérisent les bactéries lactiques et leur effet positif sur la santé et la microflore intestinale (Gorbach, 1996).

En général, les bactéries lactiques les plus couramment citées dans les études sur les probiotiques font parties des genres *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* et *Streptococcus* (Holzapfel *et al.*, 2001). Les espèces couramment utilisées sont *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri* et *Lactobacillus delbruecki subsp bulgaricus* (Salminen *et al.*, 2004).

Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement des affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires. D'autres effets, comme la prévention des gastro-entérites nosocomiales chez le nourrisson, des propriétés anticancérigènes, anticholestérolémiantes, lutte contre *Clostridium difficile* et *Helicobacter pylori* et prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin; cité par Belarbi (2011).

Ces bactéries doivent répondre à un certain nombre de propriétés (activité antagoniste, tolérance à l'acidité, tolérance aux acides biliaries, capacité d'adhésion ...) (Midassirou *et al.*, 2012).

II. Activité antibactérienne des bactéries lactiques

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

- La compétition nutritionnelle et pour l'espace ;
- La 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 (le 2,3-butanedione), la reutérine et les bactériocines (Ammor *et al.*, 2006).

II.1. La 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 compétition nutritionnelle et pour l'espace 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).

II.2. Les substances antibactériennes

II.2.1. Acides organiques

L'acide lactique est le métabolite principal des bactéries lactiques causant la réduction du pH qui inhibe beaucoup de microorganismes (Schnürer et Magnusson, 2005).

La forme non dissociée et plus hydrophobe de l'acide se répand au-dessus de la membrane des cellules et se dissocie à l'intérieur de la cellule, libérant les ions H⁺ qui acidifient le cytoplasme (Piard et Desmazeaud, 1991). L'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération du proton, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (Klaenhammer, 1993 ; Janssen *et al.*, 2007). En plus de l'effet du pH, l'acide non dissocié fait chuter le gradient électronique de proton, entraînant la bactériolyse et finalement la mort des bactéries sensibles (Eklund, 1989).

L'acide lactique à 5 000 µg/ml (0,5 %) inhibe la croissance de *Listeria monocytogenes* (Oh et Marshall, 1993). L'acide acétique a, quant à lui, un effet bactériostatique dès 0,2 % et un effet bactéricide à 0,3 % contre des bactéries à Gram positif lors d'une addition dans un aliment (Reis *et al.*, 2012). Néanmoins, cette activité dépend du pH et est plus prononcée à un pH faible en-dessous de 4,5 (Reis *et al.*, 2012).

II.2.2. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène est, depuis longtemps, reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celle des lactobacilles (Price et Lee, 1970). Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Zalan *et al.*, 2005).

L'effet antimicrobien de H₂O₂ peut résulter de l'oxydation de groupes sulfhydryle provoquant la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes, et de la peroxydation des lipides membranaires qui augmentent la perméabilité de la membrane. Le H₂O₂ peut être aussi un précurseur pour la production des radicaux libres bactéricides tels que les superoxydes (O₂^{*}) et les radicaux hydroxyles (OH⁻) qui peuvent endommager l'ADN (Ammor *et al.*, 2006).

Romanova *et al.*, 2002, ont mesuré les concentrations minimales inhibitrices de H₂O₂ sur 19 souches de *Listeria monocytogenes*. Les cultures des plus sensibles sont inhibées dès 9,4 µg.m/ml de H₂O₂ dans le milieu de culture alors que d'autres sont capables de résister jusqu'à des valeurs de 75 µg/ml. La culture en condition d'anaérobiose minimiserait voire inhiberait la production de peroxydes (Martinis *et al.*, 2001 ; Çon *et al.*, 2001).

II.2.3. Reutéline (β-hydroxypropionaldéhyde)

La reutéline est produite par *Lactobacillus reuteri*, une espèce hétérofermentaire dont la niche écologique est l'appareil gastro-intestinal des humains et des animaux. Elle montre un large spectre d'activité antimicrobienne contre certaines bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Axelsson *et al.*, 1989). Cette activité pourrait être due à une inhibition de l'activité de la ribonucléotide réductase, entraînant une inhibition de la synthèse de l'ADN des cellules cibles (Dobrogosz *et al.*, 1989).

Les microorganismes sensibles à la reutéline comprennent *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* et *Trypanosoma* (Axelsson *et al.*, 1989).

II.2.4. Diacétyle (C₄H₆O₂)

Le diacétyle est un composant d'arôme, produit par des souches lactiques qui fermentent le citrate. Ce composant inhibe la croissance des bactéries Gram négatives en réagissant avec l'utilisation d'arginine. Jay (1982) a montré que les bactéries Gram négatives étaient plus sensibles au diacétyle que les bactéries Gram positives (Ammor *et al.*, 2006).

Cette molécule est caractérisée par une large activité antimicrobienne à des concentrations allant de 200 à 1 000 µg/ml (Lanciotti *et al.*, 2003), et à 344 µg/ml inhibe les souches de *Listeria*, *Salmonella*, *Yarsinia*, *Escherichia coli* et *Aeromonas* (Ammor *et al.*, 2006).

II.2.5. Acétaldéhyde

Chez *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, l'action d'une thréonine aldolase, clive la thréonine en acétaldéhyde et en glycine. L'acétaldéhyde à une concentration de 10 à 100 ppm empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* dans les produits laitiers (Piard et Desmazeaud, 1991).

Les quantités d'acétaldéhyde produites par les lactocoques oscillent entre 2,6 et 6,5 mg/ml (ppm) (Bottazzi et Dellaglio, 1967). La contribution de l'acétaldéhyde à la biopréservation est mineure puisque le seuil de saveur est beaucoup inférieur aux niveaux qui sont considérés nécessaires à l'inhibition des microorganismes (Kulshrestha et Marth, 1974).

II.2.6. Dioxyde de carbone (CO₂)

Le dioxyde de carbone (CO₂) est produit principalement par les bactéries lactiques hétérofermentaires des espèces de *Leuconostoc* et *Lactobacillus* (Ammor *et al.*, 2006). Le CO₂ peut jouer un rôle antimicrobien par la création d'un environnement anaérobie qui inhibe la décarboxylation enzymatique, et l'accumulation de CO₂ dans la bicouche lipidique de la membrane peut entraîner un dysfonctionnement de la perméabilité (Eklund, 1984 ; Ammor *et al.*, 2006).

Le degré d'inhibition de CO₂ varie considérablement entre les organismes. CO₂ à 10% (v/v) pourrait réduire le nombre de bactéries totales par 50% (v/v) (Ammor *et al.*, 2006).

II.2.7. Bactériocines

D'après, Klaenhammer (1988), les bactériocines sont définies comme des protéines, ou complexe peptidique. Le spectre d'action des bactériocines est plutôt étroit, limité aux espèces taxonomiquement proches d'espèce productrice. La synthèse d'une protéine d'immunité protège l'organisme contre sa propre bactériocine (Hécharde *et al.*, 1993). Elles ont un optimum de stabilité, de solubilité et d'activité à pH acide. Elles sont inactivées par les protéases et sont thermostables (Labioui *et al.*, 2005).

Toutes les bactériocines produites par les bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries à Gram positif. D'après ; Dortu et Thonart, 2009 ; aucune bactériocine produite par les bactéries lactiques avec une activité contre les bactéries à Gram

négatif n'a été décrite, la membrane externe des bactéries à Gram négatif ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Dortu et Thonart, 2009).

II.2.7.1. Classification

Les bactériocines présentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988). Il existe différentes classes de bactériocines produites par les bactéries lactiques et elles peuvent être classées en fonction de leurs caractéristiques génétiques et biochimiques (dont la stabilité thermique) (Klaenhammer *et al*, 1994 ; Dortu et Thonart, 2009) Tableau II.

Tableau II. Classification des bactériocines (Parada *et al.*, 2007).

Classes	Caractéristiques principales	Stabilité thermique	Exemples
Classe I Lantibiotiques	-Cycle thioester dans la séquence poids moléculaire < 5 KDa -Ia : flexibles et positivement chargés -Ib : rigides et sont chargés négativement ou n'ont pas de charge nette	Stable	Nisine Lanthionine Méthyllanthionine
Classe II Peptides anti- <i>Listeria</i>	-IIa : poids moléculaire < 10 KDa -IIb : association de 2 peptides pour l'activité, poids moléculaire < 10KDa -IIc : Petits peptides < 10KDa	Stable Stable Stable	Pédiocine PA-1 Sakacine P Lactococcine G plantaricines EF et JK Divergicine A Acidocine B
Classe III	-Poids moléculaire >30 KDa	Sensible	Helvéticine J Helvéticine V Lactacine A et B Acidofilicine A

II.2.7.2. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des bactériocines est largement étudié. Il est admis qu'il se décompose en trois étapes. La première consiste en la fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible. C'est durant cette étape que le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle permettant l'expression de son activité (Parada *et al.*, 2007; Jasniewski, 2008).

La seconde étape est l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique. La dernière étape est la formation du pore (figure 1).

Ce dernier conduit à des fuites de composés intracellulaires vitaux. Leur perte entraîne donc des effets néfastes pour la cellule, allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne à la mort cellulaire (Smaoui, 2010 ; Siboukeur, 2011 ; Makhloufi, 2012).

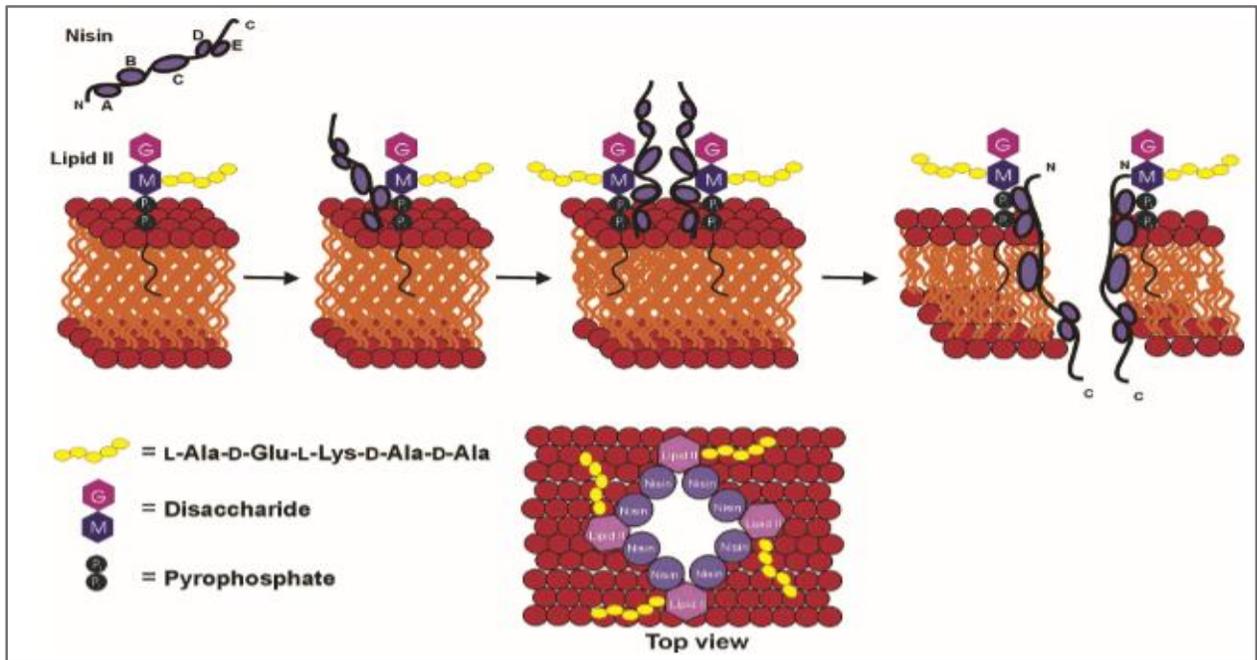


Figure 1. Formation de pores membranaires par le complexe Nisine-lipide II selon Chatterjee *et al.*, (2005).

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie N°1 (Bloc 9) de la faculté de sciences de la nature et de la vie « Université Abderrahmane Mira », sous la direction de Docteur Faradji-Hamma dans une période allant de 18 février à 20 avril 2018.

I. Les souches utilisées

Dix-neuf souches de bactéries lactiques isolées à partir du lait cru et des produits laitiers de différentes régions (Tableau III, Annexe I) de la Willaya de Bejaia, et qui font partie de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée ont été utilisées dans cette étude comme souches tests. L'origine de ces souches sont données dans l'annexe I. Les souches tests sont conservées dans des bouillons (MRS et M17) additionné du glycérol.

Pour les souches cibles ; afin de sélectionner les souches lactiques les plus performantes (activité antibactérienne), nous avons utilisé deux souches pathogènes appartenant à la collection de laboratoire:

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*

II. Les méthodes

II.1. Revivification des souches utilisées

Les souches tests (lactiques) étaient conservées sur bouillon MRS et M17 à (-20°C), transférer 1 ml de leur cultures décongelées dans des tubes de 9 ml du bouillon MRS (Tableau VII, Annexe II). Ces bouillons sont incubés à 30°C dans une durée qui s'étend entre 24h et 48 h. Cette opération est répétée plusieurs fois, pour avoir des cultures fraîches.

Et pour les souches cibles (pathogènes), elles étaient conservées dans des bouillons à (4°C). Leur revivification consiste à transférer 1ml de la culture de chaque une d'elles dans 9 ml du bouillon nutritif (Tableau VIII, Annexe II). Ces bouillons sont incubés à 37°C pour *Staphylococcus aureus* et à 44°C pour *Escherichia coli*, pendant 24h. Cette opération est répétée plusieurs fois, afin d'avoir des cultures fraîches.

II.2. Vérification de la pureté des souches utilisées

C'est indispensable de vérifier la pureté des souches utilisées et réaliser quelques tests rapides.

- L'isolement des bactéries lactiques est réalisé sur gélose MRS (pH 6,5) et incubées à 37°C /24h. L'isolement de *Satphylococcus aureus* est réalisé sur gélose Baird Parker additionnée de jaune d'œuf et de tellurite de potassium, et incubée à 37°C /24h. Et pour l'isolement d'*Escherichia coli*, il est réalisé sur gélose EMB et incubé à 44°C /24h. Une observation de l'aspect macroscopique après la culture pour vérifier la pureté des souches.

- Réalisation de la coloration de Gram pour les souches lactiques.
- Réalisation du test de catalase pour les souches lactiques ; une goutte d'eau oxygénée à 10V était déposée sur une lame contenant une colonie de 48 heures isolée sur milieu gélosé, le résultat est immédiat ; si la catalase est présente il se caractérise par un dégagement gazeux (O₂) (Devoyod et Muller, 1969).

II.3. Standardisation des *inocula*

A partir des cultures sur gélose, 3 colonies de chacune des souches lactiques et 1 colonie de chacune des souches pathogènes sont mises dans 9 ml de bouillon MRS et 9 ml de bouillon nutritif respectivement. Puis incubées à 30°C pour les bactéries lactiques et 37°C pour les pathogènes pendant 24 heures (Figure 2).

Un dénombrement est réalisé au terme de l'incubation pour les deux (souches tests et souches cibles).

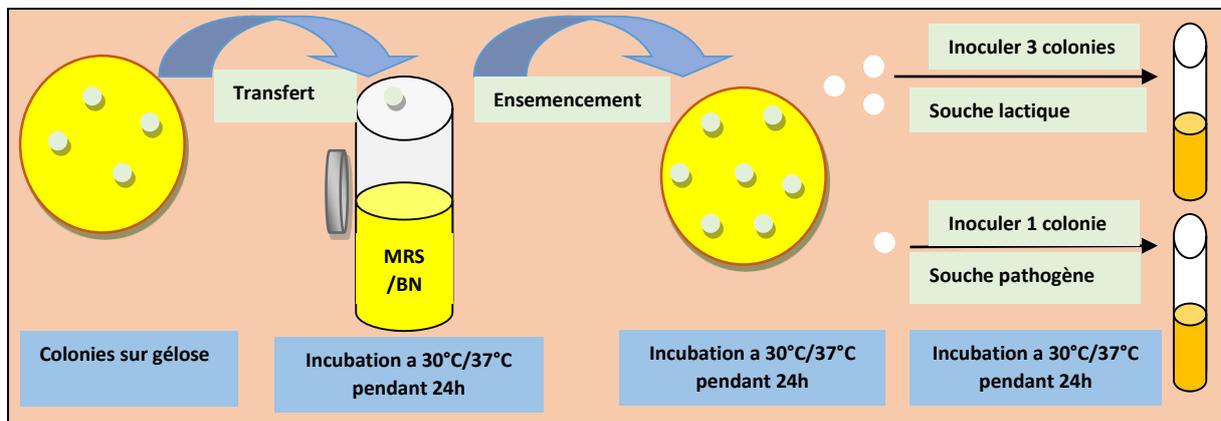


Figure 2. Standardisation des *inocula*.

III. Test de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques

Les dix-neuf souches lactiques sont testées à l'égard de deux souches pathogènes. L'activité antibactérienne est révélée par deux tests d'antagonisme :

- Test des spots (Fleming *et al.*, 1975).
- Test des puits (méthode de Barfoot et Klaenhammer, 1983).

III.1. Test des spots

La méthode des spots accordée à Fleming *et al.*, (1975), et Tagg *et al.*, (1976), est utilisée pour la détection des inhibitions (Schillinger et Lucke, 1989); permet de mettre en évidence l'activité antibactérienne des souches lactiques étudiées.

Un volume de 5µl de chaque culture fraîche de 18 heures des souches lactiques (19 souches) est déposé sur la gélose MRS, elles sont laissées à température ambiante pour permettre aux spots de se sécher (10 à 15 minutes) et les incubées à 30°C pendant 24 heures. En parallèle, des

cultures fraîches des bactéries pathogènes sont préparées en les cultivant, une colonie dans 9 ml du bouillon nutritif et incubées à 37°C pendant 18 heures.

Après l'incubation, 9 ml de gélose nutritive en surfusion sont inoculées par 1 ml de la souche cible (10^6 UFC/ml). Puis, le mélange est ensuite coulé sur la couche de MRS, en contact direct avec les spots. Les boîtes sont incubées à 37°C/ 24h. Ce test est réalisé en double exemplaire pour chaque souche cible (Figure 3).

L'activité antibactérienne se révèle par l'apparition des zones claires autour des spots ; le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en millimètre.

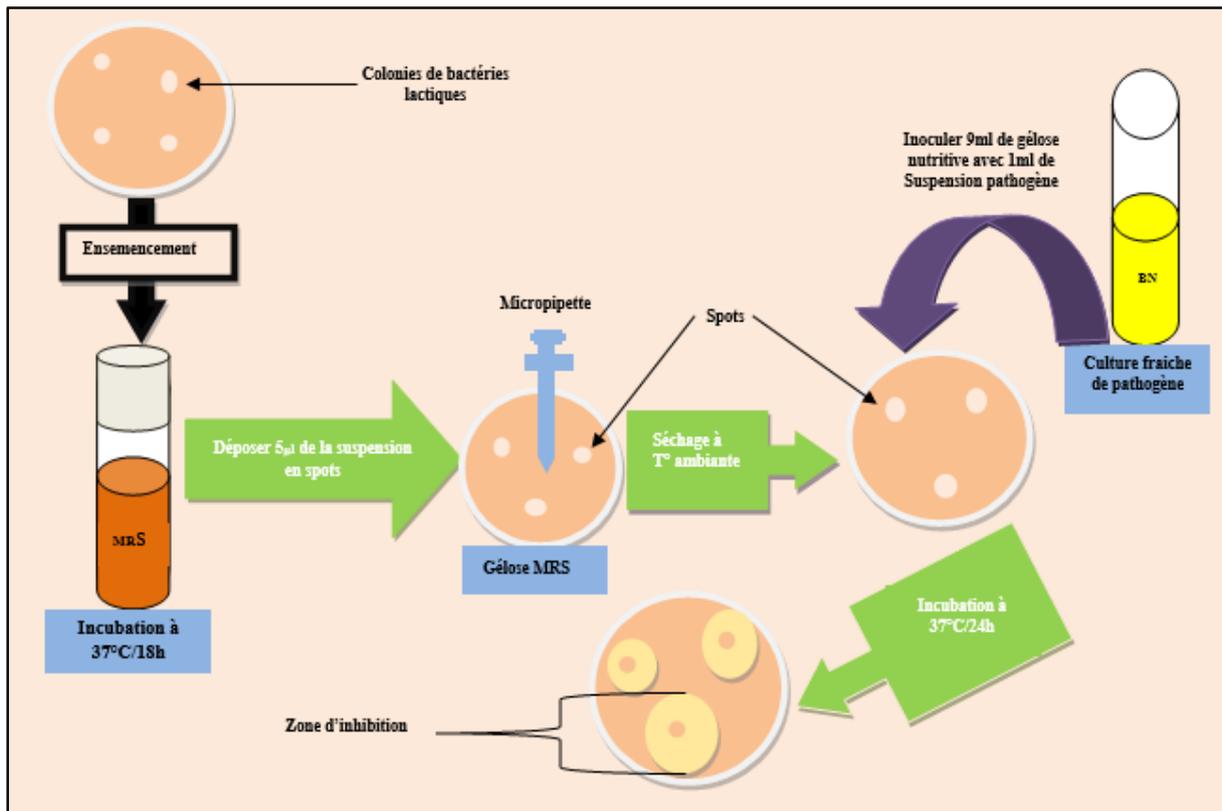


Figure 3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des spots.

III.2. Test des puits

La méthode des puits (méthode de Barfoot et Klaenhammer, 1983), permet de tester l'activité antibactérienne des surnageants de culture des souches lactiques à l'égard des deux souches pathogènes ciblées (10^6 UFC/ml) (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*), des cultures de 18 heures des souches lactiques sont préparées dans un bouillon MRS. Ces dernières sont par la suite centrifugées (centrifuge : Centurion Scientific UK) à 6000 g pendant 20 minutes à 4°C. Sur une fine couche de gélose nutritive préalablement coulée dans la boîte de pétri et solidifiée une autre couche de gélose Mueller Hinton (MH) (Tableau IX, Annexe II) inoculée avec la culture de pathogène (10^7 UFC/ml) est coulée (10 ml MH et 1 ml suspension de *Staphylococcus*

aureus ou d'*Escherichia coli*) ; des puits de 6 mm de diamètre et de 4 mm de profondeur sont creusés. 100 µl du surnageant natif obtenu après la centrifugation de la culture fraîche sont introduites dans chaque puit.

Les surnageants sont neutralisés par la soude (NaOH) 0,1N de façon à obtenir un pH de 6,5 (Kim *et al.*, 2001 ; Labioui *et al.*, 2005), puis l'activité est testée par la méthode des puits comme détaillée précédemment.

Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 heures afin de permettre la diffusion du surnageant dans la gélose. Au terme de diffusion, elles sont incubées à 37°C pendant 18 heures (Figure 4).

L'activité antibactérienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits. Les diamètres des zones d'inhibition apparues sont mesurés en millimètre, le test est fait deux fois.

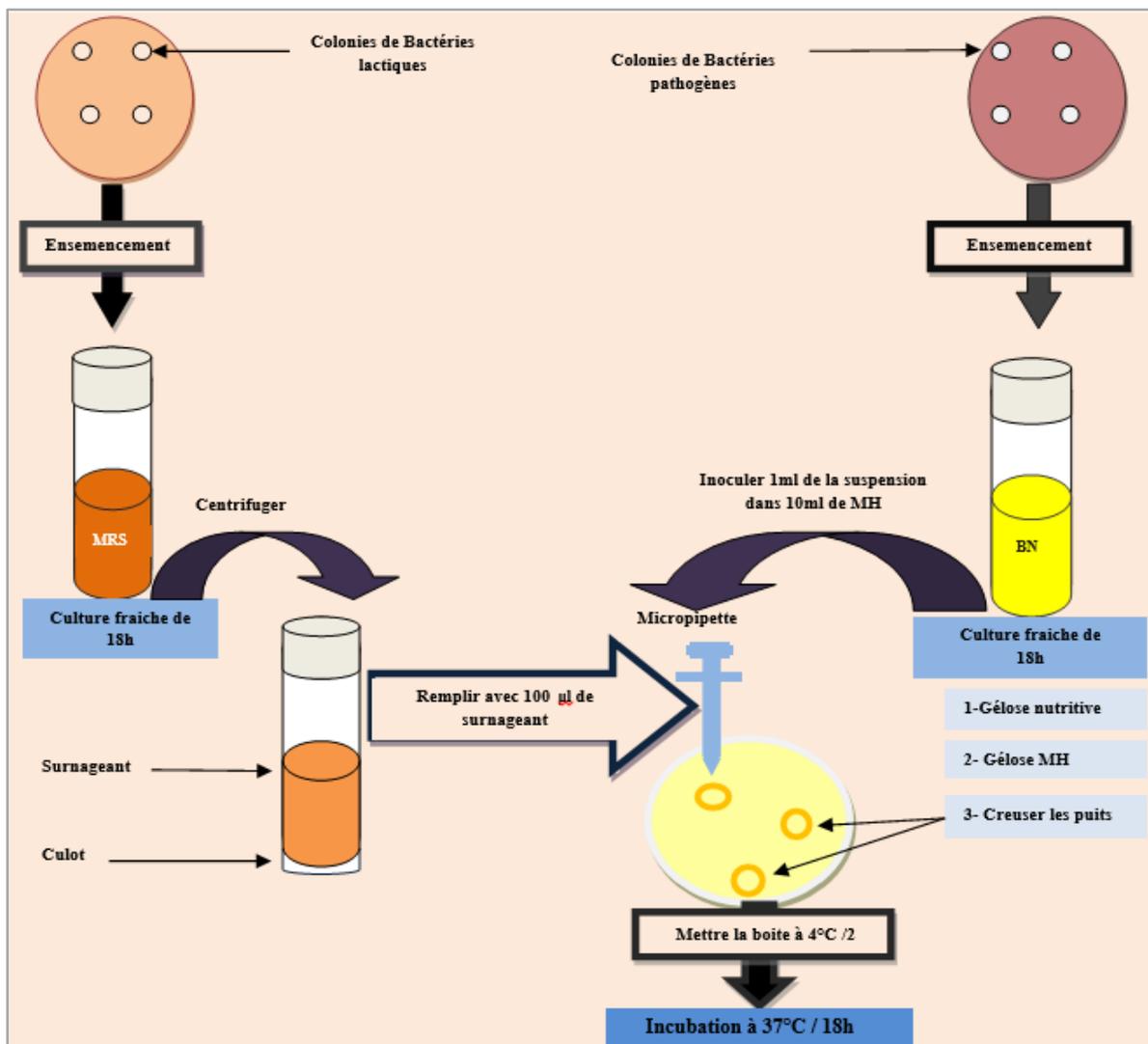


Figure 4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des puits.

III.3. Test d'optimisation de l'activité antibactérienne

Afin d'optimiser l'activité antibactérienne les souches lactiques les plus performantes et actives vis-à-vis des deux souches pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) sont

sectionnées selon les diamètres mesurés de chaque zone d'inhibition observée dans les deux tests réalisés spots et puits. Les quatre souches tests sélectionnées dans cette optimisation sont LC4, LB1, LB2 et LC16.

III.3.1. La synergie des activités des surnageants non neutralisés

Six combinaisons ont été réalisées à partir des quatre souches sélectionnées :

(LB1 et LC16), (LB1 et LB2), (LC4 et LC16), (LC4 et LB2), (LC4 et LB1) et (LB2 et LC16)

L'activité antibactérienne de ces différentes combinaisons a été testée par la méthode des puits (50 µl du surnageant de chaque souche des combinaisons sélectionnées, soit 100 µl par puit).

III.3.2. L'activité antibactérienne à différentes températures (T°)

Trois colonies de 48 heures de chaque souche sélectionnée ont étéensemencées sur milieu MRS liquide à 25°C, 30°C et 45°C, pendant 18 heures. Puis les cultures sont centrifugées à 6000 g pendant 20 minutes et conservées à 4°C. L'activité antibactérienne vis-à-vis des souches pathogènes est évaluée par la méthode des puits.

III.3.3. L'activité antibactérienne à différents pH

Les souches ont étéensemencées sur MRS liquide avec différentes valeurs de pH (5, 6, 7 et 9,2) et incubées à 30°C, pendant 18 heures. L'activité antibactérienne est évaluée par la méthode des puits.

III.3.4. L'activité antibactérienne à différentes source de carbone

La composition du milieu MRS a été modifiée, on utilise du MRS sans extrait de viande et glucose, pour évaluer l'effet de ces composés sur la production des substances antibactériennes. Le glucose dans le milieu MRS a été remplacé par le fructose. L'activité antibactérienne est évaluée par la méthode des puits (Merzouk, 2015).

I. Revivification des souches utilisées

Une croissance a été exprimée par un trouble sur toute la longueur du tube pour toutes les souches de bactéries lactiques sur le bouillon MRS après l'incubation à 30°C/24 heures (Figure 5). Et même résultat pour les deux souches de bactéries pathogènes ; une croissance a été remarquée sur le bouillon nutritif à 37°C/24 heures pour *Staphylococcus aureus* et 44°C/24 h pour *Escherichia coli*.

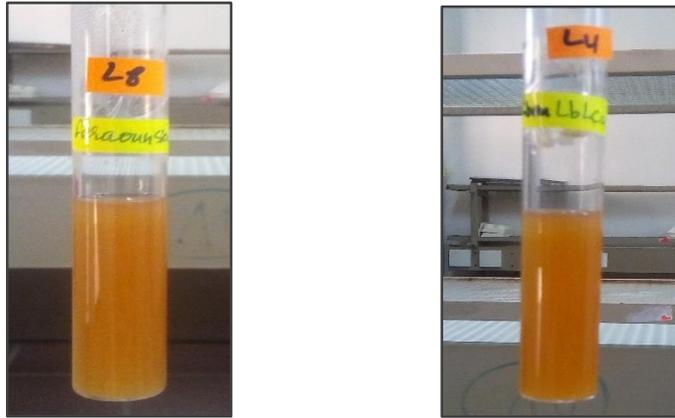


Figure 5. Aspect du bouillon MRS après croissance des souches de bactéries lactiques.

II. Vérification de la pureté des souches utilisées

L'aspect macroscopique des cultures sur milieu gélosé MRS montre que toutes les colonies sont de couleur blanchâtre (Figure 6).

Pour les souches lactiques, les colonies obtenues sur boîtes de Petri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur (Badis *et al.*, 2005).

L'aspect macroscopique des colonies des bactéries lactiques sur milieu solide (MRS) montre qu'elles sont rondes et lenticulaires (Allouche *et al.*, 2010; Ismaili *et al.*, 2016).

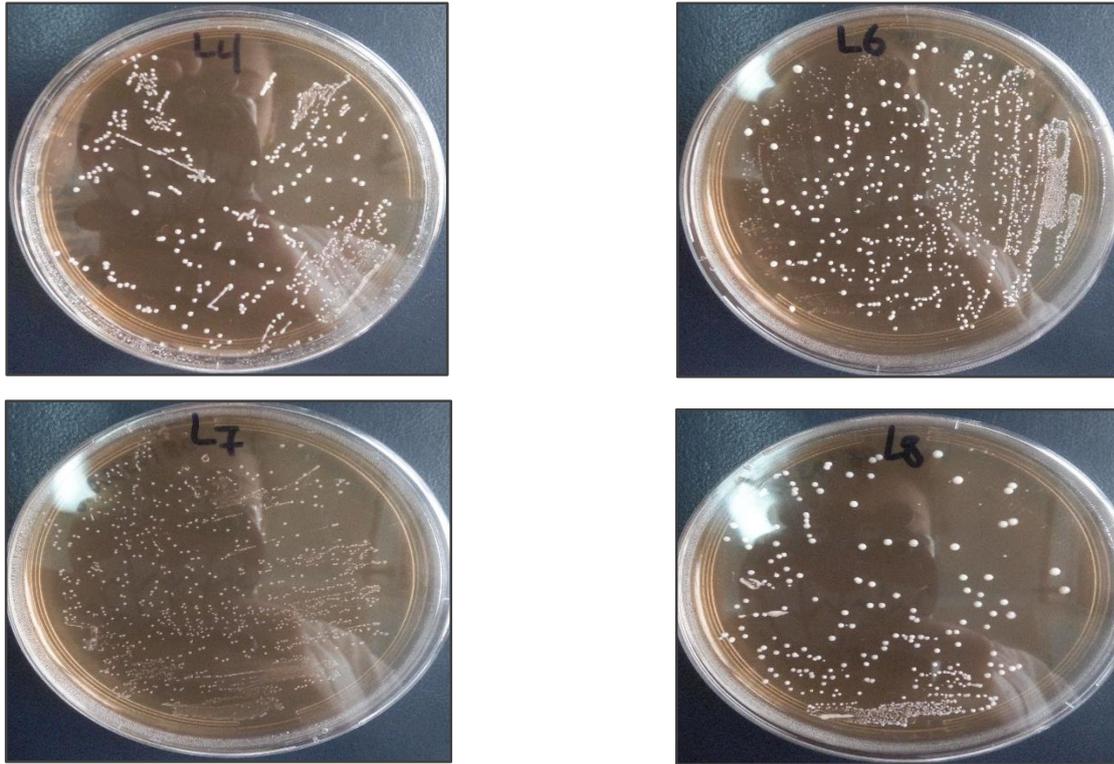


Figure 6. Aspect des colonies des souches lactiques sur gélose MRS.

Le résultat de l'observation microscopique (coloration de Gram) montre que toutes les souches sont de Gram positif (Figure 7). Cependant, 17 souches sont de genre *Lactococcus* et 2 souches de genre *Lactobacillus*. Le test de catalase indique que toutes ces souches sont de catalase négative (Tableau I, Annexe I). Ce qui confirme leur appartenance aux bactéries lactiques.

Après avoir effectué l'examen de la recherche de la catalase et la coloration de Gram, toutes les bactéries à Gram positif et à catalase négative sont présumées comme bactéries lactiques (Carr *et al.*, 2002).

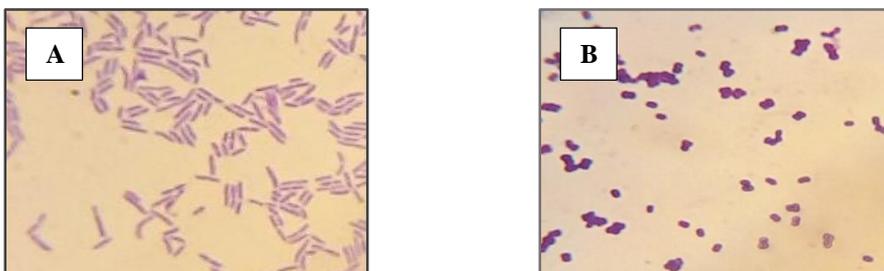


Figure 7. Aspect microscopiques des souches lactiques (coloration de Gram), A : forme bacille ; B : forme cocci.

III. Résultats de la standardisation des *inocula*

Les résultats de la standardisation des souches montrent qu'à partir de 3 colonies de chaque souche lactique utilisée, incubées à 30°C/18 heures, donne un inoculum de ($\approx 10^9$ UFC/ml). En revanche, une colonie d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* donnent des *inocula* de ($\approx 10^7$ UFC/ml).

IV. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

IV.1. Test des spots

Les dix-neuf souches qui nous avons testées selon leurs activités antibactériennes à l'égard de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Les résultats obtenus montrent que toutes les souches lactiques ont un effet antibactérien vis-à-vis des deux souches pathogènes (Figure 8).



Figure 8. Résultats du test de spots des souches lactiques à l'égard de *Staphylococcus aureus*.

Cependant, certaines souches présentent des activités antibactériennes plus importantes que d'autres souches. Elles présentent des activités antibactériennes très importantes des zones d'inhibition vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* qui varient entre 17mm et 34mm (Tableau II, Annexe I) (Figure 9).

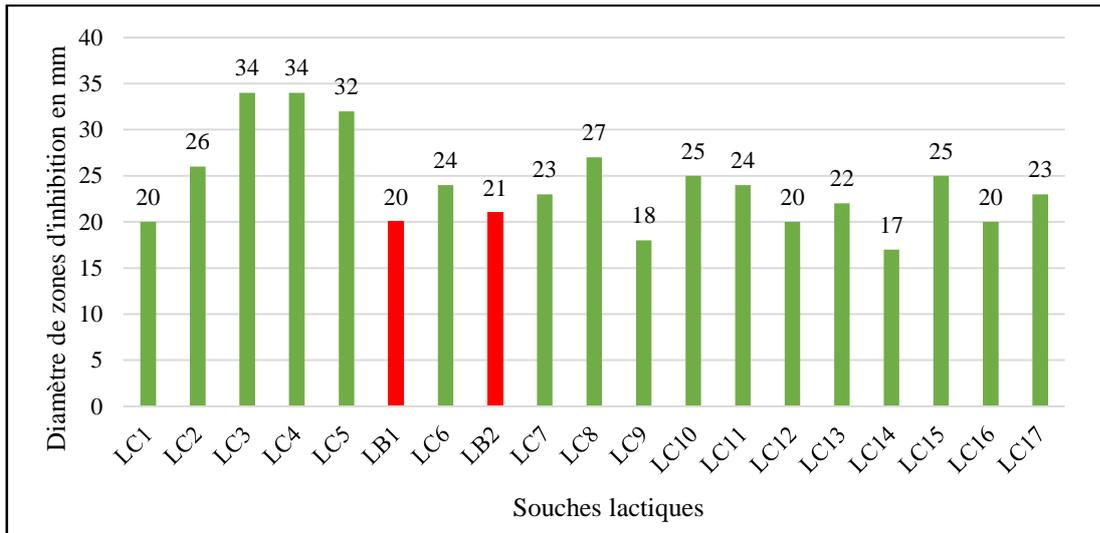


Figure 9. Résultats obtenues par le test des spots à l'égard de *Staphylococcus aureus*.

Ce test a montré que ces souches lactiques possèdent un effet inhibiteur vis-à-vis d'*Escherichia coli* avec des zones d'inhibition variant entre 20mm et 36mm de diamètre (Tableau II, Annexe I) (figure 10).

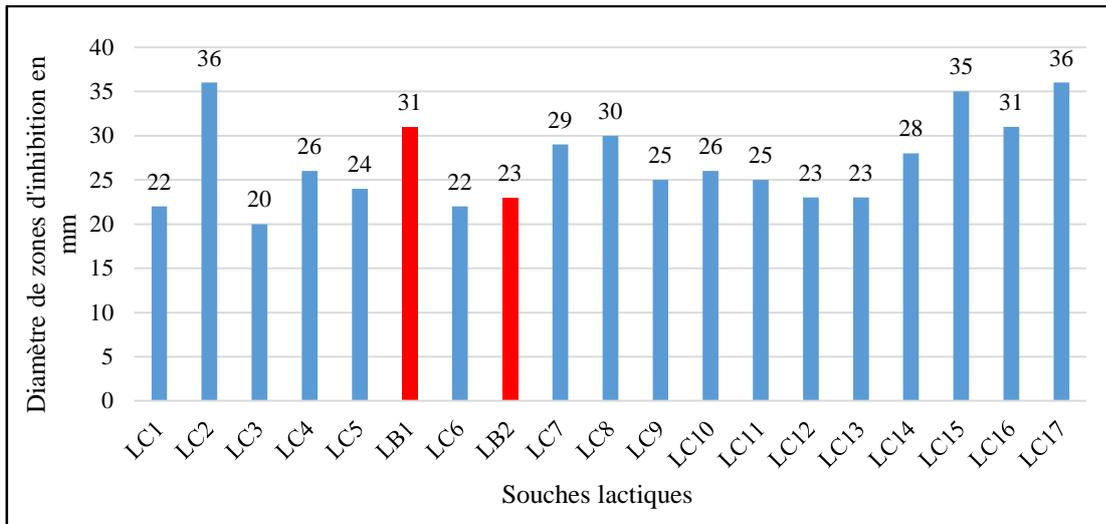


Figure 10. Résultats obtenues par le test des spots à l'égard d'*Escherichia coli*.

Les deux souches LB1 et LB2 qui appartiennent au genre *Lactobacillus*, on remarque qu'elles montrent une activité importante avec une zone d'inhibition vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* de 20 mm et 21 mm de diamètre respectivement. Elles ont montré plus d'antagonisme vis-à-vis d'*Escherichia coli* avec des zones d'activité de 31 mm et 23 mm respectivement (Figure 9 et 10).

Pour le genre *Lactococcus*, la plus grande activité a été enregistrée avec les souches LC3 et LC4 qui ont donné une zone d'inhibition de 34 mm vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. LC2 et LC17 présentent un pouvoir antibactérien le plus important avec une zone d'inhibition maximale d'un diamètre de 36mm vis-à-vis d'*Escherichia coli* (Figure 9 et 10).

Les résultats qu'on a trouvé dans cette étude, sont similaires à ceux obtenus par Labioui *et al* en 2005, la zone d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis *Staphylococcus aureus* varie entre 23,3 mm et 32,5 mm, et entre 22,5mm et 31,5mm vis-à-vis *Escherichia coli*. Cette différence d'activité a été reliée au pouvoir acidifiant de chaque souche.

Les travaux de Savadogo *et al* en 2004, ont reporté que les diamètres des zones d'inhibitions des bactéries lactiques isolées du lait fermenté sont de l'ordre de 9 mm à 10 mm vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et entre 8 mm et 9 mm de diamètre vis-à-vis *Escherichia coli*. Ces résultats montrent que les zones d'inhibitions sont inférieures aux celles qu'on a obtenues dans cette étude.

Les travaux de Hamed et Elattar en 2013, ont montré des zones comprises entre 31 à 38mm en étudiant l'effet antibactériens de souches lactiques isolées à partir de lait de chamelle à l'égard d'*Escherichia coli*. Ces résultats sont proches aux nôtres, où les diamètres obtenus se situent entre 20mm et 36mm.

L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1mm (Schillinger et Lucke, 1989).

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

D'après les résultats que nous avons obtenus, les souches lactiques étudiées ont une activité antibactérienne à l'égard de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli*. Cette activité serait probablement due à la synergie entre les différents métabolites : les acides organiques, le diacétyle, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (Schillinger *et al.*, 1996).

IV.2. La méthode des puits

La méthode des puits a montré que toutes les souches lactiques utilisées ont présenté des zones d'inhibition vis-à-vis des souches pathogènes utilisées.

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).

IV.2.1. Cas du surnageant non neutralisé

L'activité des surnageants non neutralisés (Tableau X, Annexe I) des cultures de 18 heures des souches lactiques (10^9 UFC/ml) a été testée à l'égard de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli* (10^7 UFC/ml) par la méthode des puits. Ce test a montré que toutes les souches lactiques étudiées ont une activité antibactérienne vis-à-vis les deux souches pathogènes précédentes, avec des zones d'inhibition de diamètres variant entre 10 mm et 32 mm pour *Staphylococcus aureus* (Tableau III, Annexe I) (Figure 11) et entre 10 mm et 31 mm pour *Escherichia coli* (Tableau IV, Annexe I) (Figure 12).

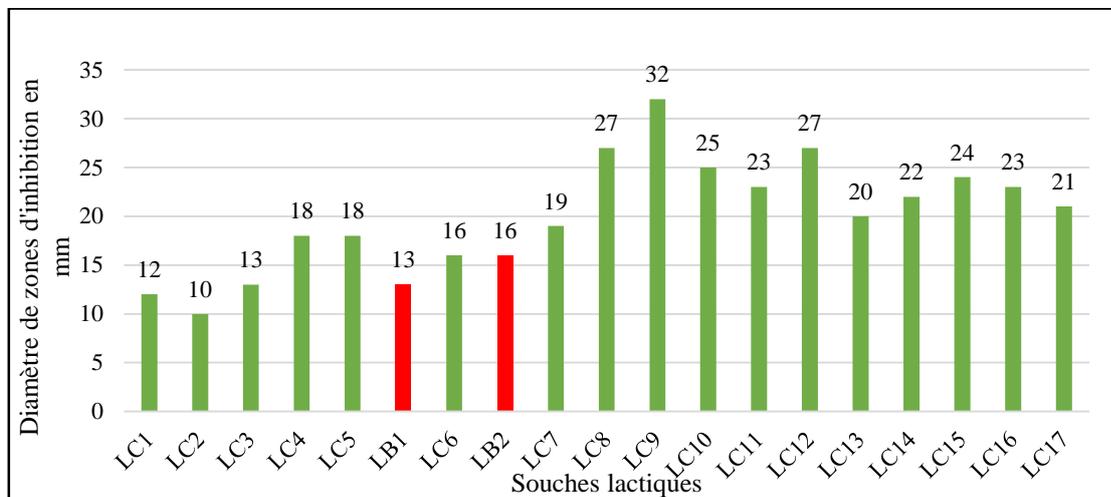


Figure 11. Activité antibactérienne du surnageant non neutralisé des souches lactiques à l'égard de *Staphylococcus aureus*.

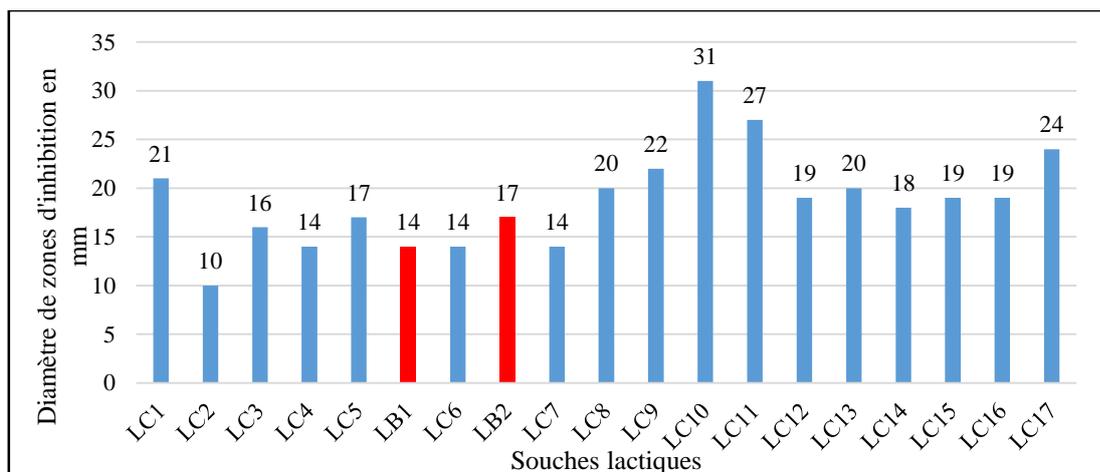


Figure 12. Activité antibactérienne du surnageant non neutralisé des souches lactiques à l'égard d'*Escherichia coli*.

Les souches LB1 et LB2 du genre *Lactobacillus* ont révélé une zone d'inhibition de 13 mm et 16 mm respectivement à l'égard de *Staphylococcus aureus* (Figure 11) et de 14 mm et 17 mm respectivement vis-à-vis *Escherichia coli* (Figure 12).

Par contre, chez *Lactococcus*, on a noté des activités très importantes que celles montrées par *Lactobacillus*. La souche LC9 montre la plus grande activité à l'égard de *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de zone d'inhibition de 32 mm (Figure 11) et une activité vis-à-vis *Escherichia coli* a été enregistrée par la souche LC10 avec 31 mm (Figure 12).

L'inhibition des souches de *Staphylococcus aureus* par des souches de *Lactobacillus plantarum* a été déjà décrite par Mami *et al* en 2008, qui ont mentionné que des souches de *Lactobacillus plantarum* isolées du lait cru de chèvre inhibent des souches de *Staphylococcus aureus*.

L'inhibition des souches d'*Escherichia coli* par certaines souches de *Lactobacillus plantarum* a été décrite par plusieurs travaux (Todorov *et al.*, 2004 ; Karthikeyan et Santosh, 2009).

IV.2.2. Cas du surnageant neutralisé

Tous les surnageants neutralisés des souches lactiques étudiées présentent une activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibition comprises entre 12mm et 38mm de diamètre (Tableau III, Annexe I) (Figure 13).

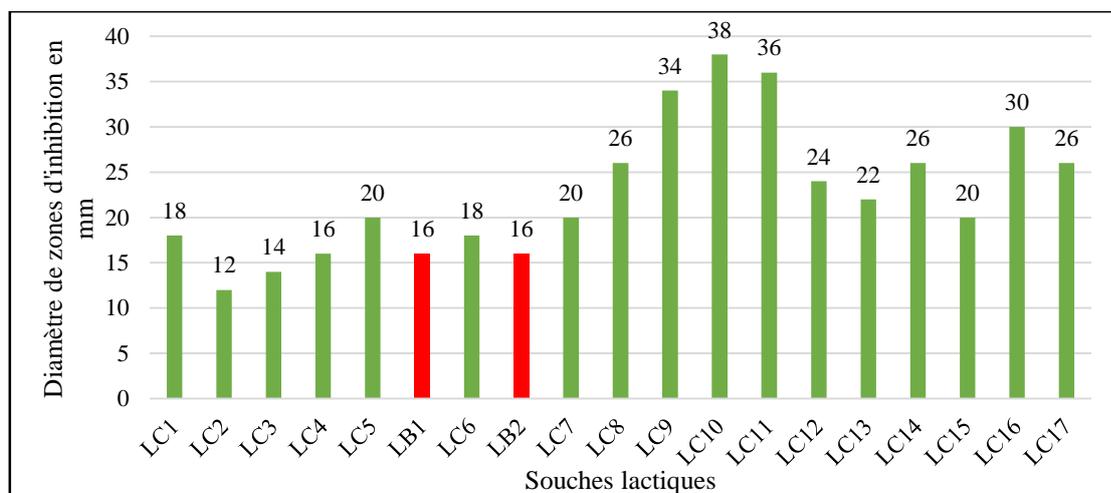


Figure 13. Activité antibactérienne du surnageant neutralisé des souches lactiques à l'égard de *Staphylococcus aureus*.

L'analyse d'histogramme de la figure et la comparaison entre les différents résultats obtenus avec les surnageants non neutralisés et les surnageants neutralisés, ont montré que la souche LB2 du genre *Lactobacillus* garde le même diamètre de zone d'inhibition après neutralisation du surnageant, donc l'activité antibactérienne n'est pas due seulement à l'effet des acides organiques mais à d'autres substances tel que les bactériocines.

Les zones d'inhibition des souches LC4, LC12 et LC15 diminues après la neutralisation des surnageants. Cela est probablement dû à l'élimination du pouvoir acidifiant de ces souches

lactiques ce qui témoigne de la présence d'autres substances inhibitrices autres que les acides organiques.

Néanmoins, les diamètres des souches LC1, LC2, LC3, LC5, LC6, LC7, LC8, LC9, LC10, LC11, LC13, LC14, LC16, LC17 et LB1 ont augmenté après la neutralisation. Ce qui est dû probablement non seulement à l'effet des acides organiques mais aussi à la présence de peptides antibactériens (bactériocines) produits par ces souches, en effet, sont plus actifs à pH neutre qu'à pH acide. D'après Song *et al* en 1997, l'élimination de l'effet des acides organiques favorise plutôt l'activité des substances antibactériennes telles que les bactériocines.

V. Résultats de l'optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques

V.1. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques par synergie des activités des surnageants non neutralisés

L'optimisation des conditions de croissance, en combinant entre les souches LC4, LB1, LB2 et LC16 qui ont été sélectionnées selon leur activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli*, a montré que ces souches lactiques combinées ont une activité antibactérienne plus importante à l'égard de deux souches pathogènes utilisées, les diamètres des zones d'inhibitions sont présentés dans la figure 14 (Tableau V, Annexe I).

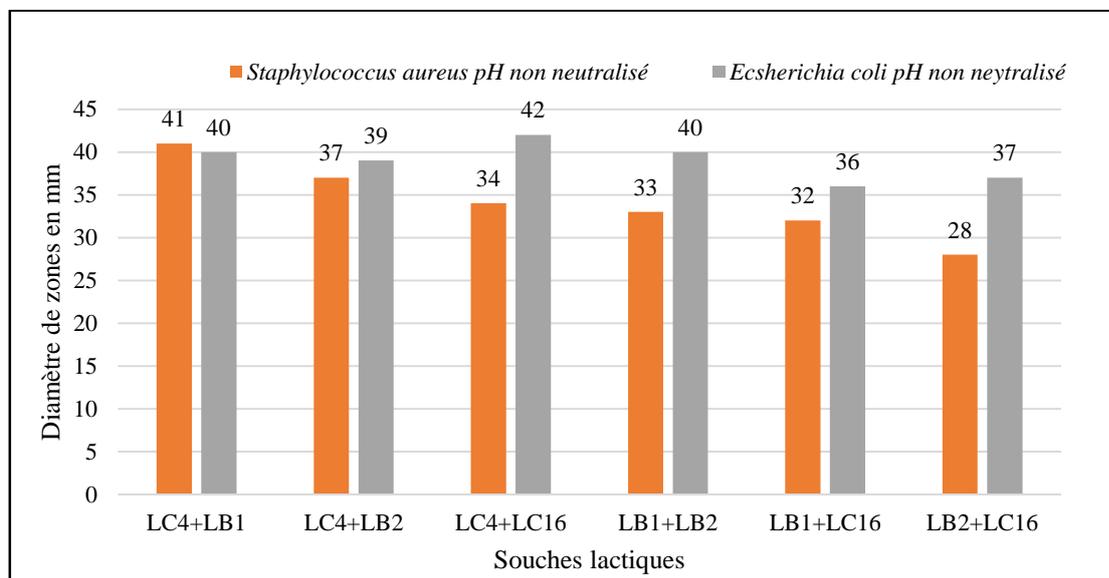


Figure 14. Activité antibactérienne du surnageant non neutralisé des souches combinées à l'égard de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Les résultats obtenus avec les surnageants non neutralisés des souches combinées vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* montrent que la combinaison (LC4 et LB1) présente la plus grande zone

d'inhibition avec un diamètre de 41mm. (LB2 et LC16) montre la plus faible activité avec une zone d'inhibition de 28mm de diamètre.

Néanmoins, les zones d'inhibition 32mm, 33mm, 34mm et 37mm sont obtenues par les combinaisons (LB1 et LC16), (LB1 et LB2), (LC4 et LC16) et (LC4 et LB2) respectivement.

Les résultats obtenus avec les surnageants non neutralisés des souches combinées à l'égard d'*Escherichia coli* montrent que la combinaison (LC4 et LC16) présente une zone d'inhibition maximale de 42 mm de diamètre et les combinaisons de (LC4 et LB1), (LB1 et LB2) montrent une zone avec un diamètre de 40 mm.

Une activité néanmoins importante est obtenues pour le reste des combinaisons testées (LB1 et LC16), (LB2 et LC16) et (LC4 et LB2) est avec respectivement des zones d'inhibition de 36mm, 37mm et 39mm de diamètre.

V.2. L'activité antibactérienne à différentes conditions de production des substances antibactériennes

V.2.1. L'activité antibactérienne à différentes températures (T°)

- A l'égard de *Staphylococcus aureus*

La température d'incubation influe sur le métabolisme des souches lactiques. En effet, les souches LC4, LC16, LB1, et LB2 ont montré une production maximale des substances inhibitrices lorsqu'elles sont cultivées à 30°C. Des zones d'inhibition importantes produites à 25°C par toutes ces souches (24 mm à 31 mm). En revanche, aucune zone n'a été observée par toutes ces souches lorsqu'elles sont incubées à 45°C (Tableau VI, Figure 1, Annexe I) (Figure 15).

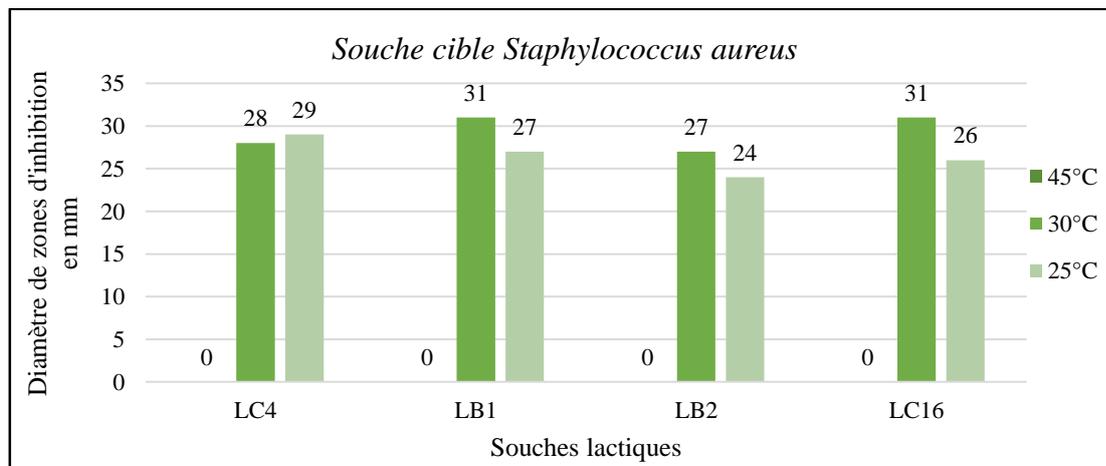


Figure 15. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de *Staphylococcus aureus* à différentes températures.

- **A l'égard d'*Escherichia coli***

Toutes les zones d'inhibition observées sont importantes, effectivement des zones d'inhibition allant de 31 mm à 40 mm de diamètre sont obtenues à 25°C et 30°C. Par contre, aucune zone d'inhibition n'a été remarquée à 45°C (Tableau VI, Figure 2, Annexe I) (Figure 16).

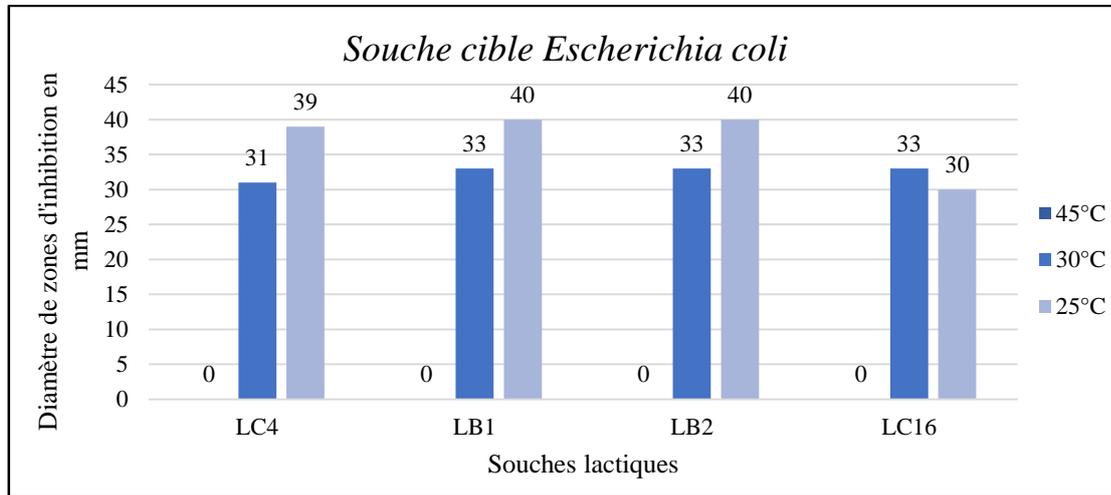


Figure 16. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard d'*Escherichia coli* à différentes températures.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Merzouk en 2015, en effet, la température d'incubation influe sur le métabolisme des souches *Lactococcus* qui ont montré une production maximale de composés antibactériens lorsqu'elles sont cultivées à 30°C et 37°C. Par contre à 45°C ces composés sont inactivés pour toutes les souches testées.

Les isolats identifiés comme étant des *Lactococcus* n'ont présenté aucune croissance à 45°C (Ismaili *et al.*, 2016).

La température optimale de croissance des lactobacilles est généralement comprise entre 30°C et 40°C, elle est de 37°C pour la plupart des espèces (Collins *et al.*, 2009).

La température d'incubation est un facteur essentiel qui module la croissance de bactéries lactiques et affecte de manière significative les quantités des métabolites produites (Dalié *et al.*, 2010).

V.2.2. L'activité antibactérienne à différents pH

- **A l'égard de *Staphylococcus aureus***

Toutes les souches présentent une activité antibactérienne importante (15 mm à 29 mm) dans tous les pH testés (5, 6, 7 et 9,2), la plus grande zone est obtenue par la souche LC16 à pH 7

avec 29 mm et de 26 mm de diamètre à pH 6. Cependant la souche LB1 a présenté la plus grande activité à pH 7 avec une zone de 26 mm. La plus faible activité a été observée chez la souche LC4 avec un diamètre de 15mm (Tableau VI, Figure 1, Annexe I) (Figure 17).

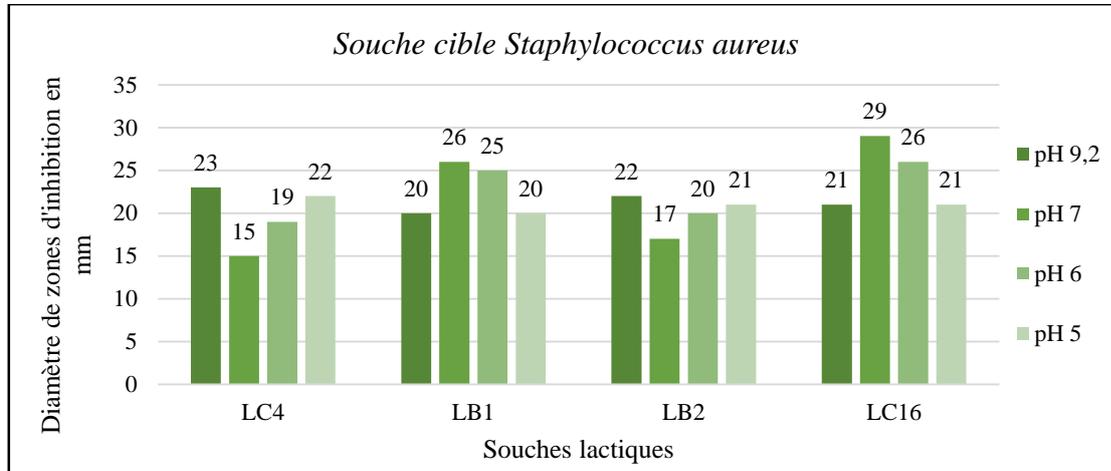


Figure 17. Optimisation de l’activité antibactérienne des souches lactiques à l’égard de *Staphylococcus aureus* à différents pH.

- **A l’égard d’*Escherichia coli***

Les résultats obtenus montrent que les souches lactiques sont actives vis-à-vis *Escherichia coli* dans tous les pH testés. Néanmoins, la souche LB1 a donné les diamètres les plus importants (31 mm à 33 mm) de zones d’inhibition à pH 6 et 7 respectivement. LB2 présente respectivement une zone d’inhibition de 30 mm et 29 mm de diamètre à pH 5 et 6 (Tableau VI, Figure 2, Annexe I) (Figure 18).

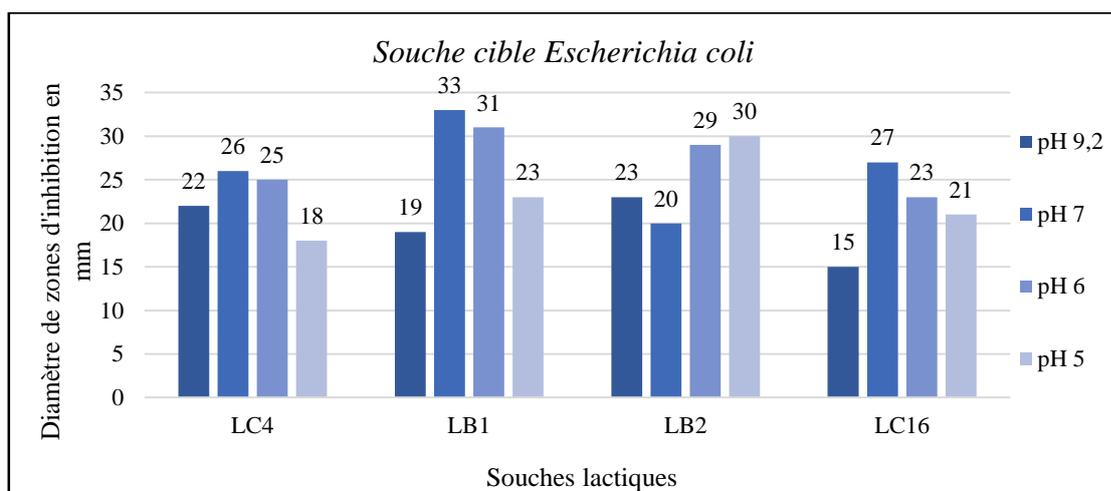


Figure 18. Optimisation de l’activité antibactérienne des souches lactiques à l’égard d’*Escherichia coli* à différents pH.

L'activité antibactérienne des *pediocin-like* augmente à une valeur de pH acide (≤ 5) comparativement à celle observée à pH 7 (Chen *et al.*, 1997a; Chen *et al.*, 1997b). En revanche la bavaricine MN présente une activité optimale à un pH de 6 (Kaiser *et al.*, 1993).

Le pH optimum de la croissance des lactobacilles est de 5,5 mais poussent aussi à pH neutre (Collins *et al.*, 2009).

D'une manière générale, les bactériocines de bactéries lactiques possèdent de nombreux résidus d'acides aminés chargés sur lesquels le pH du milieu peut avoir une grande incidence. Ceci explique les différences d'activité observées en fonction du pH (Djadouni, 2013).

Le pH modifie la solubilité de la bactériocine : la Nisine est quasi insoluble à pH neutre ou alcalin. De plus, le pH modifie la stabilité de la bactériocine, notamment lors d'un choc thermique (Liu *et al.*, 1990).

V.2.3. L'activité antibactérienne à différentes sources de carbone

Aucune inhibition n'a été observée sur le milieu MRS sans glucose et sans extrait de viande ni à l'égard de *Staphylococcus aureus* (Figure 19) ni à l'égard d'*Escherichia coli* (Figure 20). Cependant, une activité antibactérienne a été remarquée lorsque le glucose est remplacé par le fructose. La plus grande zone d'inhibition a été enregistrée avec un diamètre de 18 mm de diamètre vis-à-vis *Staphylococcus aureus* par les souches LC4 et LB2. Une zone d'inhibition de 20 mm vis-à-vis *Escherichia coli* obtenue par Lc₄ (Tableau VI, Figure 1 et 2, Annexe I) (Figure 19 et 20).

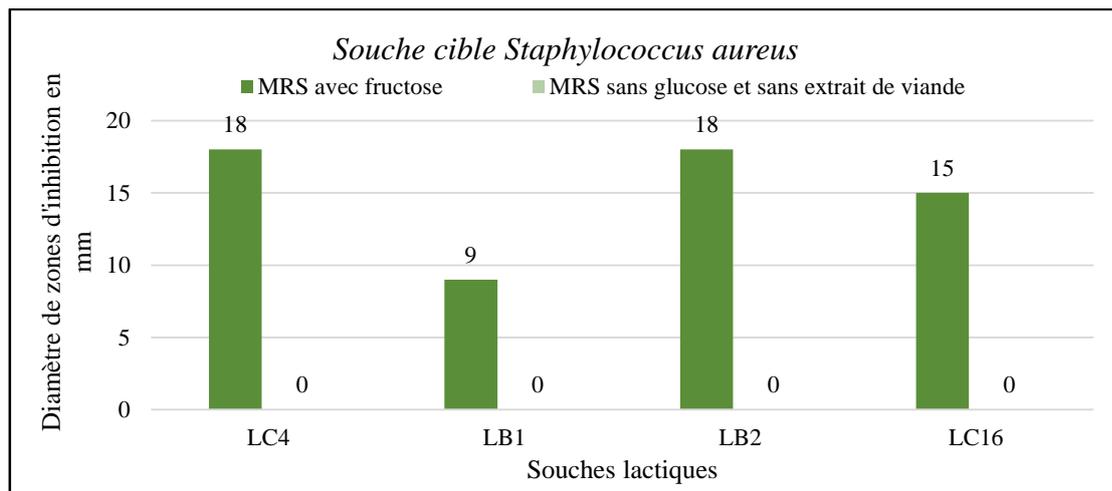


Figure 19. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de *Staphylococcus aureus* à différentes sources de carbone.

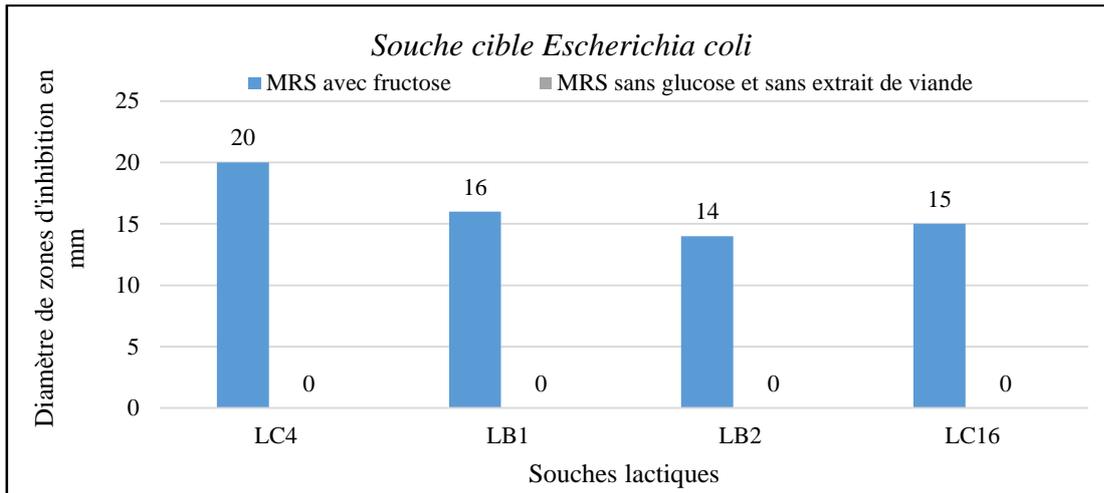


Figure 20. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard d'*Escherichia coli* à différentes sources de carbone.

D'après les résultats obtenus par Merzouk en 2015, la meilleure inhibition a été obtenue lorsque le glucose est remplacé par le fructose. Par contre aucune inhibition n'a été observée sur le milieu MRS sans glucose et sans extrait de viande. Ces résultats sont similaires aux notre.

Les bactéries lactiques du genre *Lactococcus* se développent rapidement sur milieu contenant du glucose (Merzouk, 2015).

Dans l'étude de Djadouni en 2013, les meilleurs résultats correspondant à l'effet inhibiteur de *Lactobacillus plantarium* ont été obtenus dans le milieu MRS contenant le glucose après 18 heures d'incubation à 30°C

Quelques études, ont montré que la source de carbone utilisée est un facteur important dans l'optimisation de la production de bactériocines (Chen *et al.*, 2007; Leroy *et al.*, 2006).

Conclusion

Dans cette étude nous avons revivifié, purifié, standardisé des dix-neuf souches de bactéries lactiques (2 souches *Lactobacillus* et 17 souches *Lactococcus*), afin de sélectionner les souches douées l'activité antibactérienne à l'égard de deux souches pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*), deux tests sont appliqué pour révéler cette activité (test des spots et test des puits). Un essai d'optimisation de l'activité antibactérienne a été réalisé pour les quatre souches sélectionnées (2 souches *Lactobacillus* et 2 souches *Lactococcus*).

Le résultat du test des spots a montré que toutes les souches lactiques testées présentent des zones d'inhibition vis-à-vis des deux souches cibles. En effet, des zones d'inhibition allant de (17 mm à 34 mm) ont été obtenues vis-à-vis *Staphylococcus aureus* et de (22 mm à 40 mm) vis-à-vis *Escherichia coli*. Cette inhibition est due probablement à une compétition nutritionnelle et/ou à une synthèse de métabolites antibactériens. L'activité antibactérienne la plus importante a été obtenue par les souches du genre *Lactococcus*.

Le résultat du test des puits nous a permis de mettre en évidence la nature de ces métabolites produits par les souches lactiques. Les résultats obtenus montrent une activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches pathogènes cibles avec des surnageants non neutralisés et après neutralisation. Effectivement, cette activité inhibitrice notée par toutes les souches de bactéries lactiques.

Le test de synergie des activités des surnageants non neutralisés par une combinaison entre les quatre souches lactiques sélectionnées, a montré que ces dernières combinées ont une activité antibactérienne plus importante, des zones d'inhibition allant (28 mm à 41 mm) ont été obtenues vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et de (36 mm à 42 mm) vis-à-vis d'*Escherichia coli*.

Les résultats de l'optimisation de quatre souches lactiques (LC4, LC16, LB1 et LB2) a été fait à des conditions différentes (température, pH et sources de carbone). Ce test a montré :

- Une production maximale de composés antibactériens lorsque ces souches dernières sont cultivées à 25°C et 30°C. Par contre à 45°C ces composés sont inactivés pour toutes les souches testées.
- Toutes les souches présentent une activité antibactérienne importante avec des zones d'inhibition allant de (15 mm à 35 mm) à l'égard de *Staphylococcus aureus* et de (15 mm à 32 mm) à l'égard d'*Escherichia coli*, dans tous les pH testés (5, 6, 7 et 9,2) dont les activités plus importantes ont été obtenues à pH 6 et 7.
- Une activité antibactérienne a été remarquée lorsque le glucose est remplacé par le fructose. En revanche, aucune inhibition n'a été observée sur le milieu MRS sans glucose et sans extrait de viande.

Perspectives :

- Identification des espèces des souches lactiques sélectionnées.
- Rechercher la nature exacte des métabolites inhibiteurs produits par les souches utilisées (bactériocines, H₂O₂, diacétyl...).
- Utilisation d'autres combinaisons afin de mieux optimiser l'activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques.
- Remplacer le glucose dans le milieu de culture (MRS) par d'autres sucres (amidon, saccharose, lactose,...).

A

Abee T., Krockel L., et Hill C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol*, 28: 169-185.

Allouche F.N., Hellal A., et Laraba A. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie*, 3: 13-20.

Ammor S., Tauveron G., Dufour E. et Cevallier I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same small-scale facility. *F Contr*, 17: 454-461.

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

Axelsson L.T., Chung .T.C., Dobrogosz W.J., et Lingren S.E. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Ecol. Health Di*, 2: 131-136.

B

Badis A., Laouabdia-sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sciences et Technologie*, 23: 30–37.

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

Belarbi F. (2011). Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes. Thèse de Magister, Université d'Oran Es Senia, Algérie, 8-25.

Bottazzi V., et Dellaglio F. (1967). Acetaldehyde and diacetyl production by *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococci. *J. Dairy Res*, 34: 109-113.

Brenner D., J., Krieg N.R., Garrity G.M., et Staley J.T. (2005). Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria Springer.

C

Caplice, E., et Fitzgerald G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50: 131–149.

Carr F.J., Chill D., et Maida N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4): 281-370.

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.

Chatterjee C., Paul M., Xie L., et Van der Donk W.A. (2005). Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev*, 105: 633-684.

Chen H., et Hoover D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety*, 2: 82–100.

Chen Y., Ludescher R.D., et Montville T.J. (1997a). Electrostatic Interactions, but Not the YGNGV Consensus Motif, Govern the Binding of Pediocin PA-1 and Its Fragments to Phospholipid Vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (12): 4770–4777.

Chen Y., Shapira R., Eisenstein M., et Montville T.J. (1997b). Functional Characterization of Pediocin PA-1 Binding to Liposomes in the Absence of a Protein Receptor and Its Relationship to a Predicted Tertiary Structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (2): 524–531.

Chen Y.S., Srionnual s., Onda T., et Yanagida F. (2007). Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol*, 45: 190-193.

Cintas L.M., Herranz C., Hernandez P.E., Casaus M.P., et Nes L.F. (2001). Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int*, 7: 281-305.

Collins M., Fiocco D., Muscariello L., Hols P., Kleerebezem M., Msadek T., et Spano G. (2009). The *Lactobacillus plantarum* ftsH Gene Is a Novel Member of the CtsR Stress Response Regulon. *Journal of Bacteriology*, 191 (5): 1688–1694.

Çon, A. H., Gökalp, H. Y., et Kaya, M. (2001). Antagonistic effect on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua* of a bacteriocin-like metabolite produced by lactic acid bacteria isolated from sucuk. *Meat Science*, 59: 437-441.

D

Dalié D.K.D., Deschamps A.M., et Richard-Forget F. (2010). Lactic acid bacteria-Potential for control of mould growth and mycotoxins: *Rev. Food. Control*. 21: 370-380.

Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C et Ross P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J*, 16: 1058-1071.

Devoyod et Muller. (1969). Les leuconostocs propriétés. Leurs rôles en technologies laitière. *Le lait*, 68: 249-280.

Djadouni F. (2013). Evolution de l'activité antibactérienne des isolats de bactéries lactiques et détermination du spectre d'action de leurs biopeptides vis-à-vis germes d'altération. Thèse de Doctorat en Micobiologie Alimentaire. Université d'Oran, 3-21.

Djadouni F., et Kihal M. (2012). Antimicrobial activity of Lactic Acid Bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 55 (3): 435-443.

Dobrogosz W. J., Casas I. A., Pagano G. A., Talarico T. L., Sjoberg B. M., et Karlsson M. (1989). *Lactobacillus reuteri* and the enteric microbiota. In, The regulatory and protective role of the normal microflora. 283-292.

Dortu C., et Thonart P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 13 (1): 143-154.

E

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

F

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

G

Gálvez A., Abriouel H., Ben Omar N., et Lucas R. (2011). Food application and Regulation. In: Drider D., et Rebuffat S. (eds). Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to applications. *Springer Verlag. Jaen, Spain*, 253-390.

Gentès M.C., Daniel S.G., et Sylvie L. T. (2011). Gel formation and rheological properties of fermented milk with in situ exopolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Dairy Sci. Technol*, 90: 645-661.

Gorbach S. L. (1996). The Discovery of *Lactobacillus* GG. *Nutrition Today*, 31(6): 2S-4S.

H

Hamed E., et Elattar A. (2013). Identification and Some Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated From Egyptian Camels Milk. *Life Science Journal*, 10(1): 1952-1961.

Hécharde Y., Renault D., Cenatiempo Y., Letellier F., Maftah A., Jayat C., Bressolier P., Ratinaud M.H., Julien R., Fleury Y., et Delfour A. (1993). Les bactériocines contre *Listeria* : une nouvelle famille de protéines ?. *Le Lait. Elsevier/INRA*, 73 (2): 207-213.

Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., et Schillinger U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition1. *Am. J. Clin. Nutr*, 73: 365S–373S.

Hutten E., Noro K., et Yang Z. (1995). Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. *Int. Dairy J.*, 5: 503– 513.

Hugenholtz J., et Kleerebezem M. (1999). Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10 (5): 492-497.

I

Ismaili M.A., Guilal J., Hamama A., Saidi B., et Zahar M. (2016). Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *The International Journal of Multi-disciplinary Sciences*, 1: 81-94.

J

Jack R.W., Tagg J.R. et Ray B. (1995). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol Rev*, 59: 171–200.

Janssen M., Geeraerd A.H., Cappuyns A., Garcia-Gonzalez L., Schockaert G., Houteghem N.V., Vereecken K.M., Debevere J., Devlieghere F., et Impe J. (2007). Individual and combined effects of pH and lactic acid concentration on *L. innocua* inactivation: Development of a predictive model and assessment of Experimental Variability. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(5): 1601-1611.

Jasniewski J. (2008). Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous-classe IIa. Thèse de Doctorat. Laboratoire de Science et Génie Alimentaires. Nancy, 9-55.

K

Kandler O., et Kunarth P. (1983). *Lactobacillus kefir* sp. Nov., a component of the microflora of kefir. *Syst. Appl. Microbiol.* 4: 286-294.

Kaiser A.L., et Montville T.J. (1993). The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 75 (6): 536-540.

Karthikeyan V., et Santosh S. W. (2009). Isolation and partial characterization of bacteriocin production from *Lactobacillus plantarum*. *African Journal of Microbiology Research*, 3 (5): 233-239.

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

Klaenhammer T.R. (1988). Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337–349.

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

Kim J.W., et Rajagopal S.N. (2001). Antibacterial Activities of *Lactobacillus crisptus* ATCC 33820 and *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323. *The Journal of Microbiology*, 39 (2): 146-178.

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

Kulshrestha D.C., et Marth E.H. (1974). Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. I. *Escherichia coli*. *J.Milk Food Technol*, 37 (10): 510-516.

L

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

Lanciotti R., Patrignani F., Bagnolini F., Guerzoni M. E., et Gardini F. (2003). Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*, 20: 537-543.

Leroi F. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food microbiology*, 27: 698–709.

Leroy F., Verluyten J., et De Vuyst L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 270-285.

Liu W., et Hansen J.N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactobacillus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (8) : 2551-8.

Lozo J., Jovicic B., Kojic M., Dalgalarondo M., Chobert J.M., Haertlé T., et Topisirovic L. Molecular Characterization of a Novel Bacteriocin and an Unusually Large Aggregation Factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a Natural Isolate from Homemade Cheese. *Curr Microbiol. Springer Science*, 55: 266–271.

M

Makhloufi K.M. (2012). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biochimie. France, 33.

Mami A., Boumehira A.Z., Hamedi A.R., Henni J.E., et Kihal M. (2012). Screening of autochthonous *Lactobacillus* species from Algerian raw goats' milk for the production of bacteriocin-like compounds against *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Biotechnology*, 11(20): 4595-4607.

Martinis E.C.D., Públio M.R., Santarosa P.R., et Freitas F.Z. (2001). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 32–37.

Matilla-Sandholm T., Mättö J., et Saarela M. (1999). LAB with health claiminteractions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy. J.*, 9: 25–35.

Merzouk Y. (2015). Optimisation des conditions de fermentations et de préservation du lait cru de chamelle par les bactéries lactiques adaptées aux conditions de stress. Thèse de Doctorat. Université d'Oran, 18-26.

Metchnikoff E. (1908). Prolongation of life: Optimistic studies. *William Heinema*, 161-183.

Midassirou B., Mahdhi A., Chaieb K., et Bakhrouf A. (2012). Recherche des bactéries lactiques et étude *in vitro* de leurs propriétés probiotiques. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*, 6 (2): 147-163.

O

Oh D.H., et Marshall D.L. (1993). Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 20: 239-246.

P

Parada J.L., Caron C.R., Bianchi P.A., Ricardo Soccol M., et Ricardo Soccol C. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification and use as Biopreservatives. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 50(3): 521-542.

Piard J., et Desmazeaud M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le Lait*, INRA Editions, 71 (5): 525-541.

Price R.J., et Lee J.S. (1970). Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing *Lactobacilli*. *J. Milk and Food Technol*, 33: 13-18.

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.

Renault P. (2002). Generally modified lactic acid bacteria: application to food or health and risk assessment. *Bioch*, 84: 1073-1087.

Rodgers S. (2001). Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. *Trend Food Sci. Technol*, 12: 276-284.

Rodríguez J.M., Martínez M.I., et Kok J. (2002). Pediocin PA-1, a Wide-Spectrum Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42 (2): 91-121.

S

Salminen S., Wreight A. V., et Ouwehand A. (2004). Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. *Marcel Dekker. Inc.*, U.S.A.

Sanders M.E., Kondo J.K., et Willrett D.L. (1991). Application of LAB. In: Goldberg, I., Williams, R. (Eds.), *Biotechnology and Food Ingredients*. Van Nostrand Reinhold, New York, 433–459.

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

Saxer S., Schwinniger S.M., et Lacroix C. (2013). Characterisation of the microflora of industrial Mexican cheeses produced without added chemical preservatives. *LWT-Food Science and Technology*, 53: 314-320.

Schleifer K.H., et Ludwig W. (1995). Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In: Wood B.J.B., et Holzappel W.H. (Eds.). *The lactic acid bacteria*, vol. 2: The Genera of Lactic.

Schillinger U., Geisen R., et Holzappel W.H. (1996). Potentel of antagonistic microoeganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Science and technology*, 7: 158-164.

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

Schnürer J., et Magnusson J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Food Sc. Technol*, 16: 70-78.

Settanni L., et Moschetti G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food microbiology*, 27: 691–697.

Siboukeur A. (2011). Etude de l'activité antibactérienne des bactériocines (type nisine) produites par *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, isolée à partir du lait camelin. Mémoire de Magister en Biologie. Université de Kasdi Merbah. Ouargla, 15.

Smaoui S., (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat. Génie de procédés et environnement. Toulouse, 47.

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

Stiles M.E., et Holzapfel W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol*, 36 (1): 1-29.

T

Tagg J.R., Dajani A.S., et Wannamaker L.W. (1976). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40(3): 722-756.

Todorov S.D., Van Reenen C.A., et Dickr L.M. (2004). Optimization of bacteriocin-production by *Lactobacillus plantarum* ST 13BR, a strain isolated from barely beer. *J. Gen Appl. Microbial*, 50: 149-157.

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.

Trias R. (2008). Lactic acid bacteria as bioprotective agents against foodborne pathogens and spoilage microorganisms in fresh fruits and vegetables. PhD thesis, University of Girona.

V

Vermeiren L., Devlieghere F., et Debever J. (2004). Evaluation of meat born lactic bacteria as protective culture for the biopreservation of cooked meat product. *Int. J. Food Microbiol*, 96(2): 149-164.

Z

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

Tableau I. Résultats de test de vérification de la pureté des souches lactiques.

Souches lactiques	La région	Code	Gram	Catalase	Aspect microscopique
Lb V 1	/	LC1	+	-	Cocci
Ad S:01	/	LC2	+	-	Cocci
PK7 S:03	/	LC3	+	-	Cocci
L'ben Lb Lc 4	/	LC4	+	-	Cocci
BL S: 02	/	LC5	+	-	Cocci
Bd S: 02	/	LB1	+	-	Bacille
Feraoun S:03	Feraoun	LC6	+	-	Cocci
Feraoun S:01	Feraoun	LB2	+	-	Bacille
LK S:03	/	LC7	+	-	Cocci
PK7 S:05	/	LC8	+	-	Cocci
Tichy S:04	Tichy	LC9	+	-	Cocci
Ras Alia S:02	Ras Alia	LC10	+	-	Cocci
Amiz S:D	Amizour	LC11	+	-	Cocci
PK7 S:03	/	LC12	+	-	Cocci
Amiz S:01	Amizour	LC13	+	-	Cocci
Kendira S:03	Kendira	LC14	+	-	Cocci
Amiz S:B	Amizour	LC15	+	-	Cocci
Toudja S:04	Toudja	LC16	+	-	Cocci
PK 7 S:04	/	LC17	+	-	Cocci

Tableau II. Diamètres des zones d'inhibition (test des spots).

Souches test	Souche cible					
	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia Coli</i>		
	Zone d'inhibition 1 en mm	Zone d'inhibition 2 en mm	moyenne en mm	Zone d'inhibition 1 en mm	Zone d'inhibition 2 en mm	moyenne en mm
LC1	16	24	20	20	24	22
LC2	28	24	26	32	40	36
LC3	38	30	34	16	24	20
LC4	38	30	34	24	28	26
LC5	34	30	32	18	30	24
LB1	22	18	20	26	36	31
LC6	22	26	24	22	22	22
LB2	20	22	21	20	26	23
LC7	26	20	23	28	30	29
LC8	30	24	27	32	28	30
LC9	16	20	18	22	28	25
LC10	20	30	25	28	24	26
LC11	20	28	24	22	28	25
LC12	18	22	20	22	24	23
LC13	24	20	22	22	24	23
LC14	14	20	17	30	26	28
LC15	20	30	25	38	32	35
LC16	20	20	20	32	30	31
LC17	24	30	23	38	34	36

Tableau III. Diamètres des zones d'inhibition vis-à-vis *Staphylococcus aureus* (test des puits).

Souche test	Souche cible : <i>Staphylococcus aureus</i>			
	Zone d'inhibition 1 en mm (pH non neutralisé)	Zone d'inhibition 2 en mm (pH non neutralisé)	La moyenne (zone d'inhibition en mm)	zone d'inhibition en mm (pH neutralisé)
LC1	12	12	12	18
LC2	12	08	10	12
LC3	14	12	13	14
LC4	16	20	18	16
LC5	18	18	18	20
LB1	14	12	13	16
LC6	16	16	16	18
LB2	18	14	16	16
LC7	18	20	19	20
LC8	28	26	27	26
LC9	30	34	32	34
LC10	24	26	25	38
LC11	22	24	23	36
LC12	26	26	26	24
LC13	20	20	20	22
LC14	22	22	22	26
LC15	22	26	24	20
LC16	24	22	23	30
LC17	20	22	21	26

Tableau IV. Diamètres des zones d'inhibition vis-à-vis *Escherichia coli* (test des puits).

Souche test	Souche cible : <i>Escherichia coli</i>		
	Zone d'inhibition 1 en mm (pH non neutralisé)	Zone d'inhibition 2 en mm (pH non neutralisé)	La moyenne (zone d'inhibition en mm)
LC1	20	22	21
LC2	10	10	10
LC3	16	16	16
LC4	12	16	14
LC5	18	16	17
LB1	14	14	14
LC6	20	16	18
LB2	16	18	17
LC7	14	14	14
LC8	20	20	20
LC9	20	24	22
LC10	32	30	31
LC11	26	28	27
LC12	16	22	19
LC13	18	22	20
LC14	16	20	23
LC15	20	18	19
LC16	22	16	19
LC17	24	24	24

Tableau V. Diamètres des zones d'inhibition avec combinaison des souches sélectionnées (test des puits).

Souches combinées	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	Zone d'inhibition 1 en mm	Zone d'inhibition 2 en mm	Moyenne mm	Zone d'inhibition 1 en mm	Zone d'inhibition 2 en mm	Moyenne en mm
LC4 + LB1	42	40	41	40	40	40
LC4 + LB2	38	36	37	36	42	39
LC4 + LC16	32	36	34	40	44	42
LB1 + LB2	36	30	33	40	40	40
LB1 + LC16	32	32	32	34	38	36
LB2 + LC16	26	30	28	36	38	37

Tableau VI. Diamètres des zones d'inhibition avec les milieux optimisés.

Paramètre	Souche test	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
		Zone d'inhibition 1 en mm	Zone d'inhibition 2 en mm	Moyenne en mm	Zone d'inhibition 1 en mm	Zone d'inhibition 2 en mm	Moyenne en mm
pH 9.2	LC1	16	30	23	20	24	22
	LB1	18	22	20	20	18	19
	LB2	18	26	22	14	30	22
	LC16	22	20	21	12	18	15
pH 7	LC4	18	12	15	24	28	26
	LB1	26	26	26	30	34	32
	LB2	16	18	17	16	24	20
	LC16	28	30	29	24	30	27
pH 6	LC4	18	20	19	24	26	25
	LB1	22	28	35	30	32	31
	LB2	20	20	20	32	26	29
	LC16	28	24	26	26	20	23
pH 5	LC4	20	24	22	20	16	18
	LB1	22	18	20	22	24	23
	LB2	18	24	21	26	34	30
	LC16	24	18	26	26	16	21
45°C	LC4	0	0	0	0	0	0
	LB1	0	0	0	0	0	0
	LB2	0	0	0	0	0	0
	LC16	0	0	0	0	0	0
30°C	LC4	28	28	28	32	30	31
	LB1	30	32	31	34	36	35
	LB2	28	26	27	32	34	33
	LC16	32	30	31	30	36	33
25°C	LC4	28	30	29	42	36	39
	LB1	26	28	27	44	36	40
	LB2	28	20	24	42	36	40
	LC16	28	24	26	28	32	30
MRS sans glucose et sans extrait de viande	LC4	0	0	0	0	0	0
	LB1	0	0	0	0	0	0
	LB2	0	0	0	0	0	0
	LC16	0	0	0	0	0	0
MRS avec fructose	LC4	18	18	18	18	22	20
	LB1	10	8	9	18	14	16
	LB2	16	20	18	16	12	14
	LC16	12	18	15	16	14	15

Tableau X. pH non neutralisé et pH neutralisé des souches lactiques.

Souche lactique	Valeurs du pH non neutralisé	Valeurs du pH neutralisé
LC1	4,66	6,9
LC2	4,36	6,9
LC3	4,72	6,8
LC4	4,43	7,02
LC5	4,42	6,8
LB1	4,3	6,92
LC6	4,8	6,9
LB2	4,45	7
LC7	4,7	6,8
LC8	4,45	6,9
LC9	4,74	6,89
LC10	4,29	6,85
LC11	4,51	6,86
LC12	4,62	6,86
LC13	4,38	6,72
LC14	4,8	6,86
LC15	4,22	6,89
LC16	4,25	6,8
LC17	4,37	6,91

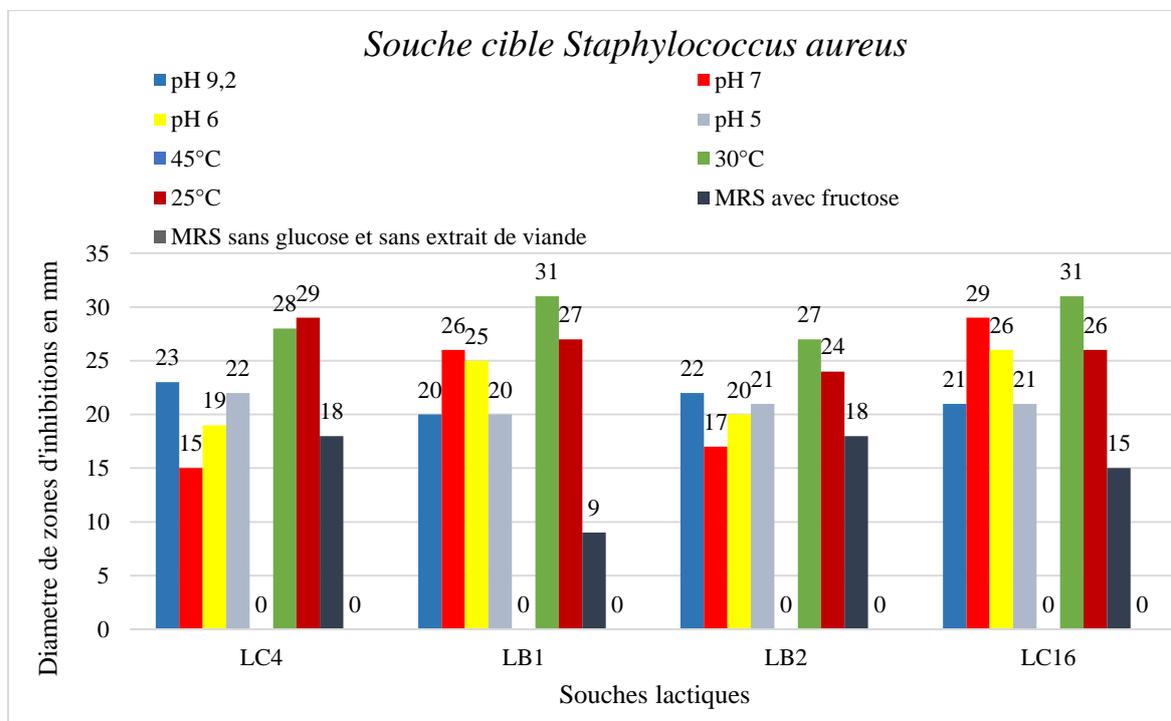


Figure 1. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard de *Staphylococcus aureus*.

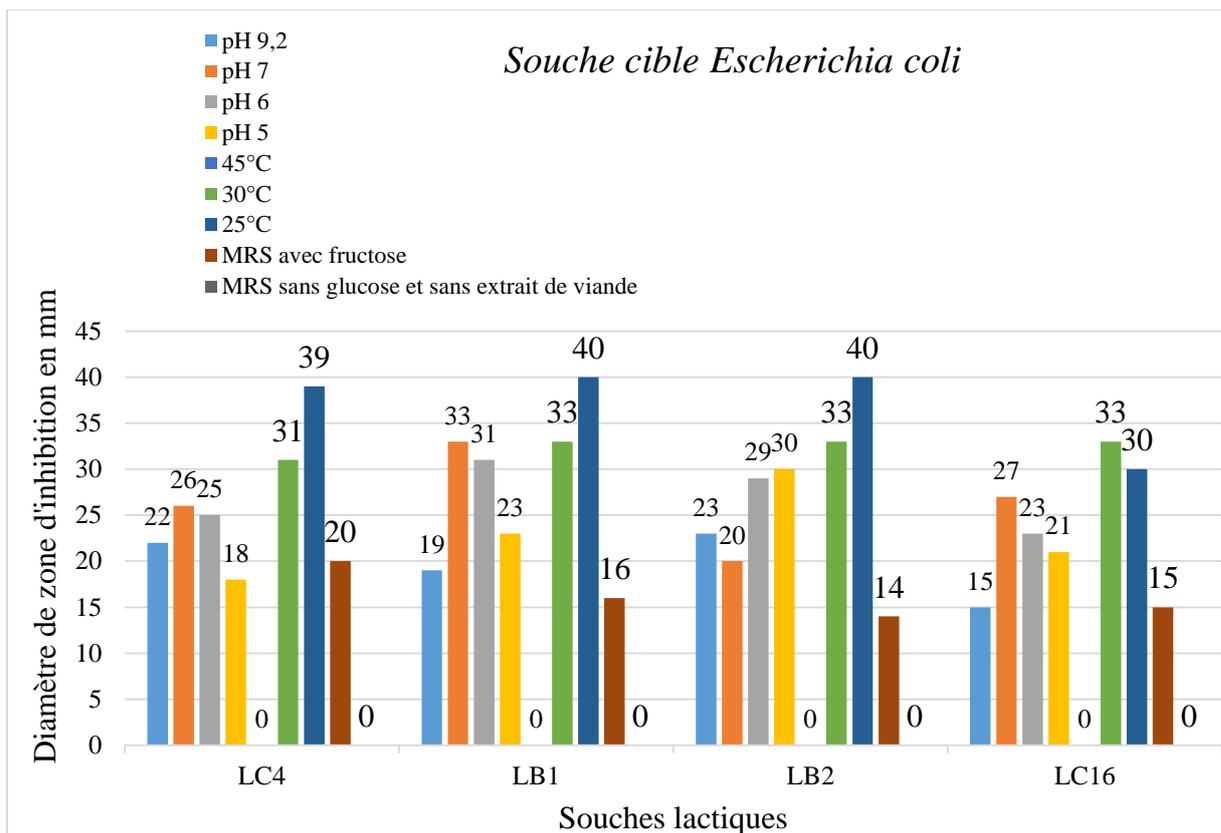


Figure 2. Optimisation de l'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard d'*Escherichia coli*.

Composition des milieux**Tableau VII.** Gélose et bouillon MRS (De Man, Rogosa et Sharpe) (Biokar).

Composition	Quantité en g/l
Peptone	10,00
Extrait de viande	10,00
Extrait autolytique de levure	5,00
Glucose	20,00
Tween 80	1,08 ml
Phosphate dipotassique	2,00
Acétate de sodium	5,00
Citrate d'ammonium	2,00
Sulfate de magnésium	0,20
Sulfate de manganèse	0,05
Agar (pour la gélose)	15,00
Eau distillée	QSP 1 litre
pH final	6,5
Autoclavage	120°C /20 min

Tableau VIII. Gélose et bouillon nutritif (Biokar).

Composition	Quantité en g/l
Extrait de viande	1,00
Extrait de levure	2,00
Peptone	5,00
NaCl	5,00
Agar (pour la gélose)	15,00
Eau distillée	QSP1 litre
pH final	7,2
Autoclavage	120°C /20 min

Tableau IX. Milieu Mueller Hinton (MH) (Biokar).

Composition	Quantité en g/l
Extrait de viande	2,00
Hydrolysate acide de caséine	17,50
Amidon	1,50
NaCl	5,00
Agar	10,00
Eau distillée	QSP 1 litre
pH final	7,2
Autoclavage	120°C /20 min

Résumé

Les substances antibactériennes produites par les bactéries lactiques ont été utilisées comme un moyen de conservation des aliments et de leur qualité. Les dix-neuf souches lactiques isolées à partir des produits laitiers présentent une activité antibactérienne importante à l'égard de deux souches de bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) dans les deux tests spots et puits, ce dernier est fait par les surnageants natifs et neutralisés. Ce travail a pour but d'évaluer le pouvoir antibactérien de ces souches testées, un test de l'optimisation a été fait à différentes conditions (température, pH et sources de carbone), les résultats obtenus de cette optimisation ont révélé que toutes les souches testés ont montré une activité importante à toutes les conditions testées. Par contre elles ne présentent pas aucune activité lorsqu'elles sont incubées à 45°C, et en absence de glucose et de l'extrait de viande dans le milieu de culture.

Mots clés : bactéries lactiques, bactéries pathogènes, pouvoir antibactérien, optimisation.

Abstract

Antibacterial substances produced by lactic acid bacteria have been used as a means of preserving foods and their quality. The nineteen lactic acid strains isolated from dairy products show significant antibacterial activity against two strains of pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) in both spot and well tests, the latter being done by native supernatants and neutralized. This work aims to evaluate the antibacterial power of these strains tested, a test of the optimization was done under different conditions (temperature, pH and carbon sources), the results obtained from this optimization revealed that all the strains tested showed significant activity at all tested conditions. By cons they do not exhibit any activity when incubated at 45 ° C, and in the absence of glucose and meat extract in the culture medium.

Key words: lactic acid bacteria, pathogenic bacteria, antibacterial potency, optimization.

المخلص

يتم استخدام المواد المضادة للبكتيريا التي تنتجها بكتيريا حمض اللاكتيك كوسيلة للحفاظ على الأطعمة ونوعيتها. أظهرت السلالات الـ 19 من بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من منتجات الألبان نشاطاً مضاداً للجراثيم ضد سلالتين من في كل من اختبارات البقعة (*Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli*) البكتيريا المسببة للأمراض والأبار. يتم الحفاظ على هذا النشاط بعد تحييد المواد الطافية. تم إجراء اختبار تحسين في ظروف نمو مختلفة (درجة الحرارة، ودرجة الحموضة ومصادر الكربون)، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من هذا التحسين أن جميع سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك أظهرت نشاط كبير ضد للجراثيم في معظم الظروف المتنامية الأمثل. في حين، انها لا تظهر أي نشاط عند احتضانها في 45 درجة مئوية، وفي غياب الجلوكوز ومستخلص اللحم في وسط الزرع.

الكلمات الرئيسية: بكتيريا حمض اللاكتيك، والبكتيريا المسببة للأمراض، القوة المضادة للبكتيريا، تحسين ظروف النشاط المضاد للبكتيريا.