

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie Alimentaire et santé



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

MASTER

Thème

**Etude de l'activité antibactérienne de souches
de bactéries lactiques isolées de quelques
produits laitiers fabriqués artisanalement**

Présenté par :

Hamache Naima & Sylla Mariama

Soutenu le : **16 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

M^{me} BENACHOUR K.

MAA

Présidente

M^{me} TETILI F.

MAA

Encadreur

Mr BENDJEDDOU K.

MCA

Examineur

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

On remercie tout d'abord le bon Dieu pour sa bonne Grace.

On adresse nos sincères remerciements à nos familles SYLLA et
Hamache;

Nos sincères remerciements et reconnaissance à notre promotrice M^{me}
Tetili Fatiha enseignante à l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia
pour son soutien, sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements
durant la réalisation de ce travail.

On tient à remercier M^{me} Benachour qui nous a fait un immense
honneur de présider le jury ainsi que Mr Bendjeddou d'avoir accepté
d'examiner ce travail.

On remercie également tous les enseignants du département de
Microbiologie.

Nos tendres remerciements à tous les techniciens du laboratoire de
microbiologie, de biochimie, d'environnement et des sciences
alimentaires pour leur présence et leur aide. Ainsi qu'à toute personne
ayant contribué à la réalisation de ce travail.

En fin, on remercie toute la promotion 2016 de Microbiologie
Alimentaire et Santé pour les arrangements et aides.

Mariama et Naima

Dédicace

Je dédie ce travail :

- ❖ A la mémoire de mes parents
- ❖ A mon grand-père DOUMBIA Mamady
- ❖ A ma grand-mère
- ❖ A toute ma famille
- ❖ Et à toutes les bonnes personnes ayant croisés mon chemin.

Mariama

Dédicace

Au nom d'Allah, le clément, le miséricordieux,

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont très chers :

A mes chers parents qui ont toujours été là pour moi, présents dans chaque instant, prêts à m'offrir l'amour, le soutien, le courage et les conseils dont j'ai besoin. Que Dieu les garde toujours près de nous en bonne santé.

A mes deux frères Nacer et Zahir et leurs épouses Nadia et Noura.

A mes chères sœurs Nassima et Malika et leurs époux Rabah et Amar que je considère comme un troisième frère pour moi.

A ma petite chère sœur et amie Celia.

A toutes mes amies, en particuliers Lila, Linda et Lydia.

Je dédie ce travail également à tous mes enseignants depuis l'école primaire, eux qui ont illuminé notre chemin par le savoir.

Et en fin je le dédie à ma binôme Mariama et à toute la promotion de Microbiologie de 2016. Auxquels je souhaite plus de réussite.

Naima

Liste des abréviations

- µg : Microgramme.
- ADN : Acide désoxyribonucléique.
- AGL : Acide gras libre.
- ARNr 16S : Acide ribonucleique ribosomique 16S.
- ATP : Adénosine triphosphate.
- BN : Bouillon nutritif.
- BL : Bactéries lactiques.
- C : Carbone.
- CM : Culture mixte.
- CO₂ : Dioxyde de carbone.
- DAEC : Diffusely adherent *E.coli*.
- E.coli* : *Escherichia coli*.
- EAEC : Enteroaggregative *E.coli*.
- EHEC : Enterohaemorrhagic *E.coli*.
- EIEC : Enteroinvasive *E.coli*.
- EMB : Gélose éosine méthylène bleu.
- EPEC : Enteropathogenic *E.coli*.
- ETEC : Enterotoxigenic *E.coli*.
- GN : Gélose nutritive
- GRAS : Generally Recognized As Safe.
- H⁺ : Hydrogène.
- H₂O : Eau.
- H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.
- kDa : Kilo Dalton.
- Lb : *Lactobacillus*.
- Lc : *Lactococcus*.
- Log : Logarithme (décimal).
- MH : Mueller Hinton.
- MRS : Man Rogosa Sharp.
- N : Normal.
- NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide hydrique.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

O₂ : Dioxygène.

OH : Hydroxyde d'hydrogène.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

pKa : Constante d'acidité ka

ppm : Partie par millième.

Ps : *Pseudomonas*.

S : Souche.

S.aureus : *Staphylococcus aureus*.

sp : Species (Espèce).

spp : Species (Espèces).

St : *Streptococcus*.

Subsp : Subspecies (Sous-espece).

UFC : Unité formant colonie.

VRBG : Violet red bile glucose.

ZI : Zone d'inhibition.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Consensus dendrogramme reflétant les relations phylogénétiques de l'ordre "Lactobacillales" dans la classe "Bacilli".	4
2	Le mode d'action des acides organiques par acidification du cytoplasme des microorganismes cibles.	5
3	Mode d'action de la nisine (Lantibiotique de classe IIa).	10
4	Isolement et purification des souches de bactéries lactiques.	14
5	Standardisation des inocula des bactéries lactiques et pathogènes.	17
6	Etapes de réalisation du test des spots.	19
7	Etapes de réalisation du test des puits.	22
8	Schéma illustrant les étapes suivies pour la réalisation du test d'antagonisme dans le lait.	24
9	Aspect des bactéries lactiques sur milieu MRS.	25
10	Aspect microscopique d'une souche de bactéries lactiques sous microscope optique.	25
11	Aspect macroscopique des souches de bactéries pathogènes.	26
12	Diamètre des zones d'inhibition (mm) obtenues par le test des spots à l'égard de St2 et St5.	27
13	Exemple de résultats obtenus par le test de spots à l'égard de St2 et St5.	27
14	Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des spots à l'égard de <i>E.coli</i> Z, B et I.	28
15	Exemple de résultats obtenus par le test des spots à l'égard des souches d' <i>E.coli</i> .	28
16	Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des spots à l'égard de PsM et PsG.	29
17	Exemple de résultats obtenus par le test des spots à l'égard de PsM et PsG.	29
18	Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits avec les surnageants natifs à l'égard de St2 et St5.	30
19	Exemple de résultats obtenus par le test de puits à l'égard de St2 et St5 avec des surnageants natifs.	31
20	Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits avec les surnageants natifs à l'égard de <i>E.coli</i> B, Z et I.	31
21	Exemple de résultats obtenus par le test des puits avec les surnageants natifs à l'égard d' <i>E.coli</i> B, Z et I.	32
22	Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de PsG et PsM avec les surnageants natifs.	32
23	Exemple de résultats obtenus par le test des puits avec les surnageants natifs à l'égard de PsG et PsM.	33
24	Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de St5, PsM, PsG et <i>E.coli</i> Z avec les surnageants neutralisés.	34
25	Exemple de résultats obtenus par le test des puits avec les surnageants neutralisés.	34

26	Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de PsM avec les surnageants traités aux protéases.	35
27	Exemple de résultats obtenus par les surnageants traité aux protéases à l'égard de PsM.	35
28	Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de St5 avec les surnageants traités aux protéases.	36
29	Exemple de résultats obtenus avec les surnageants traité aux protéases à l'égard de St5.	36
30	Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de PsM avec les surnageants traités thermiquement.	37
31	Exemple de résultats obtenus par les surnageants traité thermiquement à l'égard de PsM.	37
32	Exemple de résultats obtenus avec les surnageants traité thermiquement sur St5.	38
33	Cinétique de croissance de St5 en culture mixte avec S4 et en culture pure dans le lait écrémé.	40

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des bactériocines	09
Tableau II : Origine des souches de bactéries lactiques utilisées	12
Tableau III : Les souches cibles utilisées et leur origine	15
Tableau IV : Résultats de la standardisation des bactéries lactiques et pathogènes	26

Liste des tableaux en annexes

Annexe I. Résultats

Tableau I : Test de spots à l'égard de St5.

Tableau II : Test des spots à l'égard de St2.

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

Tableau IV : Test des spots à l'égard de *Pseudomonas*.

Tableau V : Test des puits avec le surnageant natif à l'égard d'*E coli* I.

Tableau VI : Test des puits avec le surnageant natif à l'égard de St5.

Tableau VII : Test des puits avec le surnageant natif à l'égard de St2.

Tableau VIII : Test des puits avec surnageant natif sur *E.coli* B, I et Z.

Tableau IX : Test des puits avec surnageant natif sur PsM et PsG.

Tableau X : Test des puits avec le surnageant neutralisé.

Tableau XI : Test des puits avec surnageant traité à l'égard de PsM.

Tableau XII : Test des puits avec surnageant traité à l'égard de St5.

Tableau XIII : Tableau comparatif des résultats obtenus avec le test des puits à l'égard de *E.coli* Z, PsG, St5 et PsM.

Tableau XIV : Cinétique de croissance de St5 en culture pure (Log N (UFC/mL)).

Tableau XV : Cinétique de croissance de St5 en culture mixte avec S4 (Log N (UFC/mL)).

Annexe II. Composition des milieux de culture utilisés.

Sommaire

Introduction	01
--------------------	----

Partie I : Synthèse bibliographique

I. Définition et caractéristiques générales des bactéries lactiques	03
II. Taxonomie et classification	03
III. Propriétés antimicrobiennes	04
III. 1. Acides organiques	05
III. 2. Acides gras	06
III. 3. Peroxyde d'hydrogène	06
III. 4. Dioxyde de carbone (CO ₂)	07
III. 5. Diacétyle	07
III. 6. Acétaldéhyde	08
III. 7. Reutéline	08
III. 8. Bactériocines	08
III. 8. 1. Définition des bactériocines	08
III. 8. 2. Classification des bactériocines	09
III. 8. 3. Mode d'action des bactériocines	10
III. 8. 4. Intérêt des bactéries lactiques dans les produits laitiers	11

Partie II : Partie pratique

Matériel et méthodes

I. Origine des souches utilisées	12
I. 1. Souches test	12
I. 2. Isolement et purification des souches de Bactéries lactiques	13

I. 3. Souches cibles	15
II. Revivification et vérification de la pureté des souches conservées	15
III. Standardisation des inocula bactériens	16
IV. Etude de l'activité antibactérienne des souches lactiques	18
IV. 1. Méthode de double couche (méthode de Fleming et <i>al.</i> , 1975)	18
IV. 2. Méthode des puits (méthode de Barfoot et Klaenhammer, 1983)	20
IV. 2. 1. Cas du surnageant natif	20
IV. 2. 2. Cas du surnageant neutralisé	21
IV. 2. 3. Cas du surnageant traité	21
IV. 3. Test d'antagonisme dans le lait	23
Résultats et discussion	
I. Caractéristiques des isolats	25
I.1. Bactéries lactiques	25
I.1.1. Sur milieu solides et liquide	25
I.1.2. Caractères microscopiques	25
I.2. Souches pathogènes	26
II. Résultats de la standardisation des inocula	26
III. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des spots	27
III.1. Test des spots à l'égard de <i>S.aureus</i>	27
III.2. Test des spots à l'égard d' <i>E.coli</i>	28
III.3. Test des spots à l'égard de <i>Pseudomonas</i>	29
IV. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des puits	30
IV.1. Cas du surnagent natif	30
IV.1.1. Test des puits à l'égard de <i>S.aureus</i>	30
IV.1.2. Test des puits à l'égard de <i>E.coli</i>	31
IV.1.3. Test des puits à l'égard de <i>Pseudomonas</i>	32
IV.2. Cas du surnageant neutralisé	33
IV.3. Cas du surnageant traité	34
IV.3.1 Traitement enzymatique	35
IV.3.2 Traitement thermique	36

V. Antagonisme dans le lait écrémé	39
Conclusion	41
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Introduction

Au cours des dernières années, un intérêt croissant pour l'utilisation des bactéries lactiques a été observé pour leurs propriétés probiotiques et antimicrobiennes dans les industries alimentaires.

Les produits laitiers sont généralement contaminés par des pathogènes comme *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas*. Leur présence peut être à l'origine d'intoxications alimentaires et de toxi-infections plus ou moins sévères. Certaines souches appartenant principalement à l'espèce *Staphylococcus aureus* produisent des entérotoxines dont l'ingestion provoque une toxi-infection alimentaire (**Le Loir et Gantier, 2009**). Elle constitue la bactérie la plus fréquente impliquée dans les infections latentes et les mammites subcliniques chroniques qui sont très difficiles à éradiquer et qui représentent aussi la principale source de contamination des laits cru par *S.aureus* (**Brisabois et al., 1997**). Certains pathovares d'*E.coli* (ETEC, EHEC, EPEC, EIEC, EAEC et DAEC) sont aussi responsables de diarrhée sévère suite à une ingestion (**Le Bouguéneq et Servin, 2006 ; Zagorec et Christieans, 2013**). Quant aux *Pseudomonas*, ils posent un réel problème dans les produits laitiers réfrigérés et leurs protéases (thermorésistantes) posent d'immenses problèmes dans le lait UHT (**Zagorec et Christieans, 2013**).

Il est donc nécessaire d'assainir biologiquement les produits alimentaires et surtout laitiers par l'ajout de souches lactiques ou de leur bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**) dotées de pouvoir antibactérien ou plus particulièrement de pouvoir bactériocinogène. Leur utilisation dans l'industrie alimentaire peut aider à réduire l'addition de conservateurs chimiques qui ont des effets néfastes à long terme (risque de cancer), ainsi que l'intensité du traitement thermique, ce qui permet d'avoir des aliments naturellement préservés et plus riches dans les propriétés organoleptiques et nutritionnelles (**Galvez et al., 2007**).

Notre étude a donc pour but la sélection de bactéries lactiques dotées de pouvoir antibactérien à l'égard de ces pathogènes quotidiens des produits laitiers. Pour cela nous avons opté pour la méthodologie suivante :

- Collecte des échantillons de Lben
- Isolement de bactéries lactiques et pathogènes
- Réalisation de test d'antagonisme

Notre travail est divisé en deux grandes parties :

- une partie théorique comportant les définitions, les caractéristiques et propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques et leurs intérêts dans les produits laitiers et,
- une partie pratique où les différents tests et les résultats sont présentés.

Synthèse bibliographique

I. Définition et caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (Dellaglio et al., 1994), décrites pour la première fois par ORLA-JENSEN (1919). Elles représentent un groupe hétérogène de micro-organismes à Gram positif et à catalase négative. Elles sont anaérobies ou aérotolérantes, généralement immobiles, asporulées, dépourvues de cytochrome oxydase, de nitrate réductase (Pilet et al., 2005), de forme variant d'un long et mince bâtonnet parfois courbé à court coccobacille souvent coryneforme ou sphérique, exigeantes en facteurs de croissance : acides aminés, bases nucléiques, acides gras, peptides, sels, vitamines, ... (Schleifer, 2009).

Ces bactéries ont la capacité de produire de l'acide lactique comme produit principal à partir des sucres par un métabolisme exclusivement fermentaire. Selon ce métabolisme, les bactéries sont dites homofermentaires si elles produisent que de l'acide lactique, ou bactéries hétérofermentaires si la fermentation abouti à la formation d'autres composés : éthanol, CO₂ et autres acides organiques (Pilet et al., 2005 ; Topisirovic et al., 2007).

Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se voient attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Recognized As Safe). Cependant, quelques membres du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* ainsi que d'autres bactéries lactiques sont considérés comme pathogènes opportunistes (Drouault et Corthier, 2001).

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et dans le tractus digestif (Drouault et Corthier, 2001).

II. Taxonomie et classification

Les bactéries lactiques appartiennent au phylum des Firmicutes, à la classe des Bacilli et à l'ordre des Lactobacillales (De Vos et al., 2009). Cet ordre comporte 33 genres repartis entre six familles qui sont : *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae* classées en se basant sur les analyses phylogénétiques des séquences de l'ARNr 16S (Ludwig et al., 2009). La figure suivante, représente la répartition des différents genres et familles de l'ordre des Lactobacillales.

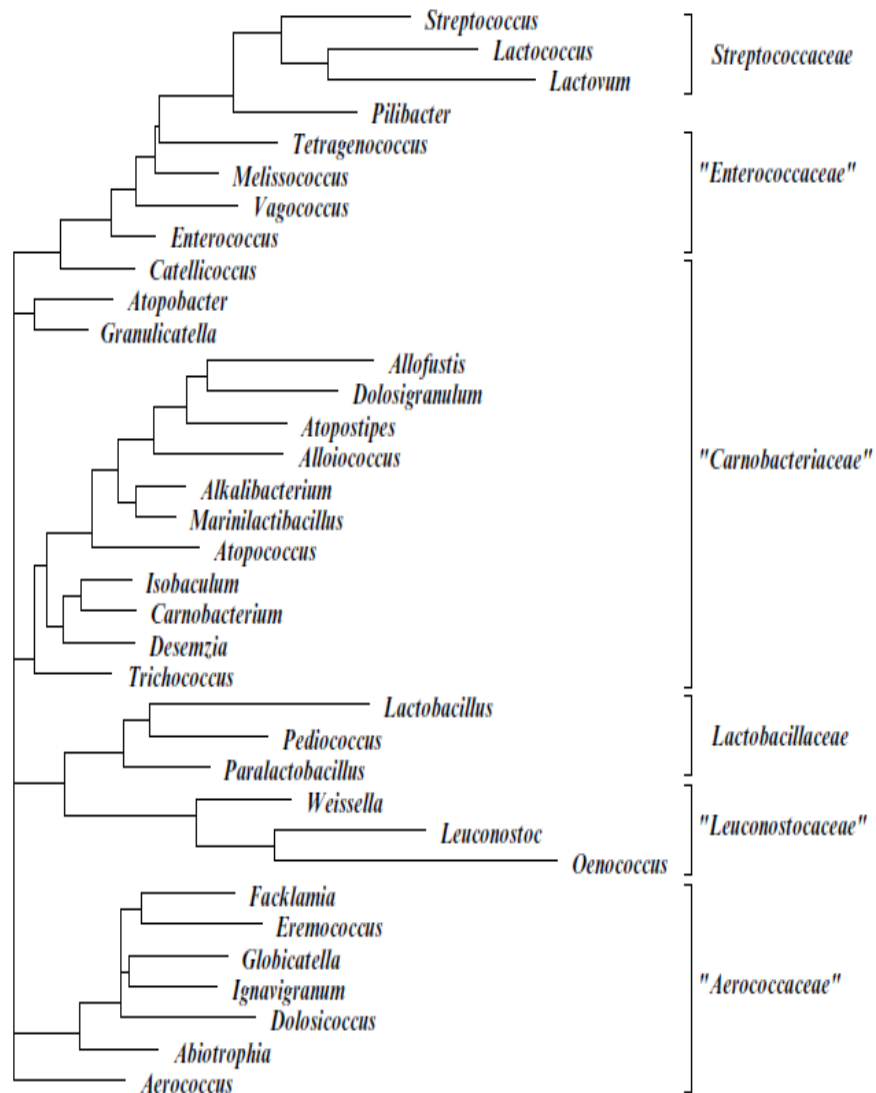


Figure 1 : Consensus dendrogramme reflétant les relations phylogénétiques de l'ordre "Lactobacillales" dans la classe "Bacilli" (Ludwig et al., 2009).

III. Propriétés antimicrobiennes

Les bactéries lactiques dominent certains aliments en inhibant la croissance des bactéries concurrentes, y compris la flore d'altération d'origine alimentaire et les bactéries pathogènes (Guessas et al., 2007). Cette inhibition est exercée par la synthèse de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacetyl, les acides gras, l'acétaldéhyde, la reutérine et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens sont exploités pour améliorer la conservation des aliments (Titiek et al., 1996 ; Dortu et Thonart, 2009).

III. 1. Acides organiques

L'acide lactique est le principal métabolite des bactéries lactiques provoquant l'abaissement du pH qui inhibe de nombreux microorganismes (Schnurer et Magnusson, 2005). La forme non dissociée, lipophile 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), (Figure 2). En plus de l'effet du pH, l'acide non dissocié fait chuter le gradient électrochimique de protons, entraînant la bactériolyse et finalement la mort des bactéries sensibles (Schnurer et Magnusson, 2005).

Les bactéries lactiques hétérofermentaires produisent des quantités notables d'acides organiques autres que l'acide lactique. Les *Leuconostocs* et les lactobacilles hétérofermentaires produisent autant d'acétate que de lactate, un acide qui est connu pour avoir une action inhibitrice forte contre la plupart des microorganismes (Beliardo et Thuault, 1989).

Les bactéries lactiques hétérofermentaires peuvent également produire de l'acide propionique mais seulement en quantités infimes. Les deux acides acétiques et propioniques ont des pKa plus élevés que l'acide lactique et ont donc une plus forte proportion d'acide non dissocié à un certain pH, semblable à l'acide lactique. Ils interagissent avec les membranes cellulaires pour neutraliser le gradient électrochimique de protons, mais leur effet est souvent dépendant de la diminution du pH causée par l'acide lactique. Ils empêchent également l'assimilation d'acides aminés (Schnurer et Magnusson, 2005). L'acide propionique est un fongicide et bactéricide alimentaire (Al-Daihan et Shafi Bhat, 2015). Il réduit la croissance fongique en affectant leur membrane à des pH inférieur à 4,5 (Hunter et Segel, 1973). Des effets synergiques peuvent avoir lieu quant à l'action inhibitrice, en présence de mélange : d'acides acétique et lactique, une synergie observée à l'encontre de *Salmonella Thyphirium* (Beliardo et Thuault, 1989), et des trois acides lactiques, acétique et propionique à l'encontre des levures (Moon, 1983).

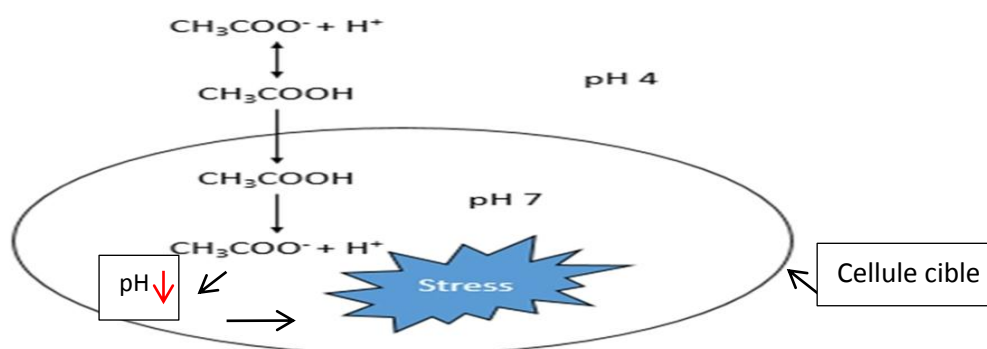


Figure 2 : Le mode d'action des acides organiques par acidification du cytoplasme des microorganismes cibles (d'après Beales, 2004).

III. 2. Acides gras

Les bactéries lactiques lipolytiques peuvent produire des quantités significatives d'acides gras antimicrobiens (**Schnurer et Magnusson, 2005**). L'activité antimicrobienne des acides gras a été identifiée pendant plusieurs années. Les acides gras insaturés présentent une activité contre les bactéries à Gram+, et une activité antifongique qui dépend de la composition, de la concentration, et du pH du milieu (**Yang, 2000**). Un certain nombre d'acides gras libres (AGL) sont connus pour leur activité antibactérienne et antivirale puissante. Il est indiqué que l'activité bactéricide est associée aux AGL et esters de monoacylglycérol, en particulier les composés ayant 12 atomes de carbone, et touche les bactéries Gram positives plus que les bactéries Gram négatives (**Petschow et al., 1996**). L'activité anti-*Listeria* des acides gras et des monoglycérides a été préalablement documentée. Leur activité antimicrobienne contre les micro-organismes d'altération a également été rapportée (**Nobmann et al., 2009 ; Parsons et al., 2012**).

Wolford (1975) a observé que l'activité antimicrobienne augmente avec la longueur de la chaîne des acides gras. Kabra (1983) a constaté que les acides gras avec 12 à 16 atomes de carbone sont les plus efficaces (**Schnurer et Magnusson, 2005**).

III. 3. Peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques possèdent deux types d'oxydases à NADH. Ces enzymes catalysent la réduction d'O₂ en H₂O₂ ou d'O₂ en H₂O (**Savadogo et Traore, 2011**). L'intervention du peroxyde d'hydrogène comme agent majeur dans les phénomènes d'inhibition par les bactéries lactiques est connu depuis longtemps (**Mami et al., 2010**). En 1951, Wheeler et al., mettaient en évidence l'inhibition de *S.aureus* par *Lb.lactis* et ils ont montré dès 1952 que l'agent inhibiteur est le peroxyde d'hydrogène produit par le lactobacille (**Beliardo et Thuault, 1989**). Depuis cette date, il a été montré que de nombreuses souches de bactéries lactiques peuvent libérer du peroxyde d'hydrogène à des concentrations suffisantes pour inhiber des contaminants de leur environnement (**Beliardo et Thuault, 1989**). Il a été rapporté que la production de H₂O₂ par les souches *Lb* et *Lc* inhibent *S.aureus*, *Pseudomonas sp.* et divers micro-organismes psychrotrophes dans les aliments (**Yang, 2000**). L'effet antimicrobien de H₂O₂ peut résulter de l'oxydation des groupes sulfhydryle provoquant la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes et de la peroxydation des lipides de la membrane, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane. Le H₂O₂ peut également être un

précurseur pour la production de radicaux libres bactéricides tels que le superoxyde (O_2) et l'hydroxyle (OH), qui peuvent endommager l'ADN (**Ammor et al., 2006**).

Ananthaswamy et Eisenstark (1977) ont démontré la modification de l'ADN par le peroxyde d'hydrogène, en montrant que les mutants *E. coli* dépourvus de systèmes de réparation d'ADN étaient plus sensibles à l' H_2O_2 que les souches avec les systèmes de réparation intacts. Le peroxyde d'hydrogène provoque apparemment des ruptures dans le squelette carbonphosphate de l'ADN, libérant les nucléotides et empêchant la réplication du chromosome (**Piard et Desmazeaud, 1991**).

III. 4. Dioxyde de carbone (CO_2)

Le dioxyde de carbone est produit principalement par voie hétérofermentaire. Le mécanisme précis de ses propriétés antimicrobiennes est encore inconnu. Cependant, le CO_2 peut jouer un rôle dans la création d'un environnement anaérobie qui inhibe la décarboxylation enzymatique, et l'accumulation de CO_2 dans la bicouche lipidique de la membrane peut provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Ammor et al., 2006**). Le CO_2 peut inhiber efficacement la croissance de nombreux micro-organismes responsables de la détérioration des aliments, en particulier les bactéries Gram négatives psychrotrophes. Le degré d'inhibition par le CO_2 varie considérablement entre les organismes. Le CO_2 à 10% pourrait réduire les charges bactériennes de 50%, et à 20-50%, il a une forte activité antifongique (**Yang, 2000**).

III. 5. Diacétyle

Le diacétyle est un produit aromatique produit par des souches appartenant à tous les genres des bactéries lactiques par la fermentation du citrate (**Ammor et al., 2006**). L'effet antimicrobien du diacétyle est noté par Lemoigne en 1927 (**Jay, 1982**). Il est nettement plus efficace contre les bactéries Gram négatives (inhibées à 200 $\mu g / mL$) et les levures que contre les bactéries Gram positives (inhibées à 300 $\mu g / mL$). A 344 $\mu g / mL$, le diacétyle inhibe les souches de *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia coli* et *Aeromonas* (**Yang 2000 ; Ammor et al., 2006**).

III. 6. Acétaldéhyde

Les bactéries lactiques sont capables de produire de l'acétaldéhyde à partir du glucose (**Devoyod et Poullain, 1988**). Chez *Lb. 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*, de *Salmonella typhimurium* et d'*E.coli* dans les produits laitiers (**Piard et Desmazeaud, 1991**).

III. 7. Reutéline

Lactobacillus reuteri, une espèce de bactéries lactiques dont la niche écologique est le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux, convertit le glycérol en une substance antimicrobienne appelée reutéline (**Axelsson et al., 1989**) dans des conditions d'anaérobiose (**Ganzle et al., 2000**). La reutéline est un agent antimicrobien puissant à faible poids moléculaire, neutre et soluble dans l'eau (**Axelsson et al., 1989**), résistant aux enzymes protéolytiques et lipolytiques et stable dans une large gamme de pH (**Montiel et al., 2014**). La reutéline est active contre les bactéries à Gram positif et négatif, ainsi que les levures, les moisissures et les protozoaires (**Cleusix et al., 2007**). Les microorganismes d'altération comprenant les espèces de *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida*, et *Trypanosoma* sont aussi sensibles à la reutéline (**Yang, 2000**).

III. 8. Bactériocines

III. 8. 1. Définition des bactériocines

Un grand nombre de bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ont en commun la caractéristique de produire au cours de leur croissance, des substances à structure protéique (protéines ou polypeptides) possédant une activité antimicrobienne, appelées bactériocines (**Daeschel et al., 1990 ; Zacharof et Lovitt, 2012**). Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens, de synthèse ribosomique et thermostables dont certains subissent des modifications post traductionnelles (**Rodriguez et al., 2003 ; Perez et al., 2014**). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques ont un effet antibactérien contre les bactéries taxonomiquement proches de la bactérie productrice ainsi que les bactéries d'altération et d'intoxications alimentaires à Gram positif telles que *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., et *Listeria* spp. (**Ennahar et al., 1998 ; Zendo, 2013**). La cellule productrice présente une immunité spécifique à l'action de son propre bactériocine (**Ammor et al., 2006**). Les bactériocines représentent 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 (**Dortu et Tonart, 2009**).

III. 8. 2 Classification des bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993) (**Dortu et Tonart, 2009**). Ces quatre classes sont présentées dans le tableau I.

Tableau I : Classification des bactériocines (Cenatiempo et al., 1996 ; Dortu et Tonart, 2009 ; Privat et al., 2011 ; Karpiński et Szkaradkiewicz, 2013).

Classe	Sous-classes	Exemples
Classe I: Lantibiotiques -Peptides de taille <5 kDa ; -Thermostables; -Contiennent des acides aminés inhabituels soufrés (Ex: la lanthionine) formés post-traductionnellement.	-La classe Ia : comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés.	-La nisine produite par <i>Lc. lactis</i> (Morisset et al., 2005).
	-La classe Ib : comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés	-La mutacine II produite par <i>St. mutans</i> (Morisset et al., 2005).
Classe II. -Peptides de taille <10 kDa ; -Thermostables.	-Sous-classe IIa : Bactériocines à 27-48 acides aminés et ayant une partie N-terminal hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGVXC et une partie C-terminal. -Agents anti- <i>Listeria</i> .	-La sakacine P produite par <i>Lb. curvatus</i> (Privat et al., 2011).
	-Sous-classe IIb : Bactériocines ayant besoin de deux peptides pour fonctionner	-La lactobine A produite par <i>Lb. amylovorus</i> (Karpiński et Szkaradkiewicz, 2013).
	-Sous-classe IIc : Autres bactériocines.	-La plantaricine A produite par <i>Lb. plantarum</i> (Piard et Desmazeaud, 1992).
Classe III. -Protéines de taille >30kDa ; -Thermolabiles.		-L'helveticin J produite par <i>Lb. helveticus</i> A (Rodriguez et al., 2003).
Classe IV. -Cette classe est hypothétique ; -Elle pourrait rassembler des bactériocines plus complexes (Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité) dont l'existence réelle demande à être établie.		-La plantaricine S produite par <i>Lb. plantarum</i> , actuellement classée dans la sous-classe IIb. Actuellement aucune bactériocine n'appartient à cette classe.

III. 8. 3. Mode d'action des bactériocines

➤ Les bactériocines de classe I

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II (decaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un transporteur de peptidoglycanes. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP... Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. L'interaction avec le lipide II permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de réduire la concentration du lantibiotique nécessaire à la formation des pores, mais peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (**Dortu et Thonart, 2009**). La figure 3 présente le mode d'action du lantibiotique : nisine.

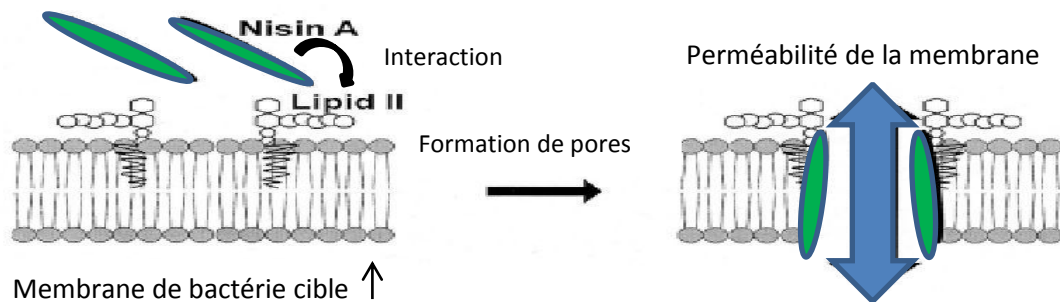


Figure 3 : Mode d'action de la nisine (Lantibiotique de classe IIa) (Jozala et al., 2015).

➤ Bactériocines de classe II

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou avec un récepteur spécifique : la « mannose perméase ». Les bactériocines de classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries à Gram positif. Les deux classes forment des pores au niveau de la membrane des bactéries cibles et la rendent perméable, ce qui provoque la mort cellulaire (**Dortu et Thonart, 2009**).

➤ Bactériocines de classe III

Le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'enterolysin A, la zoocin A et la millericin B agissent par l'hydrolyse des

liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles. L'helveticin J a un mode d'action bactéricide (**Dortu et Thonart, 2009**).

IV. Intérêt des bactéries lactiques dans les produits laitiers

L'importance des ferments lactiques est grande dans l'industrie agro-alimentaire et en particulier dans l'industrie de transformation laitière (**Novel, 1993**). Les bactéries lactiques ont toujours occupé une place importante parmi les auxiliaires de fabrication alimentaires. Leurs caractères variés et leur multiples propriétés sont largement exploités (**Garry et Guern, 1999**). Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments grâce à la production des acides organiques et d'autres substances antibactériennes inhibant certaines souches pathogènes (**Tabak et Bensoltane, 2011**). L'une des principales caractéristiques des produits fermentés est leur stabilité par rapport à la matière première dont ils sont issus. Ce rôle sur la conservation des produits est lié à la présence quantitative des bactéries lactiques dans les produits fermentés ou elles dépassent généralement 10^6 bactéries par gramme d'aliment exerçant ainsi un phénomène de compétition vis-à-vis des autres flores. A ce mécanisme s'ajoute les propriétés spécifiques d'inhibition des bactéries lactiques qui s'exercent de différentes manières (**Pilet et al., 2005**) telles que :

- La production d'acides organiques : les bactéries lactiques fermentent les glucides en acide lactique d'où une diminution du pH favorable à la bioconservation des denrées alimentaires (**Tabak et Bensoltane, 2011**) :

- *Lb. delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *St. thermophilus* utilisées dans le yaourt (**Pilet et al., 2005**).
- *St. thermophilus*, *Lb. helveticus* et *Lb. delbrueckii* subsp *lactis* utilisées dans les fromages (**Pilet et al., 2005**) .

- La production de bactériocines : les bactériocines ont suscité un grand intérêt dans l'industrie alimentaire en raison de leur potentiel d'application dans la conservation des aliments (**Ammor et al., 2006**) : la nisine produite par différentes souches de *Lc. lactis* exercent ses effets inhibiteurs vis-à-vis de plusieurs autres bactéries lactiques mais surtout vis-à-vis de bactéries Gram positif comme *Listéria monocytogenes* et *Clostridium tyrobutyricum* (**Pilet et al., 2005**). Elle est la première et la seule bactériocine utilisée comme additif alimentaire dans certaines denrées alimentaires comme le fromage fondu (**Dortu et Thonart, 2009**).

Matériels et méthodes

I. Origine des souches utilisées

Ce travail consiste à étudier l'activité antibactérienne de certaines souches de bactéries lactiques à l'égard de quelques bactéries pathogènes isolées à partir de produits laitiers fabriqué avec des méthodes traditionnelles.

I. 1. Souches test

Les souches de bactéries lactiques (souches test) sont de deux types : des souches déjà isolées et conservées à 4°C sur une gélose inclinée (S1-S10) et des souches qui sont isolées (S11-S31) au cours de la réalisation de ce travail. Le tableau suivant présente l'origine des différentes souches utilisées.

Tableau II : Origine des souches de bactéries lactiques utilisées. (1/2)

Souche	Produit d'isolement	Région
S1	Klila	-
S2	Smen	Kherrata (Béjaia)
S3	Smen	Kherrata (Béjaia)
S4	Beurre	Tizi (Béjaia)
S5	Beurre	Tizi (Béjaia)
S6	Lben	Tizi (Béjaia)
S7	Beurre	Tizi (Béjaia)
S8	Beurre	Tizi (Béjaia)
S9	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S10	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S11	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S12	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S13	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S14	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S15	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S16	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S17	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S18	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S19	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S20	Lben	Ihaddaden (Béjaia)

Suite tableau (2/2)

S21	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S22	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S23	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S24	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S25	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S26	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S27	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S28	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S29	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S30	Lben	Ihaddaden (Béjaia)
S31	Lben	Ihaddaden (Béjaia)

I. 2. Isolement et purification des souches de Bactéries lactiques

Un échantillon de Lben provenant d'un magasin de vente de produits laitiers à Ihaddaden (Bejaia) a fait l'objet d'un isolement de bactéries lactiques. Pour l'isolement, 1mL de la solution mère (l'échantillon de Lben) a subi une série de dilutions décimales (jusqu'à 10^{-6}). A partir des dilutions 10^{-5} et 10^{-6} , un volume de 1mL est prélevé et déposé dans le fond d'une boîte de Petri, dans le but de réaliser un ensemencement en masse dans les géloses MRS et M17 (deux boîtes par dilution). Les boîtes sont incubées 24h à 48h, à 37°C et 30°C respectivement. Après l'incubation, les colonies caractéristiques (censées être des bactéries lactiques) apparues, sont transférées, dans du bouillon MRS, et incubées à 37°C pendant 24h. A partir de cette culture, des repiquages successifs sont réalisés jusqu'à l'obtention d'un aspect macroscopique de colonies pures. La pureté des souches est vérifiée par le test de la catalase et la coloration de Gram.

Les souches retenues sont numérotées : S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S19, S20, S21, S22, S23, S24, S25, S26, S27, S28, S29, S30 et S31. La figure 4 montre les étapes d'isolement et de purification des souches de bactéries lactiques.

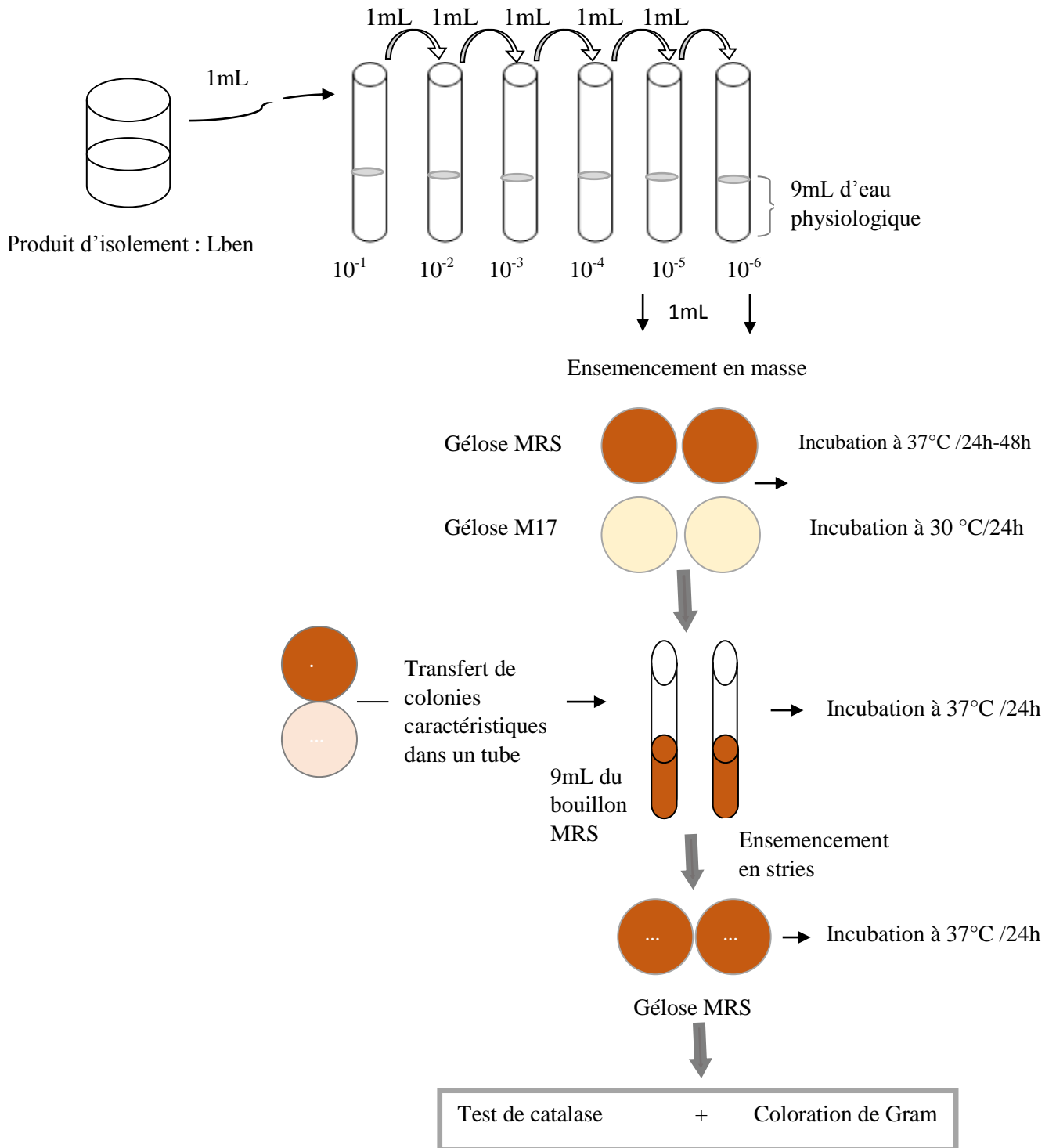


Figure 4 : Isolement et purification des souches de bactéries lactiques.

I. 3. Souches cibles

L'évaluation de l'activité antibactérienne relative aux souches de bactéries lactiques utilisées dans le cadre de cette étude est étudiée vis-à-vis de sept souches de bactéries pathogènes isolées de produits laitiers, dont six étaient déjà isolées et conservées à 4°C sur gélose nutritive inclinée et une est isolée durant la réalisation de ce travail. Cette souche est isolée d'un échantillon de Lben provenant de la région d'Amizour (Bejaïa). A partir de la solution mère, des dilutions décimales (jusqu'à 10⁻⁷) sont réalisées. Des boîtes de Pétri sont ensemencées en masse à partir des dilutions 10⁻⁶ et 10⁻⁷ à raison de deux boîtes par dilution sur la gélose VRBG et incubées à 37°C pendant 24h. Une colonie caractéristique de cette boîte a ensuite subi le test de catalase et la coloration de Gram. Une fois la souche est purifiée, un ensemencement est réalisé sur la gélose EMB et incubée à 37°C pendant 24h. A partir de cette boîte un tube de l'eau peptone exempte d'indole est ensemencé et incubé à 44°C pendant 24h. Après l'incubation quelques gouttes du réactif de Kovacs sont rajoutées pour la recherche de la production d'indole. Le tableau suivant présente les souches cibles utilisées.

Tableau III : Les souches cibles utilisées et leur origine.

	Code	Souche	Echantillon d'isolement	Région
Gram(+)	St2	<i>Staphylococcus aureus</i> 2	Lait cru	Ihaddaden (Béjaïa)
	St5	<i>Staphylococcus aureus</i> 5	Lait cru	Ihaddaden (Béjaïa)
Gram(-)	<i>E.coli</i> I	<i>Escherichia coli</i> I	Lben	Amizour (Béjaïa)
	<i>E.coli</i> Z	<i>Escherichia coli</i> Z	Lben	Ihaddaden (Béjaïa)
	<i>E.coli</i> B	<i>Escherichia coli</i> B	Lben	Ihaddaden (Béjaïa)
	Ps M	<i>Pseudomonas</i> M	Klila	Akbou (béjaïa)
	Ps G	<i>Pseudomonas</i> G	Lben	Tizi (Béjaïa)

II. Revivification et vérification de la pureté des souches conservées

La revivification des souches lactiques et pathogènes est réalisée par des repiquages successifs, chacune sur son milieu de culture approprié jusqu'à l'obtention d'une culture fraîche : bouillon et gélose MRS et M17 pour les bactéries lactiques et bouillon et gélose nutritifs pour les souches cibles. Les cultures sont incubées à 37°C pendant 24h. La pureté

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

III. Standardisation des inocula bactériens

Afin de comparer le pouvoir antibactérien des différentes souches lactiques utilisées et de s'assurer de l'exactitude du résultat de leur effet antibactérien sur les bactéries cibles, une standardisation est réalisée comme suit :

- Des colonies sont mises dans les bouillons MRS (souches lactiques) et nutritif (souches pathogènes) puis incubés à 37°C pendant 24h.
- Les cultures obtenues ont servi à ensemercer de la gélose MRS (souches lactiques) et nutritive (souches pathogènes) et suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h.
- A partir de ces boîtes, 5 colonies (bactéries lactiques) et 2 colonies (souches pathogènes) sont mises dans 9mL de bouillon MRS et 9mL de bouillon nutritif respectivement puis incubé à 37°C pendant 18h.
- A partir de ces cultures fraîches, des dilutions (jusqu'à 10^{-10}) sont réalisées dans de l'eau physiologique, puis un ensemencement en masse est effectué à partir de la dilution 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} et 10^{-10} . Les boîtes sont incubées à 37°C/24-48h. Après incubation, les colonies sont dénombrées et le nombre est exprimé en UFC/mL. La figure 5 représente les étapes de standardisation de l'inoculum des souches test et cibles.

Matériels et méthodes

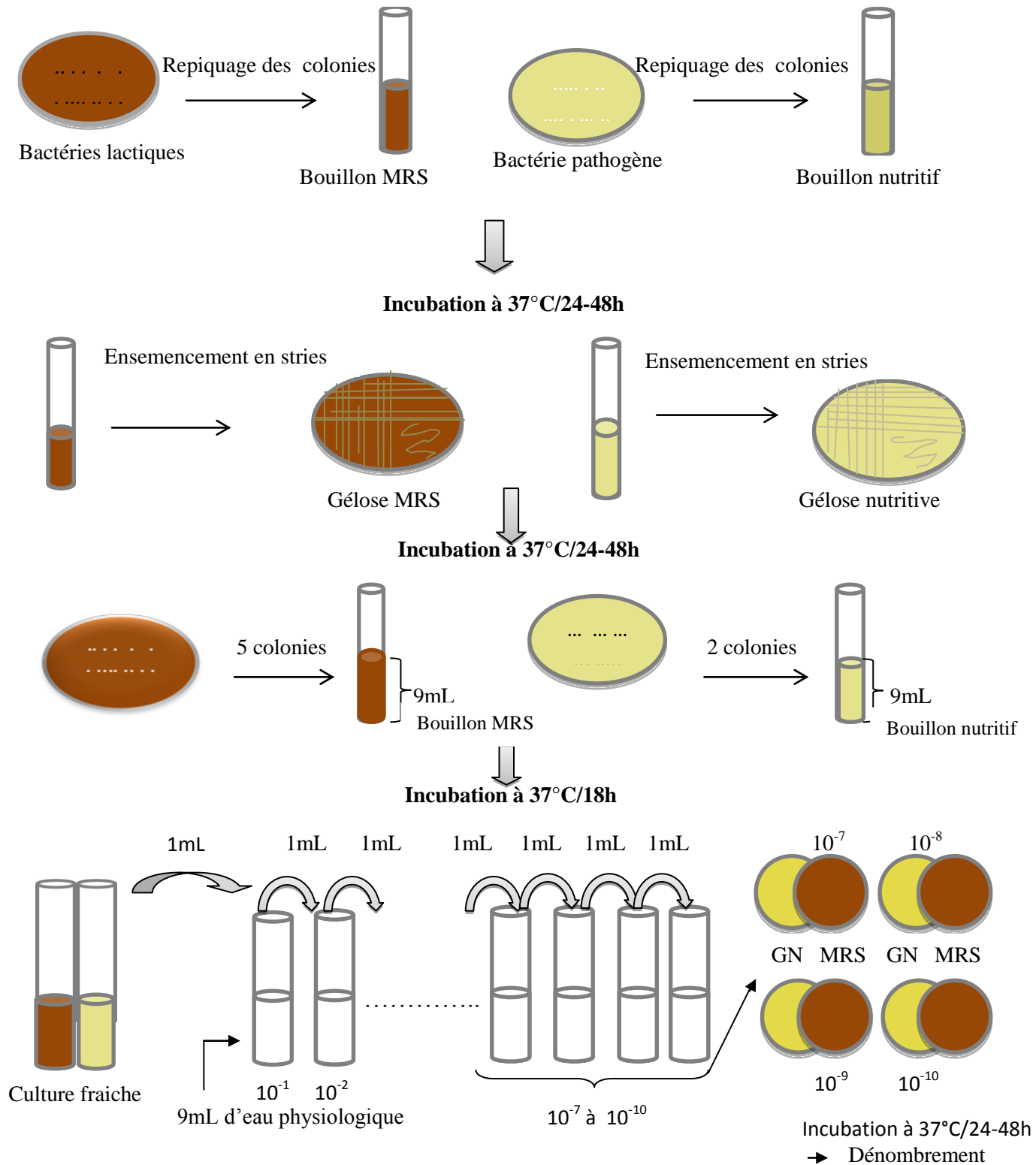


Figure 5 : Standardisation des inocula des bactéries lactiques et pathogènes.

IV. Etude de l'activité antibactérienne des souches lactiques

Cette étude est réalisée par les tests suivants :

- Méthode de double couche (méthode de Fleming et *al.*, 1975).
- Méthode des puits (méthode de Barfoot et Klaenhammer, 1983).
- Test de l'antagonisme en milieu liquide dans le lait.

IV. 1. Méthode de double couche (méthode de Fleming et *al.*, 1975) :

En premier lieu, il est nécessaire de mettre en évidence l'activité antibactérienne des souches de bactéries lactiques étudiées. La méthode de spot accordée à Fleming et *al.*, (1975) et Tagg et *al.*, (1976), est utilisée pour la détection des inhibitions (**Schillinger et Lucke, 1989 ; Ammar et al., 2014**). Ce test consiste à déposer un volume de 5µL de la culture fraîche de 18h de chaque souche lactique (31 souches) de charge 10^{10} UFC/mL sur une gélose MRS. Le même volume de bouillon MRS stérile est aussi déposé comme témoin négatif. Les boîtes sont laissées à température ambiante pour permettre le séchage des spots, avant de les incuber à 37°C pendant 24h. En parallèle, une culture fraîche de bactérie pathogène à tester est préparée en la cultivant dans 9mL du bouillon nutritif et incubée à 37°C pendant 18h. Après l'incubation, 9mL de gélose Mueller Hinton (MH) en surfusion sont inoculés par 10^6 UFC/mL de la souche cible. Puis, le mélange est ensuite coulé sur la couche de MRS, en contact direct avec les spots. Les boîtes sont incubées à 37°C/ 24h. Ce test est répété 2 à 3 fois pour chaque souche cible. L'activité antibactérienne se révèle par l'apparition de zones claires autour des spots. L'inhibition est considérée positive si la zone dépasse 2 mm de diamètre (**Hernandez et al., 2004**). Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en millimètre et le diamètre du spot n'est pas pris en compte dans l'expression des résultats. La figure 6 représente les étapes suivies pour la réalisation de la méthode de double couche (test des spots).

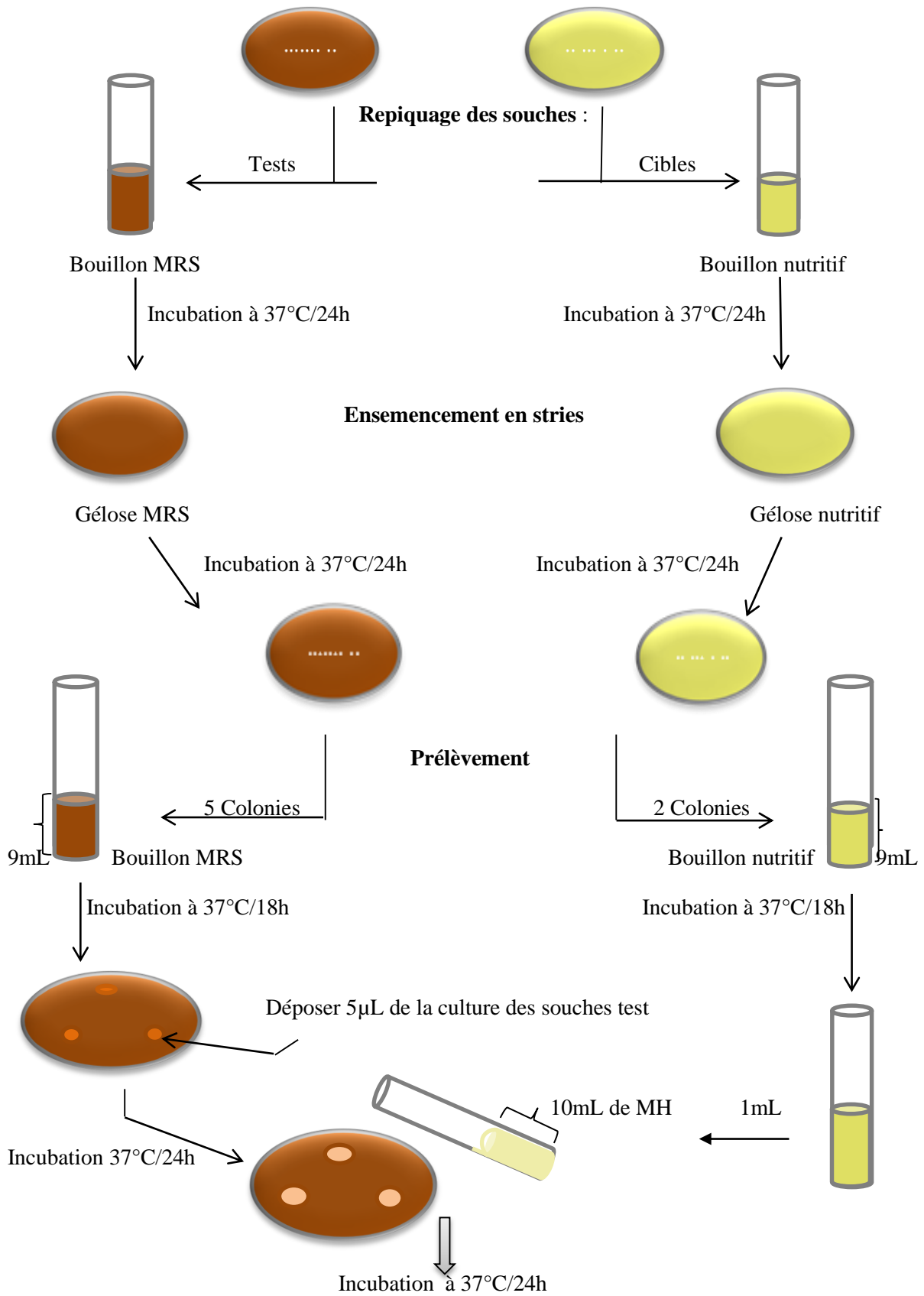


Figure 6 : Etapes de réalisation du test des spots.

IV. 2. Méthode des puits (méthode de Barfoot et Klaenhammer, 1983)

IV. 2. 1. Cas du surnageant natif

Pour démontrer l'activité antibactérienne des souches lactiques détectée dans la méthode de double couche, la méthode des puits est appliquée. Une fine couche de gélose MRS est coulée en premier, dans des boîtes de Pétri pour le maintien de la gélose à utiliser (MH ou gélose nutritive (GN) semi molle). Après solidification, une couche de gélose MH (ou GN semi molle) est coulée au-dessus et laissée solidifier. Ensuite, 10mL de l'une des deux géloses (MH ou GN) en surfusion à 10^6 UFC/mL de la souche cible sont coulés sur la surface. Des puits de 6 mm de diamètre sont ensuite creusés dans la gélose. Les puits sont scellés par une goutte de GN puis remplis avec 100 μ L de surnageant natif de la culture des souches lactiques. Les surnageants sont obtenus par centrifugation (NÜVE, Allemagne) des cultures fraîches de bactéries lactiques à 5000 tours /min pendant 30 minutes. Un témoin négatif est également fait dans ce test par le remplissage d'un puits par le même volume de bouillon MRS. Les boîtes sont laissées par la suite à une température de 4°C pendant deux heures pour la diffusion des surnageants, puis incubées à 37°C/24h (**Tagg et Mac Given, 1971 ; Barfoot et klaenhammer, 1989 ; Ennahar 1998 ; Kim et al., 2001**). L'activité antibactérienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits. Les diamètres des zones d'inhibition apparues sont mesurés en millimètres, et le diamètre des puits n'est pas pris en compte dans l'expression des résultats. Le résultat est considéré positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 2mm (**Tabak et Bensoltane, 2011**). Le test est refait deux à trois fois.

Pour une confirmation des résultats obtenus, le test de puits, en utilisant la méthode d'écouvillonnage pour l'ensemencement de la gélose (MH ou GN) par le germe cible a été effectué en parallèle. Donc après avoir coulé la couche de MH (ou GN), un écouvillon stérile sec est trempé dans l'inoculum de la bactérie cible (une seule fois), et l'excès de l'inoculum est éliminé en pressant l'écouvillon et en le faisant rouler contre les parois du tube en remontant. Un ensemencement en stries serrées de toute la surface de la boîte est réalisé à 3 reprises en faisant tourner la boîte de 60° après chaque application et enfin l'écouvillon est passé sur le bord de la gélose. Les boîtes sont laissées pendant quelques minutes à température ambiante, pour que l'inoculum sèche. Les puits sont réalisés et remplis avec le surnageant natif. Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2h puis incubées dans les mêmes conditions.

IV. 2. 2. Cas du surnageant neutralisé

Pour éliminer l'effet des acides organiques, notamment des acides lactique et acétique, dans le but de déterminer l'origine de l'activité antibactérienne, le surnageant récupéré après la centrifugation est neutralisé par la soude (NaOH) 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.

IV. 2. 3. Cas du surnageant traité

Le but de ce travail est de déterminer la nature de l'activité antibactérienne. Après avoir éliminé l'hypothèse que l'activité soit due à une compétition entre les bactéries lactiques et pathogènes ou qu'elle soit due aux acides organiques par le test des puits avec le surnageant natif et neutralisé, des tests des puits sont réalisés avec du surnageant neutralisé ayant subi :

- Un traitement thermique : par un chauffage dans un bain mari (Raypa) à 60°C, 80°C et à 100°C pendant 30 minutes et à 121°C pendant 20 minutes, afin de tester la thermostabilité de ces substances inhibitrices (**Hernandez et al., 2005 ; Labioui et al., 2005**).
- Un traitement enzymatique : par l'utilisation des enzymes protéolytique : Trypsine et Papaine (SIGMA-ALDRICH) pour déterminer leur nature. Les surnageants sont incubés 1h à 37°C avec les protéinases. Les enzymes sont utilisées à une concentration finale de 1mg / 1mL dans du tampon phosphate à pH7. Après incubation, les surnageant ont subi un choc thermique par un chauffage à 100°C pendant 5 minutes suivi d'un refroidissement immédiat (avec de la glace) afin de stopper l'action des enzymes (**Ait Ouali et al., 2014**)

Des témoins négatifs sont réalisés dans les deux cas en utilisant des surnageants neutralisés non traités. La figure 7 représente les étapes de réalisation du test des puits.

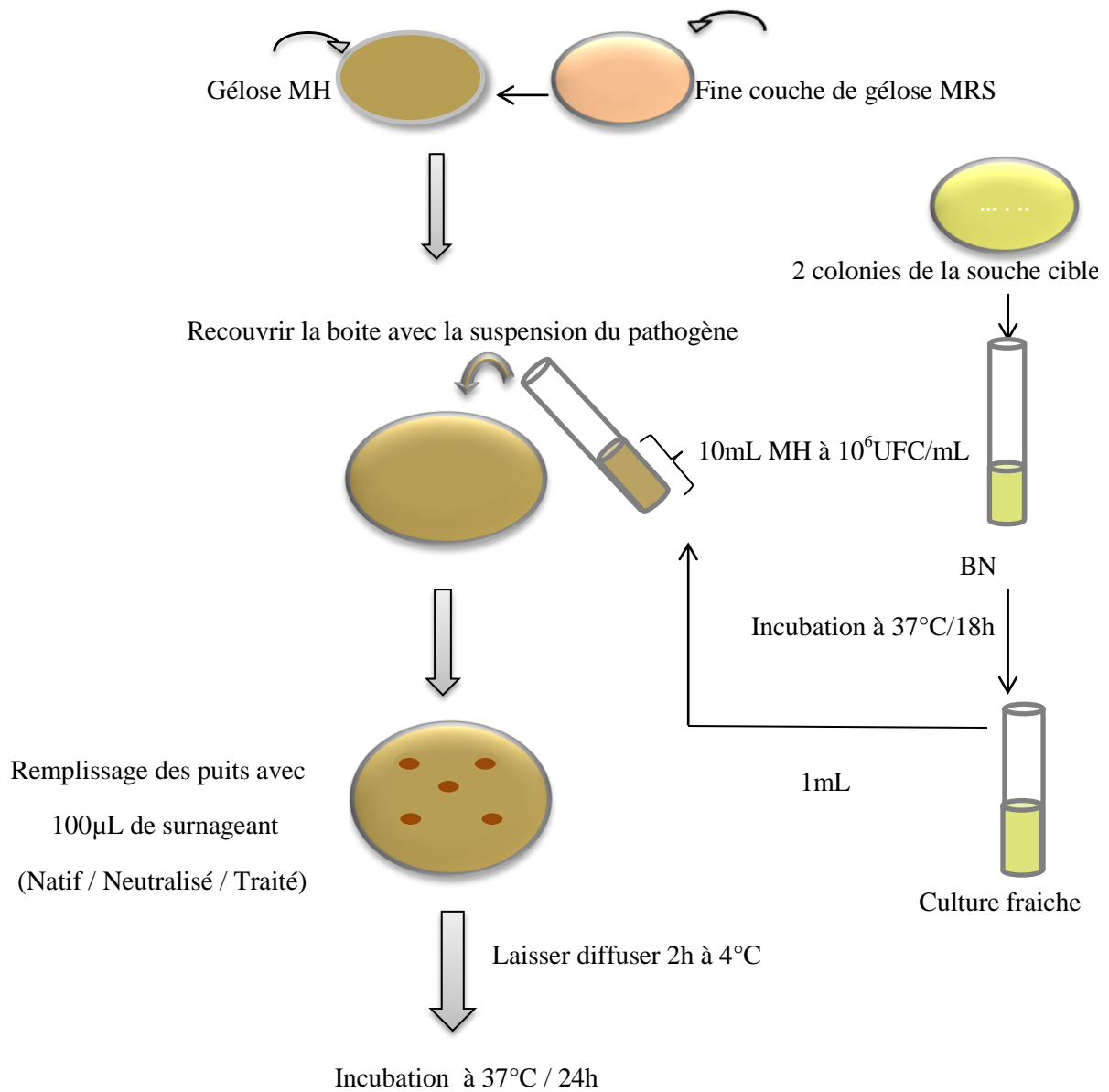


Figure 7 : Étapes de réalisation du test des puits.

IV. 3. Test d'antagonisme dans le lait :

S.aureus est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections latentes et les mammites subcliniques chroniques qui, étant difficiles à éradiquer, constituent la principale source de contamination du lait et de ses dérivés par cette bactérie (**Brisabois et al., 1997**). Une culture mixte de cette bactérie pathogène avec une souche lactique qui a été sélectionnée comme l'une des souches les plus actives, fut intéressante. La culture mixte est faite dans un flacon contenant 100 mL de lait écrémé stérile etensemencé par les deux bactéries test et cible à raison de 10^8 UFC/mL et 10^6 UFC /mL respectivement. En parallèle, les deux souches test et cible sont cultivées séparément (culture pure) dans 100 mL de lait écrémé stérile.

La croissance dans les trois flacons est suivie par la réalisation de dénombrements. Des prélèvements de 1mL à temps réguliers de chaque flacon ont subi des dilutions décimales dans l'eau physiologique. 1 mL de la dilution convenable estensemencé en masse dans la gélose MRS pour la souche lactique et la gélose Chapman pour St5 et la culture mixte. Un dénombrement a été effectué aux intervalles de temps suivant : 0h, 2h, 4h, 6h, et après 24h d'incubation, à raison de deux boîtes par dilution, qui sont incubées à 37°C /24h. Au terme de la période d'incubation, les colonies sont dénombrées et le résultat est exprimé en UFC/mL en utilisant la formule suivante :

$$N = \left[\frac{\sum c}{(n1 + 0,1n2)} \right] * (1/d)$$

Dont :

N : Concentration bactérienne en UFC/mL.

$\sum c$: Nombre de colonies comptées sur toutes les boîtes retenues.

n1 : Nombre de boîtes retenues de la première dilution.

n2 : Nombre de boîtes retenues de la deuxième dilution.

d : Dilution.

Le test est réalisé à raison de trois répétitions. La figure 8 présente un schéma détaillant les étapes de ce test.

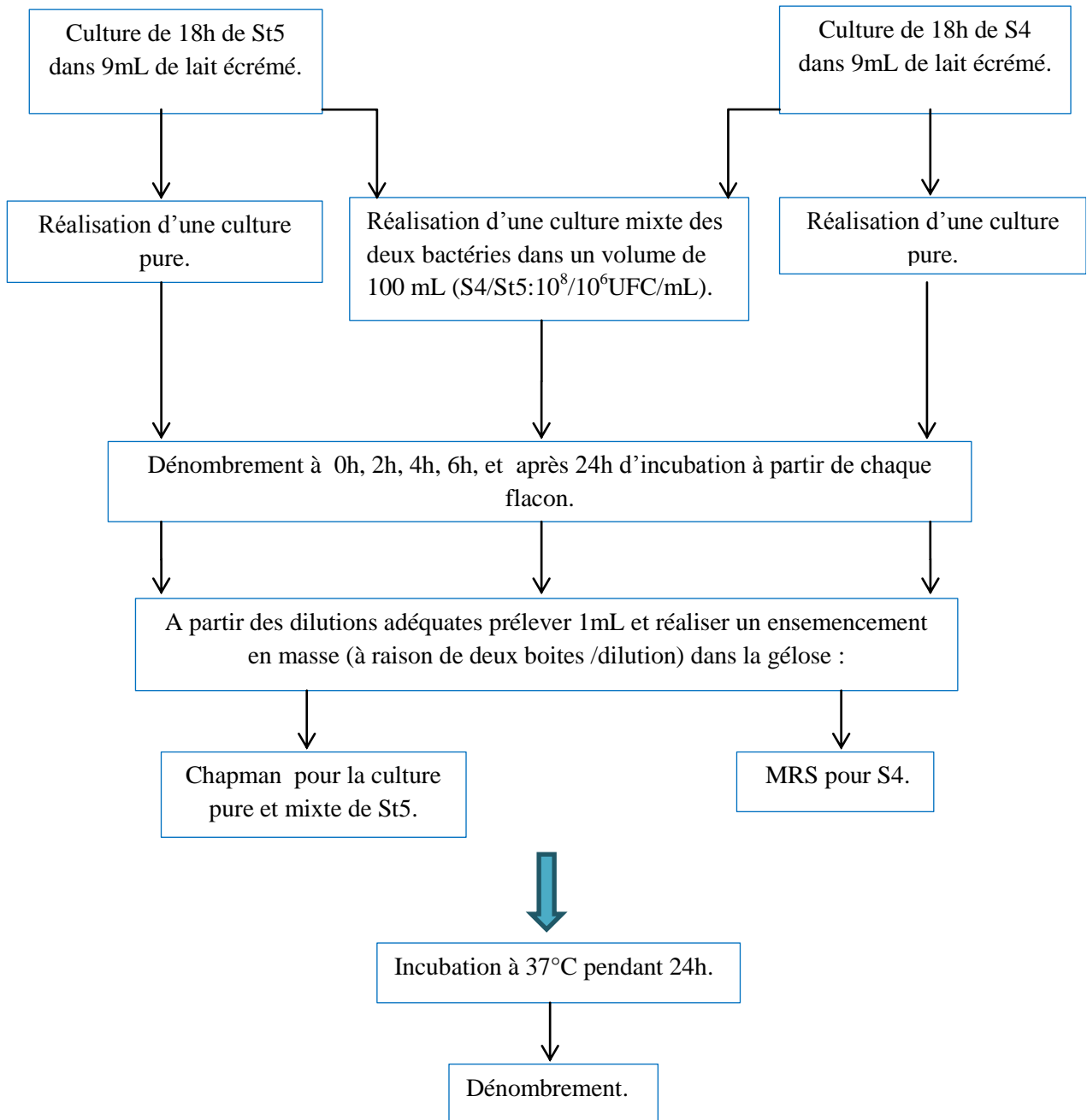


Figure 8 : Schéma illustrant les étapes suivies pour la réalisation du test d'antagonisme dans le lait.

Résultats et discussion

I. Caractéristiques des isolats

I.1. Bactéries lactiques

I. 1. 1. Sur milieu solide et liquide

Ces bactéries apparaissent en petites colonies blanchâtres ou crémeuses et donnent un trouble homogène sur milieu liquide. La figure suivante représente l'aspect des souches de bactéries lactiques sur gélose et bouillon MRS après une culture fraîche.

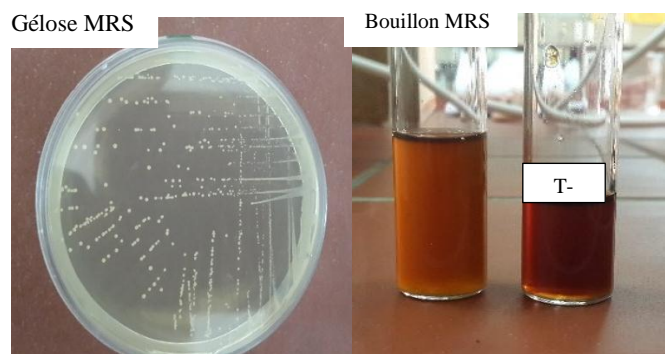


Figure 9 : Aspect des bactéries lactiques sur milieu MRS.

I. 1. 2. Caractères microscopiques

Après le test de catalase et la coloration de Gram, toutes bactéries Gram + et catalase - sont supposés être des bactéries lactiques. Ainsi une observation microscopique fut réalisée. L'identification des souches obtenues a fait l'objet d'un autre travail. La figure 10 présente l'aspect d'une souche de bactéries lactiques sous microscope optique ($G \times 100$) (ZEISS West Germany).

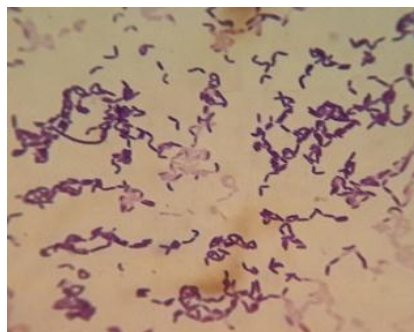


Figure 10 : Aspect microscopique d'une souche de bactéries lactiques sous microscope optique.

I. 2. Souches de bactéries pathogènes

Dans ce travail, deux (2) souches conservées de *S.aureus*, de *Pseudomonas* et d'*E.coli* ont été testées plus une autre souche d'*E.coli* isolée durant le travail. Après avoir cultivé les souches des bactéries pathogènes (chacune sur son milieu approprié), leur aspect macroscopique est présenté sur la figure suivante.

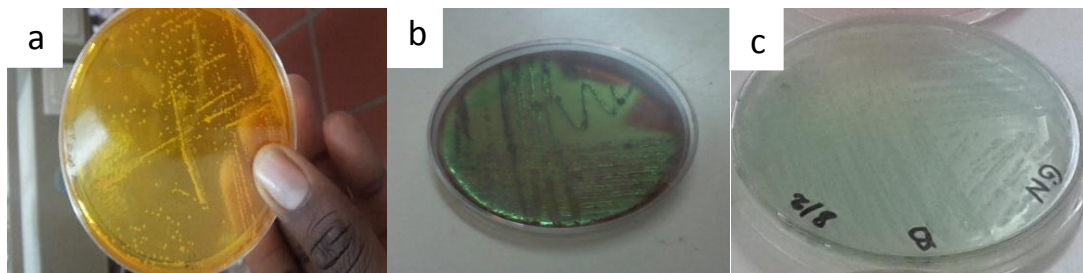


Figure 11 : Aspect macroscopique des souches de bactéries pathogènes.

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

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

c/ Aspect de *Pseudomonas* sur GN.

II. Résultats de la standardisation des inocula

Le but de cette étape est de pouvoir travailler avec une même charge bactérienne dans 1mL de culture durant toutes les étapes de ce travail. Après dénombrement dans 9mL de bouillon MRS pour les bactéries lactiques et BN pour les bactéries pathogènes, les résultats sont représentés dans le tableau suivant.

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

Souches	Nombre de colonies dans 9mL de bouillon MRS/BN	Nombre de cellules (UFC/mL)
BL S9	6	2.10^{10}
BL S10	5	$5,8.10^{11}$
BL S11	5	$8,8.10^{12}$
St2 et St5	2	$1,2.10^8$
Ps M et G	2	1.10^9
<i>E.coli</i> Z, B et I	2	1.10^8

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

III. 1. Test des spots sur *S. aureus*

Le test des spots a révélé une bonne activité antibactérienne des bactéries lactiques à l'égard des deux souches St5 et St2. Cependant toutes les souches lactiques ont eu une activité sur la St5 (ZI= 6-17mm). Par contre avec la St2, il n'y a eu que 13 souches lactiques qui ont donné des zones d'inhibition (ZI= 2-19,5mm). La meilleure zone d'inhibition a été observée avec la souche 23 sur St2 (ZI=19,5mm). Les figures suivantes représentent l'activité des bactéries lactiques sur St2 et St5 par le test des spots.

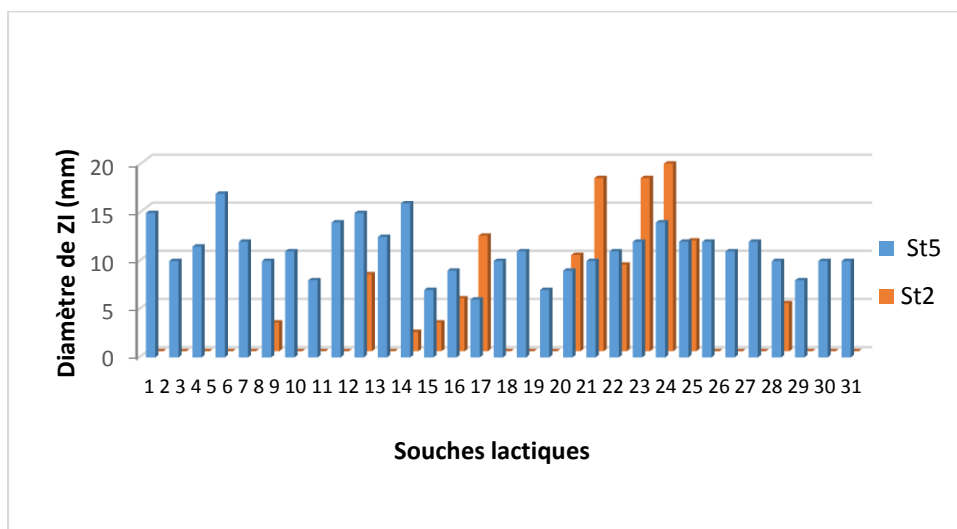


Figure 12 : Diamètre des zones d'inhibition (mm) obtenues par le test des spots à l'égard de St2 et St5.

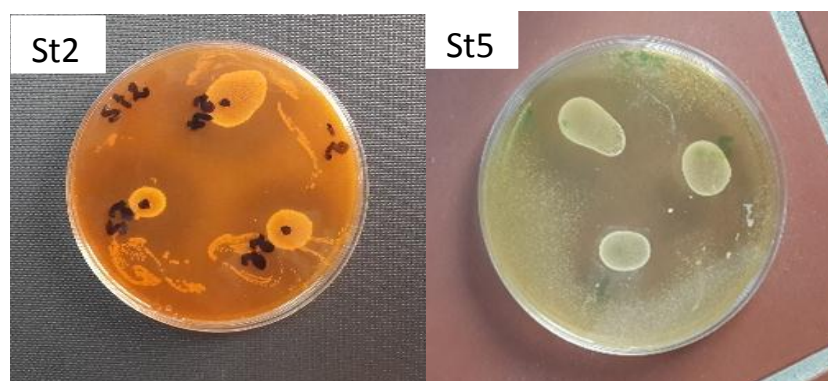


Figure 13 : Exemple de résultats obtenus par le test de spots à l'égard de St2 et St5.

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

Dans l'ensemble, le test a révélé une bonne activité sur les trois souches d'*E.coli*. Toutes les souches de bactéries lactiques ont eu une activité sur la *E.coli* B (ZI= 5-18mm), vingt ont une activité sur la *E.coli* I (ZI= 6-28mm) et seulement douze ont une activité sur la *E.coli* Z (ZI= 4-20mm). La meilleur zone d'inhibition a été observée avec la souche 11 sur la *E.coli* I avec une ZI = 28mm. Les figures suivantes présentent le résultat du test des spots sur les trois souches d'*E.coli*.

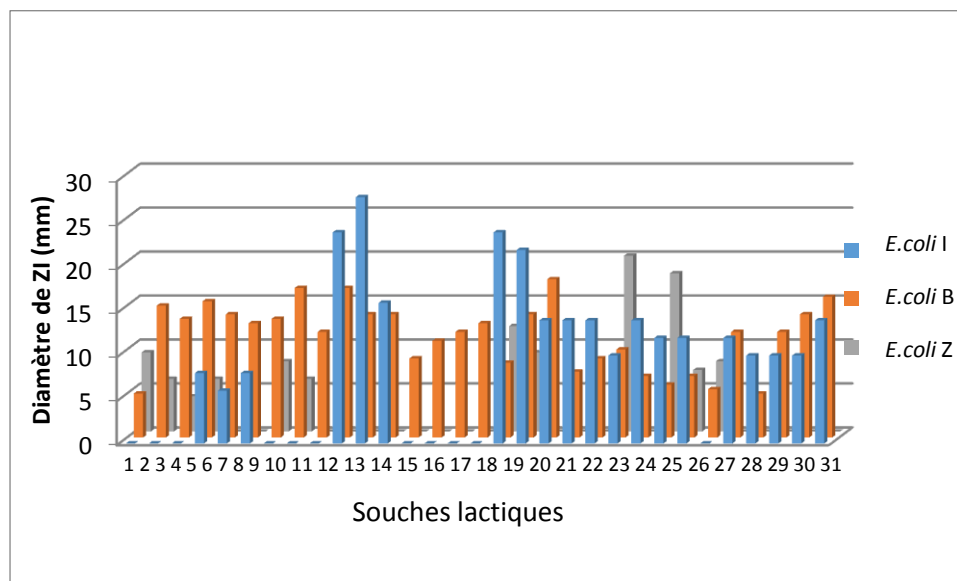


Figure 14 : Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des spots à l'égard de *E.coli* Z, B et I.

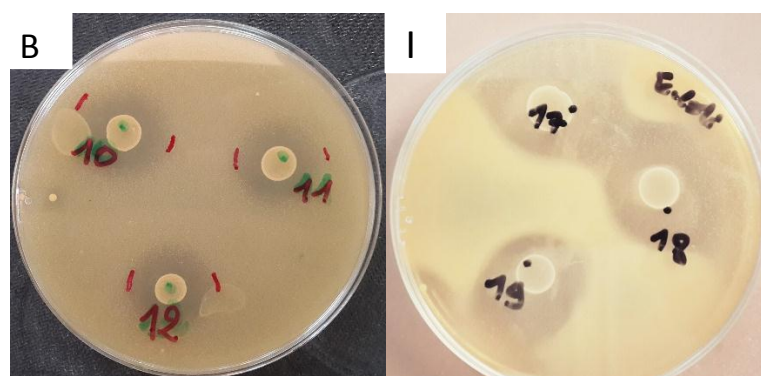


Figure 15 : Exemple de résultats obtenus par le test des spots à l'égard des souches d'*E.coli*.

III. 3. Test des spots sur *Pseudomonas*

Selon le résultat des tests, toutes les bactéries lactiques ont une très bonne activité sur souches de PsM (ZI= 6-32mm) et G (ZI=8-32mm), voire une inhibition totale sur la plupart des boîtes. Les figures suivantes présentent les résultats du test des spots sur les Ps M et G.

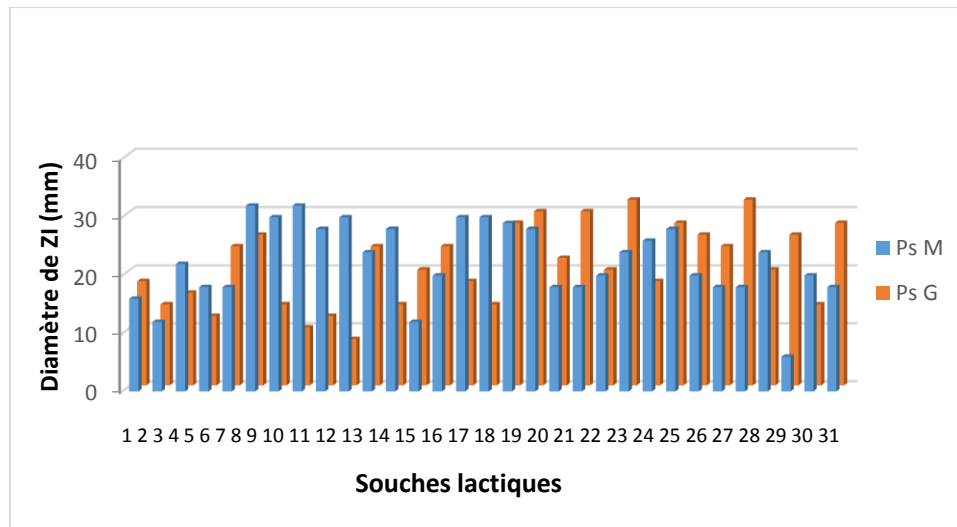


Figure 16 : Diamètre des zones d’inhibition obtenues par le test des spots à l’égard de PsM et PsG.

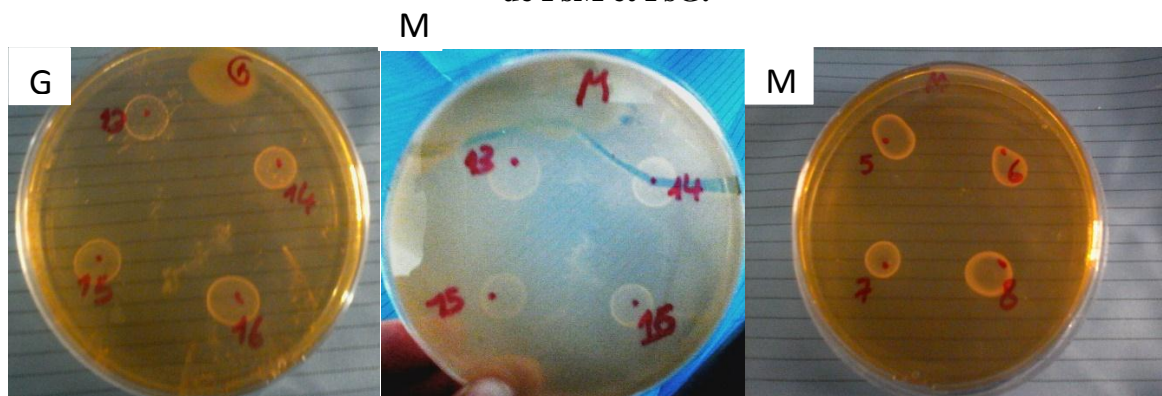


Figure 17 : Exemple de résultats obtenus par le test des spots à l’égard de PsM et PsG.

La méthode des spots où la souche test et la souche cible sont en contact direct a montré que la plupart des bactéries lactiques utilisées ont présenté des zones d’inhibition vis-à-vis des bactéries pathogènes utilisées.

Cela prouve que les bactéries lactiques étudiées ont une activité antibactérienne à l’égard de ces bactéries pathogènes qui est due à la synergie entre les différents facteurs (Les acides organiques, le diacetyl, le peroxyde d’hydrogène et les bactériocines) (Schillinger et al.,

1996). Des résultats similaires ont été rapportés par **Bouadjaib (2013)** et par **Madi (2010)** dans leur travail où les souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits laitiers ont montré une activité à l'égard de ces bactéries pathogènes.

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

IV. 1. Cas du surnagent natif

L'objectif principal de ce test est de déterminer la nature de la ou des substances actives essentiellement les bactériocines. Pour cela, un test de diffusion sur gélose (test des puits), a été réalisé pour éliminer l'hypothèse des compétitions nutritives.

IV. 1. 1. Test des puits sur *S.aureus*

D'après les résultats présentés par la figure 18, la souche St2 n'a pas présenté des inhibitions avec les surnageants des bactéries lactiques à l'exception de la S5 qui a donné une zone d'inhibition ZI=6mm. Ainsi l'activité observée avec le test des spots était dû soit à un facteur de contact et la souche cible St2 est résistante aux métabolites produits par les bactéries lactiques.

La souche St5 s'est révélée sensible aux surnageants avec une ZI maximum de 10mm obtenue avec la souche 31. Les figures 18 et 19 montrent un exemple de résultats de test de puits à l'égard de St2 et St5.

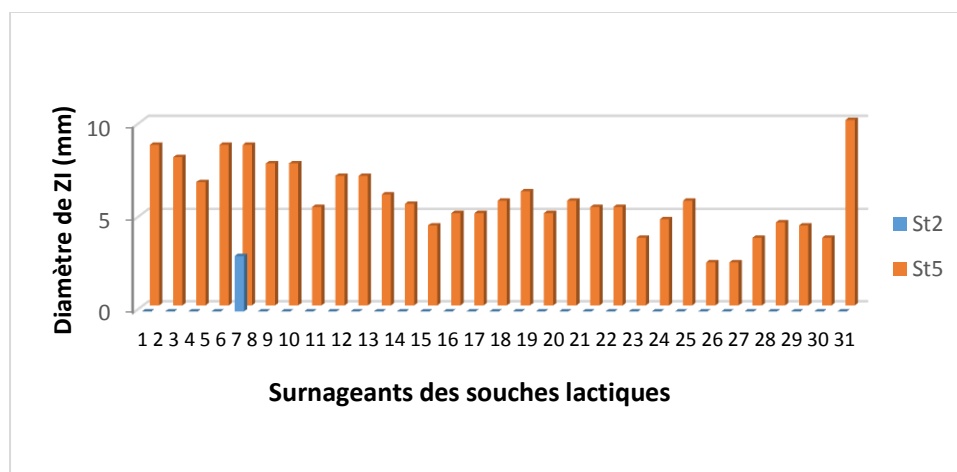


Figure 18 : Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits avec les surnageants natifs à l'égard de St2 et St5.

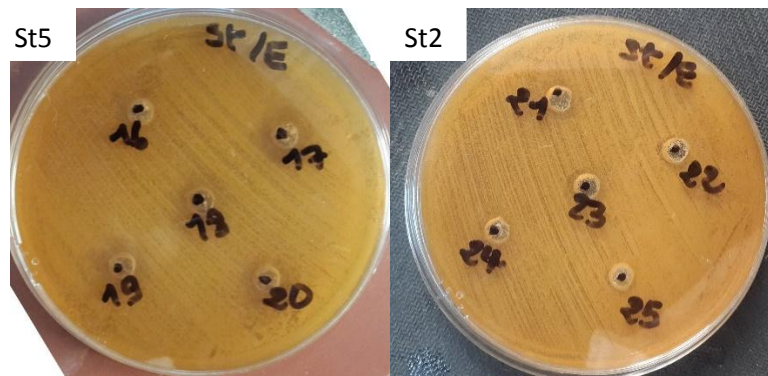


Figure 19 : Exemple de résultats obtenus par le test de puits à l'égard de St2 et St5 avec des surnageants natifs.

IV. 1. 2. Test des puits à l'égard d'*E.coli*

Le test des puits a démontré que la plupart des bactéries lactiques étudiées ont une activité plus ou moins importante sur *E.coli* dont vingt-deux souches ont une activité sur *E.coli* B (ZI=1-8mm), vingt-six sur *E.coli* Z (ZI=1,5-7mm) et vingt et une sur *E.coli* I (ZI=1-9,5mm). Les figures 20 et 21 présentent les résultats obtenus.

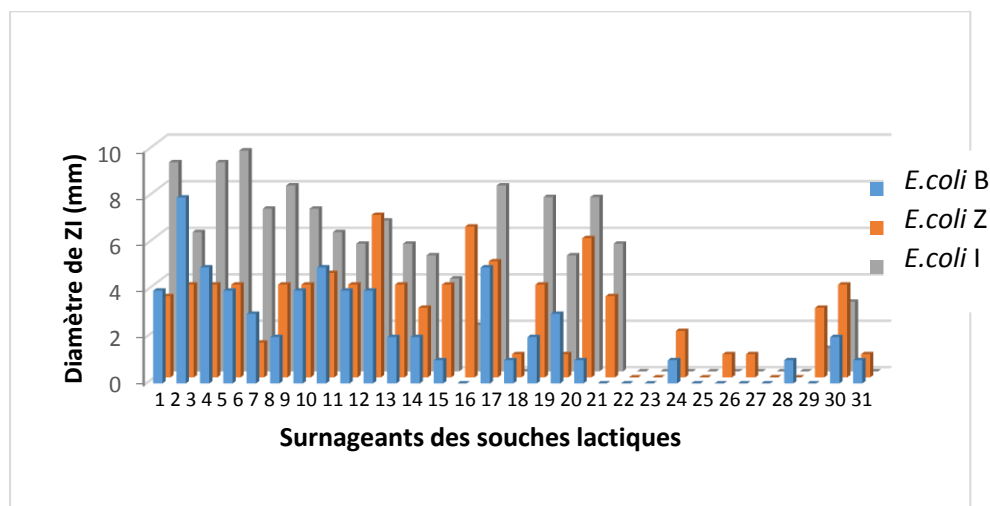


Figure 20 : Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits avec les surnageants natifs à l'égard de *E.coli* B, Z et I.

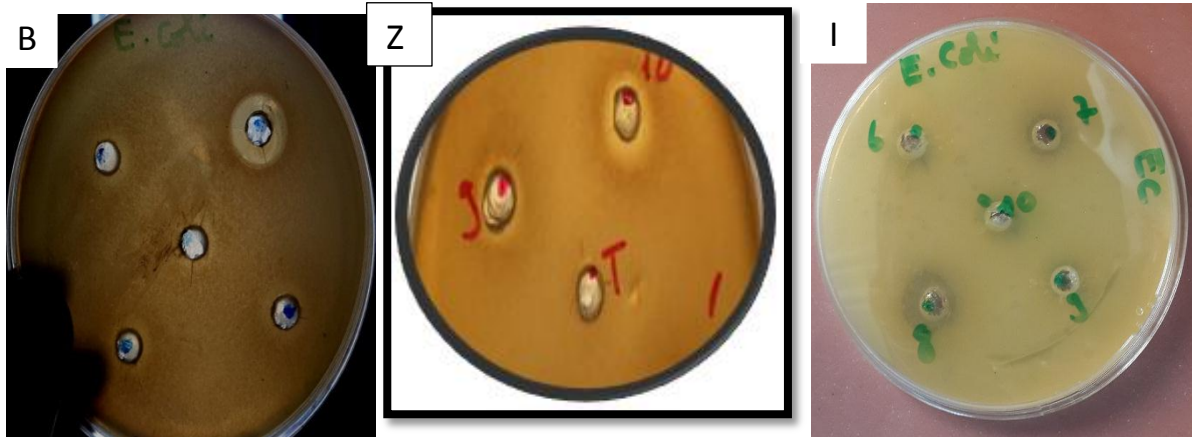


Figure 21 : Exemple de résultats obtenus par le test des puits avec les surnageants natifs à l'égard d'*E.coli* B, Z et I.

IV. 1. 3. Test des puits à l'égard de *Pseudomonas*

Le test des puits sur *Pseudomonas* a révélé une activité remarquable avec la totalité des souches lactiques vis-à-vis de cette bactérie cible. Cependant l'activité selon le résultat est plus importante avec l'ensemble des souches sur PsG (ZI=12-24mm) que sur PsM (ZI=5-16mm). Les figures 22 et 23 présentent les résultats obtenus.

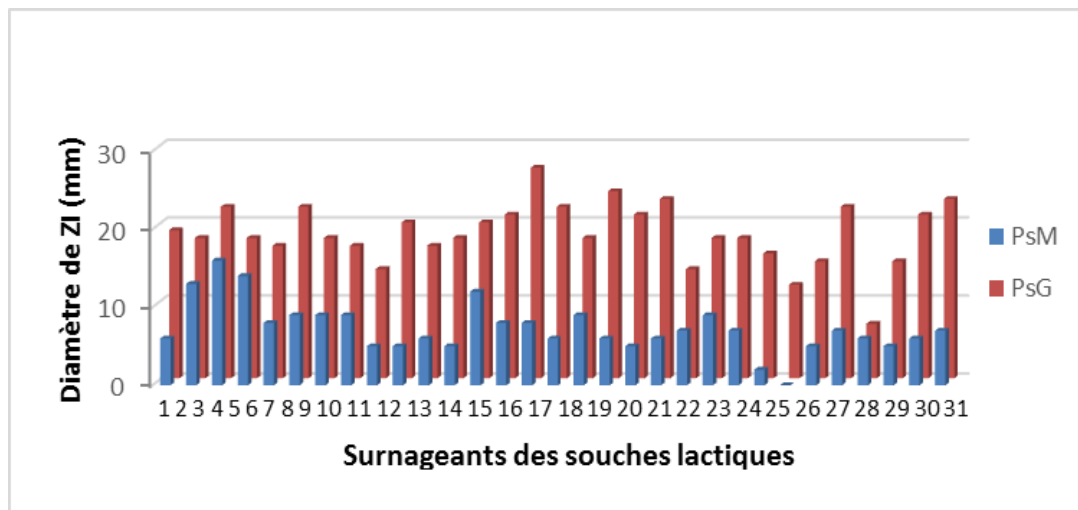


Figure 22 : Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de PsG et PsM avec les surnageants natifs.

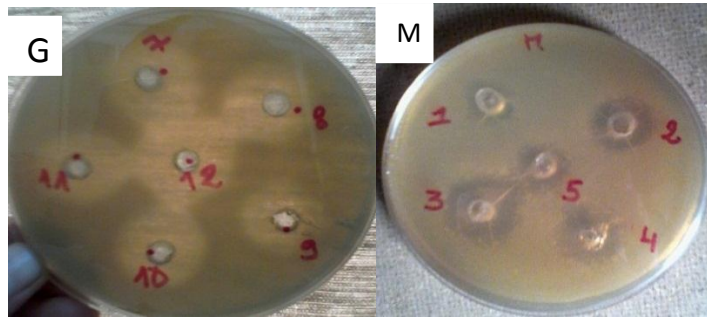


Figure 23 : Exemple de résultats obtenus par le test des puits avec les surnageants natifs à l'égard de PsG et PsM.

Des résultats similaires ont été rapportés par **Labioui et al. (2005)** qui ont aussi trouvé avec le test de puits avec les surnageants natifs, des zones d'inhibition sur *Pseudomonas*, *E.coli* et *Staphylococcus* similaires aux nôtres. Les résultats obtenus sont aussi similaires à ceux rapportés par **Madi (2010)** et **Mami (2013)**.

IV. 2. Cas du surnageant neutralisé

Après l'obtention des résultats avec le test des spots et celui des puits avec les surnageants natifs, la recherche de l'activité des souches lactiques testées et sa nature a été poursuivie par un test des puits avec des surnageants neutralisés pour exclure l'hypothèse que l'activité soit due à l'acidité qui est un facteur pouvant donner des faux positifs dans les tests de recherche de la nature de l'activité (**Cogan et al., 1997**). La production d'acide lactique est une caractéristique des bactéries lactiques leur conférant un pouvoir antimicrobien par dissociation de la forme non dissocié de l'acide à l'intérieur de la cellule cible perturbant le gradient électrochimique de proton conduisant à la mort cellulaire (**Piard et Desmazeaud, 1991 ; Caplice et Fitzgerald, 1999**).

Ce test a été réalisé sur les quatre bactéries cibles : St5, PsM, PsG et *E.coli* Z (figures 24 et 25) en fonction de leur inhibition remarquable dans les tests précédents.

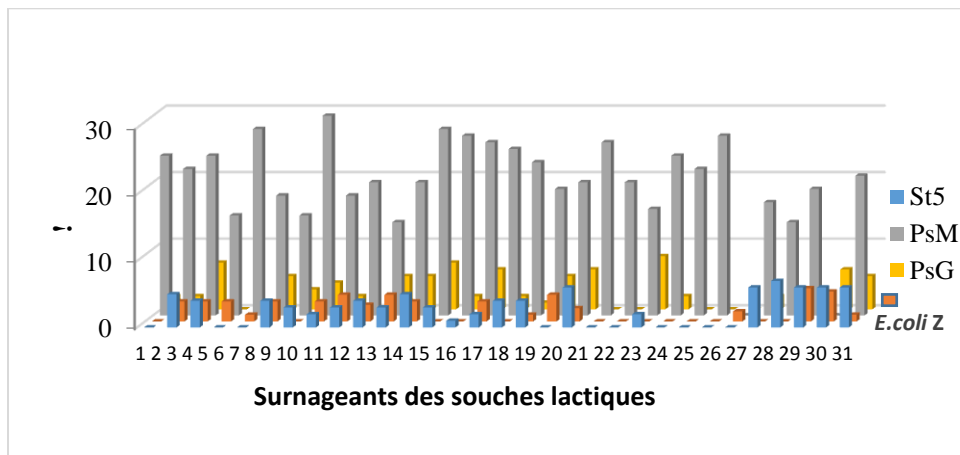


Figure 24 : Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de St5, PsM, PsG et *E.coli* Z avec les surnageants neutralisés.

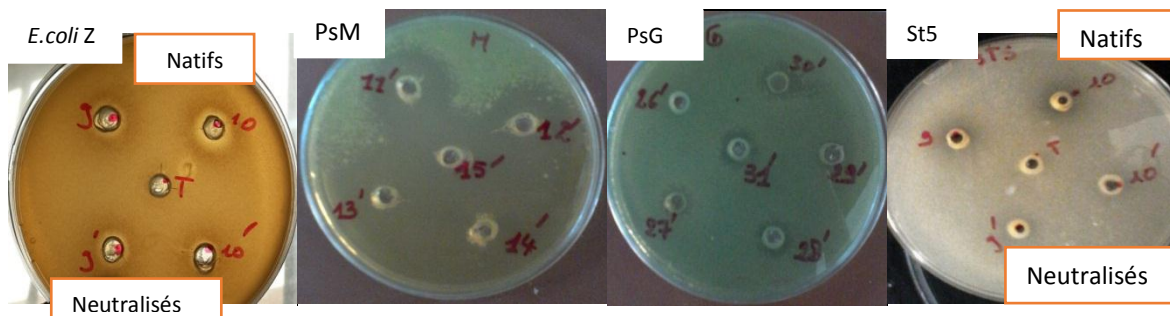


Figure 25 : Exemple de résultats obtenus par le test des puits avec les surnageants neutralisés.

Sur les 31 souches criblées, seulement 21 surnageants neutralisés ont donné des activités sur St5, 22 sur PsG, 18 sur *E.coli* Z et 29 sur PsM. Des résultats similaires ont été rapportés par **Labioui et al. (2005)** ; qui ont aussi trouvé avec le surnageant neutralisé des zones d'inhibition avec leur test. Les figures 24 et 25 montrent les résultats de ce test.

Puisque l'activité n'a pas disparue après neutralisation, donc l'origine de l'activité peut être autre que les acides organiques.

IV. 3 Cas du surnageant traité

Après l'élimination des deux facteurs antibactériens: compétition nutritive et acidité, par les tests précédents (spots et puits avec surnageants natifs et neutralisés), la recherche de la production des bactériocines par les bactéries lactiques a été testée par le traitement thermique et enzymatique des surnageants neutralisés dans le but de déterminer l'origine de l'inhibition des bactéries cibles.

IV. 3. 1. Traitement enzymatique

Dans le but de déterminer la nature de la substance inhibitrice, les surnageants neutralisés ayant donné un résultat positif ont subi un traitement à la papaine et à la trypsine.

➤ Test des puits à l'égard de PsM

Le test des puits a révélé avec les protéases trypsine et papaine des zones d'inhibitions moins importantes (trypsine: ZI=1-9mm, papaine: 1-5mm) par rapport à celles observées avec les surnageants neutralisés. Dans le test avec la papaine, le surnageant 20 et 21 ont carrément perdu leur activité. Les figures 26 et 27 présentent les résultats obtenus.

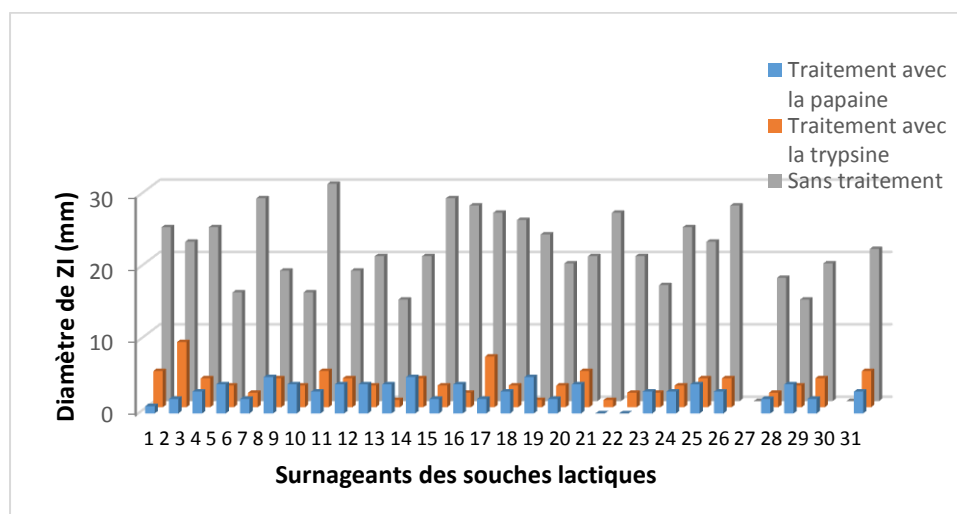


Figure 26 : Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de PsM avec les surnageants traités aux protéases.

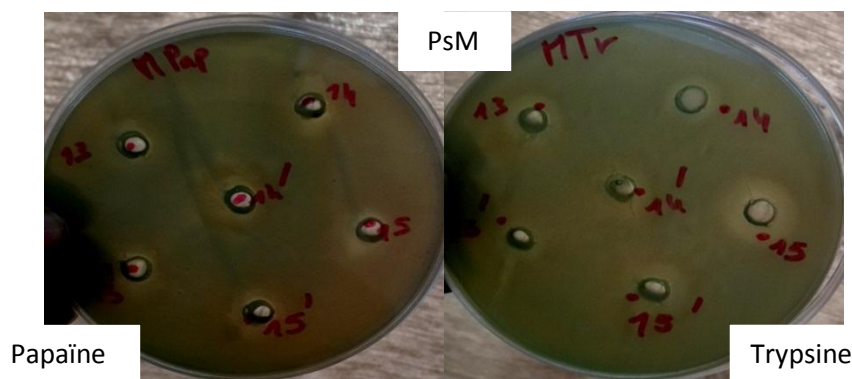


Figure 27 : Exemple de résultats obtenus par les surnageants traité aux protéases à l'égard de PsM.

➤ **Test des puits à l'égard de St5**

Le test des surnageants traités avec les protéases (trypsine et papaïne) sur St5 n'a révélé aucune zone d'inhibition sauf par le surnageant 22 qui a donné une ZI=4mm avec la papaïne. Les figures 28 et 29 présentent les résultats obtenus.

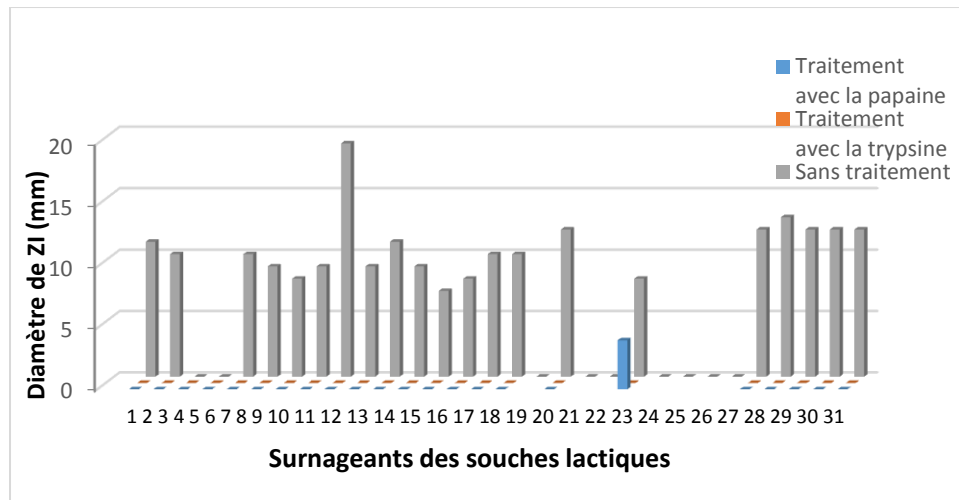


Figure 28 : Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de St5 avec les surnageants traités aux protéases.

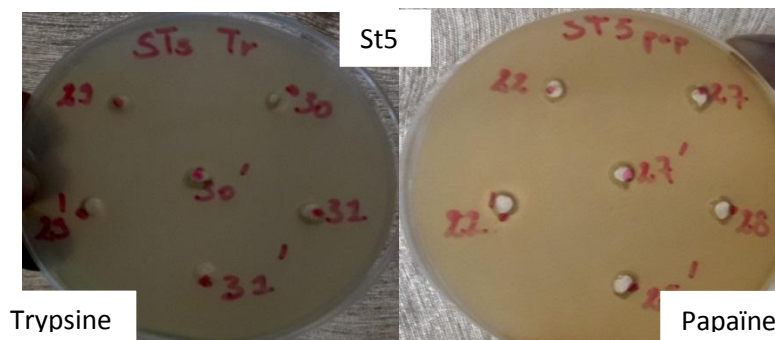


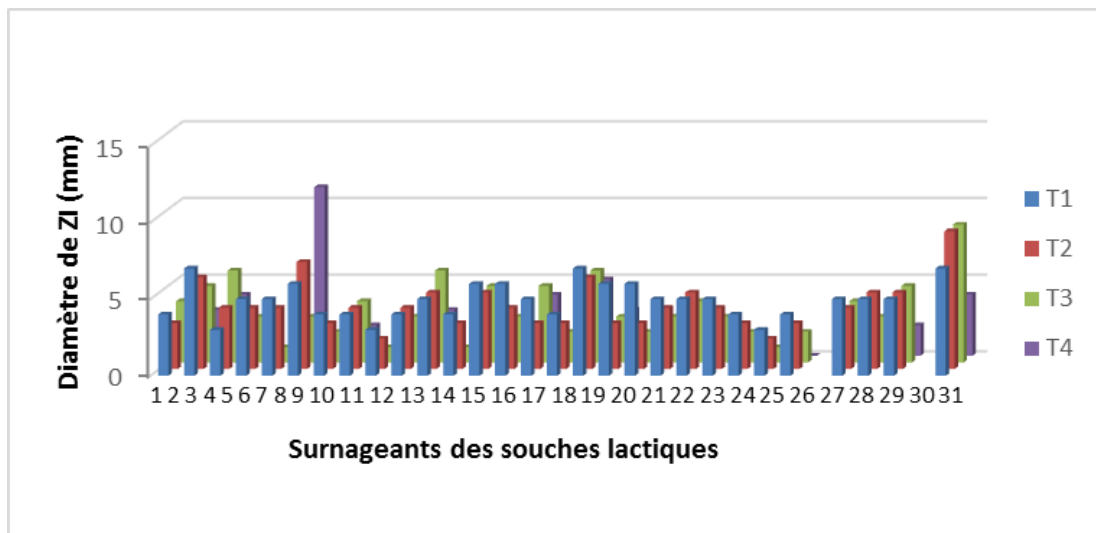
Figure 29 : Exemple de résultats obtenus avec les surnageants traité aux protéases à l'égard de St5.

IV. 3. 2. Traitement thermique

Le test des puits avec les surnageants traités aux protéases a permis de nous renseigner sur la nature de la substance inhibitrice. Pour confirmer ce résultat, un test avec des surnageants ayant subi des traitements thermiques (60°C, 80°C, et 100°C/30min et 121°C/20min) a été réalisé.

➤ **Test des puits à l'égard de PsM**

Ce test a montré sur PsM, une activité avec tous les surnageants après les quatre traitements thermiques effectués. Cependant, une diminution du diamètre des zones est enregistrée après chaque traitement (T1-T4). Les figures 30 et 31 présentent les résultats de ces tests.



T1=60°C/30min T2=80°C/30min T3=100°C/30min T4=121°C/20min

Figure 30 : Diamètre des zones d'inhibition obtenues par le test des puits à l'égard de PsM avec les surnageants traités thermiquement.

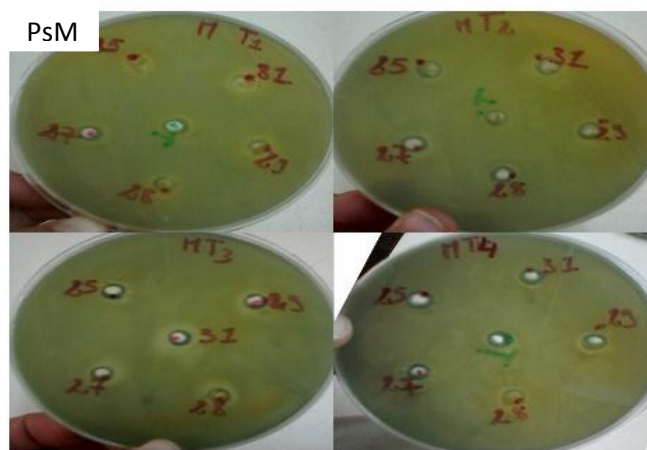


Figure 31 : Exemple de résultats obtenus par les surnageants traité thermiquement à l'égard de PsM.

➤ Test des puits à l'égard de St5

Le test n'a donné aucune zone d'inhibition sur la St5. Ces résultats sont présentés dans les figures 32 et 33.

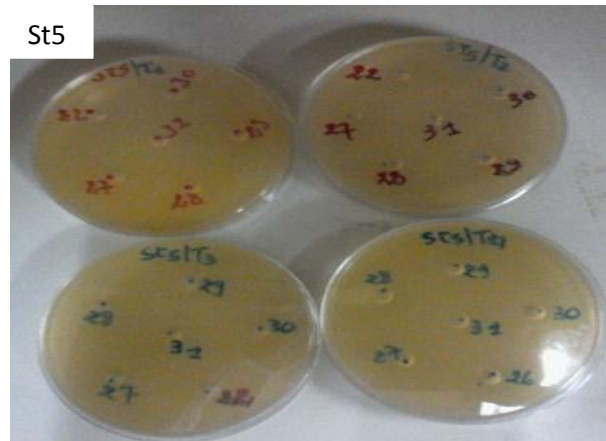


Figure 32 : Exemple de résultats obtenus avec les surnageants traité thermiquement sur St5.

Puisque les bactériocines sont par définition des substances protéiques. Elles doivent être sensibles à au moins à une enzyme. En conséquence, la sensibilité aux enzymes protéolytiques est l'un des principaux critères dans leur caractérisation (**Çon et Gökalp, 2000**).

Après traitement avec des protéases (papaïne et trypsine), les surnageants de toutes les souches testées dans ce test ont gardé leur activité sur PsM avec des diamètres de zones d'inhibition considérablement réduits par rapport aux surnageants non traités. Cela pourrait s'expliquer par une synergie entre une substance de nature protéique ayant perdu sa fonction après le traitement et un autre facteur qui pourrait être le H₂O₂, seul facteur qu'on n'a pas pu éliminer durant le travail. Le H₂O₂ a une activité bactéricide sur les bactéries Gram négatives et bactériostatique sur les bactéries Gram positives (**Krockel, 2013**). Tandis que ces même surnageants ont perdu leur activité sur St 5. Cela stipule que l'activité exercée sur St5 par les surnageants des bactéries lactiques est due à une substance de nature protéique qui, en contact avec les protéinases, a perdu son activité (**Ait Ouali et al., 2014**) sauf pour la souche 22 qui a présenté une zone d'inhibition résiduelle avec la papaïne de 4mm par rapport au surnageant neutralisé qui était de 8mm. Cette zone résiduelle peut avoir plusieurs explications :

-Soit l'agent inhibiteur est une protéine alors son clivage enzymatique conduit à un fragment qui garde une activité partielle.

-Soit l'activité était due à une protéine conjuguée et l'activité inhibitrice est portée par la partie non protéique : dans ce cas les enzymes effectuent la configuration structurelle de la partie protéique ce qui réduit l'activité antagoniste (**Mami, 2013**).

Savado *et al.* (2004), **Hernandez** (2005), **Bendali** (2009) et **Mami** (2013) ont rapporté des résultats similaires à ceux obtenus dans ce travail où ils ont constatés une perte d'activité après traitement aux protéases.

Le traitement thermique des surnageants neutralisés aux différentes températures (60°C, 80°C et 100°C/30min et à 121°C/ 20min) a donné avec la PsM, des zones d'inhibition faibles par rapport aux zones des surnageants neutralisés et qui diminuaient avec l'augmentation de la température, un résultat similaire à celui obtenu par **Hernandez (2005)**. Avec la St5, on assiste à une disparition totale des zones d'inhibition présentes avec les surnageants neutralisés. On peut donc supposer qu'il y'avait une synergie dont le premier composant se dénature petit à petit durant le traitement thermique.

En comparant les résultats obtenus avec St5 et PsM, on peut supposer que le traitement thermique a provoqué une inactivation partielle des bactériocines et celui enzymatique a généré des fragments ayant gardés une activité résiduelle qui sont actifs sur PsM et non sur St5.

V. Antagonisme dans le lait écrémé

L'étude de l'antagonisme de l'une des bactéries lactiques actives à l'égard de St5 est effectuée en culture mixte dans du lait écrémé. Des cultures pures témoins sont également réalisées. Un dénombrement a été réalisé à 0h, 2h, 4h, 6h, et après 24h d'incubation. Les résultats montrent que la souche St5 en culture pure présente une courbe de croissance normale, abordant la phase exponentielle dès le début de la culture. On a assisté à une augmentation du taux cellulaire de la S4 et à une acidification du milieu (coagulation du lait) indiquant une baisse du pH. Dans le cas de la culture mixte de la St5 et S4, St5 marque un temps de latence de 2h puis entre en phase exponentielle et commence à se stabiliser à partir de la 6^{ème} heure. Tandis que la St5 en culture pure continue de croître dans le temps. On constate donc que la S4 pourrait arrêter la croissance de la St5. Après 24h d'incubation en culture mixte une réduction de 10² UFC/mL de St5 a été observée. Vu que la S4 a perdu son

activité avec le surnageant neutralisé, on peut donc conclure que l'activité de la S4 sur St5 est due à l'acidité : acides organiques (**Charlier et al., 2009**) qui sous leur forme non dissociée pénètrent à l'intérieur de la cellule et s'y dissocient aboutissant à des perturbations dans la cellule cible voire sa mort (**Piard et Desmazeaud, 1991**) ou à un autre facteur anti staphylococcique par exemple la compétition pour la biotine et la niacine (**Haines et Harmon, 1973**). Des résultats similaires aux notre ont été rapportés par **Madi (2010)** qui a testé une souche de bactérie lactique sur deux souches de *S.aureus* en culture mixte où la souche lactique s'est montrée hautement antagoniste à l'égard de l'une des souches de *S.aureus*. **Karska-Wysocki et al. (2009)** ont aussi constaté une réduction de $2,9910^3$ du nombre de *S.aureus* multirésistantes en culture mixte avec *Lb casei*.

Rousseau (2004) ; **Charlier et al. (2009)** ont trouvé que certaines bactéries lactiques pouvaient inhiber les *S.aureus* par compétitions nutritives et **Iandolo et al. (1965)** ont montré qu'en culture mixte, la diminution de la disponibilité des nutriments intervenait dans l'inhibition de *S.aureus*. D'autres ont aussi affirmé qu'un pH inférieur à 4 provoque non seulement un arrêt de la croissance mais également une perte de viabilité (**Le Loir et Gantier, 2009**). La figure 34 présente la cinétique de croissance en culture pure et en culture mixte de *S aureus*.

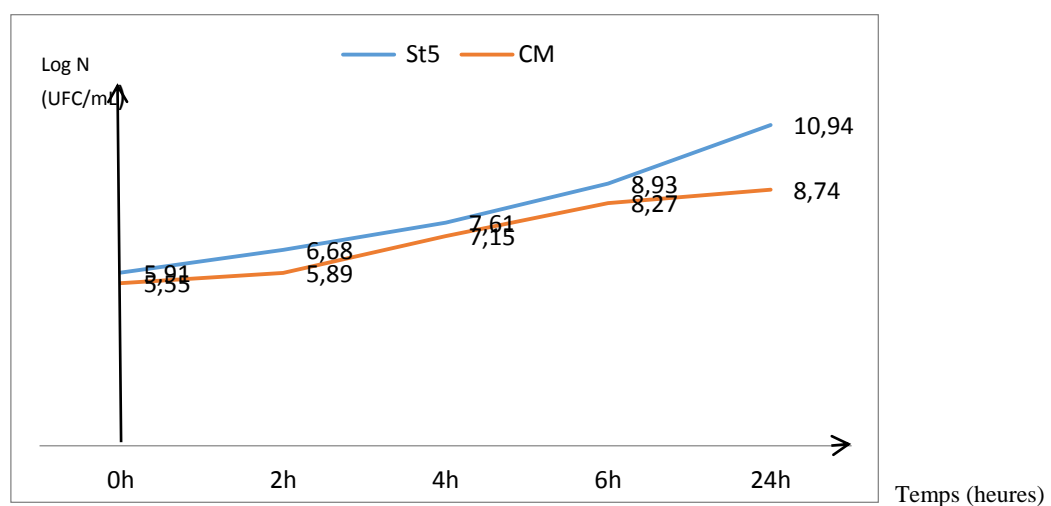


Figure 33 : Cinétique de croissance de St5 en culture mixte avec S4 et en culture pure dans le lait écrémé.

Cette inhibition peut être un moyen d'éviter les toxi-infections à *S.aureus* dans les produits laitiers dans lesquels les souches lactiques peuvent agir comme des bioconservateurs à l'égard des bactéries pathogènes quotidiennes en particulier *S.aureus* et ainsi diminuer l'utilisation de conservateurs chimiques et les traitements thermiques excessifs.

Conclusion

Conclusion

Dans ce travail, nous avons recherché l'activité antibactérienne de 31 souches de bactéries lactiques isolées de produits laitiers artisanaux par la méthode des spots et des puits à l'égard de deux souches de *Staphylococcus aureus* (St2 et St5), trois souches d'*Escherichia coli* Z, B et I et sur deux souches de *Pseudomonas* PsM et PsG toutes également isolées de produits laitiers.

Notre principal but a été de cribler des souches lactiques ayant des propriétés de barrières vis-à-vis des bactéries pathogènes quotidiens des produits laitiers.

Après les séries de tests réalisés, certaines hypothèses sur la nature de l'activité ont été éliminées et d'autres été maintenues :

- **Tests des spots** : Où il y a un contact direct entre les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes a révélé que la majorité des souches lactiques ont une activité sur les bactéries pathogènes utilisées.
- **Tests des puits** : Ce test a été réalisé avec les souches ayant présenté des activités sur les bactéries pathogènes utilisées dans le but de déterminer la nature de l'activité. Ceux ayant présenté des résultats avec ce dernier ont fait l'objet d'un test de puits avec surnageant neutralisé. Les tests ont été poursuivis avec la PsM et la St5 (tests de puits avec surnageants traités aux protéases et traitements thermiques).

Nous sommes arrivées au point où nous pouvons affirmer que certaines de nos souches lactiques disposent de remarquables pouvoirs d'inhibition des bactéries pathogènes mais qui ne sont pas dû aux bactériocines. Les 21 souches lactiques actives sur St5 ont perdu leur activité après traitement aux protéases sauf la souche 22 qui a présenté une ZI= 4mm. Elles ont toutes perdues leur activité avec le traitement thermique élevé 121°C pendant 20min (une des caractéristiques des protéines même celles thermorésistantes). Quant à la *Pseudomonas*, son inhibition était due à la synergie des deux facteurs restants dans le surnageant (H₂O₂ et bactériocines) puisque après traitement thermique, les zones ayant complètement disparue chez St5 ont diminué chez PsM.

La substance active dans les surnageants pourrait être de nature protéique ayant des propriétés antimicrobiennes et thermosensible une caractéristique de quelques bactériocines.

Nous espérons donner suite à ce travail pour l'extraction et la purification de ces molécules tant demandée en industries alimentaire et pharmaceutique.

Références bibliographiques

A

Ait Ouali F, Alkassaa I, Cudennec B, Abdallah M, Bendali F, Sadoun D, Chihib N-D et Drides D. (2014). Identification of Lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stain less steel surfaces. *International Journal of Food Microbiology*. 191, 116-124.

Al-Daihan S et Shafi Bhat R. (2015). Impact of Propionic Acid on Liver Damage in Rats. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 2015 Summer. 4(3), 188-195.

Ammar W, Benbayer-habchi Z, Boukhatem Z F, Alem Y et Bekki A. (2014). Selection and characterization of inhibitor agents (bacteriocins like) produced by rhizobial Algeria. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 7(7), 393-401.

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

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

B

Barfoot S F et Klaenhammer T R. (1973). Detection and Activity of Lactacin B, a Bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied And Environmental Microbiology*. 45(6), 1808-1815.

Beales N. (2004). Adaptation of Microorganisms to cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3, 1-20.

Beliardo E et Thuault D. (1989). Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. In: Bourgeois C M et Larpent J P. *Microbiologie Alimentaire*, Tome 2: les fermentations alimentaires. Lavoisier. Paris. pp282-297.

Bendali F. (2009). Criblage de souches de bactéries lactiques douées d'activité antagoniste à l'égard de *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université A/MIRA de Bejaia. 130p.

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

Brisabois A, Lafarge V, Brouillaud A, de Buyser M L, Collette C, Garin-Bastuji B et Thorel M F. (1997). Pathogenic organisms in milk and milk products: the situation in France and in Europe. *Review Science and Technology*. 16 (2), 452-471.

᠘.

Caplice E et Fitzgerald G F. (1999). Food fermentation : role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50, 131-149.

Cenatiempo Y, Berjeaud J M, Bilet F, Fremaux C, Hechard Y et Robichou D. (1996). Bactériocines de bactéries lactiques : données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. *Lait*. 76, 169-177.

Charlier C, Cretnet M, Even S et Le Loir Y. (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria : An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*. 131, 30-39.

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

Cogan T M, Barbosa M, Beuvier E, Bianchi-Salvadori B , Cocconcelli P S, Fernandez I, Gomez M J et Gomez R. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal dairy*. 64, 409-421.

Çon A H et Gokalp H Y. (2000). Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples. *Meat Science*. 55, 89–96.

᠘.

Daeschel M A, McKenney et McDonald L C. (1990). Bactericidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiology*. 7, 91-98.

De Vos P, Garrity G M , Jones D, Krieg N R , Ludwig W, Rainey F A, Schleifer K-H et Whitman W B. (2009). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Second Edition Volume Three: The Firmicutes*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 1422p.

Dellaglio F, de Roissard H, Torriani S, Curk M C, Janssens D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: De Roissard H et Luquet FM. *Bactéries lactiques*. Volume 1. Loriga: Uriage. pp25-116.

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

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.

Drouault S et **Corthier G.** (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research, BioMed Central.* 32 (2), 101-117.

£.

Ennahar S, **Aoude-Werder D,** **Assobhei O** et **Hasselmann C.** (1998). Antimicrobial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE isolated from cheese. *Journal of Applied Microbiology.* 85, 521-526.

£.

Galvez A, **Abriouel H,** **Lopez R L** et **Ben Omar N.** (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology.* 120, 51-70.

Ganzle M G, **Holtzel A,** **Walter J,** **Jung G** et **Hammes W P.** (2000). Characterization of Reutericyclin Produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Applied and Environmental Microbiology.* 66 (10), 4325-4333.

Garry P et **Le Guern L.** (1999). Les bavteries lactiques. *Bulletin liaison Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes.* 9(6), 423-430.

Guessas B et **Kihal M.** (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African Journal of Biotechnology.* 3 (6), 339-342.

££.

Haines W C, **Armon L G.** (1973). Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Applied Microbiology.* 25, 436-441.

Hunter D R, **Segel I H.** (1973). Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*: evidence for a proton or charge gradient as the driving force. *Journal of Bacteriology.* 113(3), 1184-1192.

Hernandez D, **Cardell E** et **Zarate V.** (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese : initial characterization of plantaricin TF711 A bacteriocin-like Substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology.* 99, 77-84.

£.

Iandolo J J, **Clark C W,** **Bluhm M** et **Ordal Z J.** (1965). Repression of *Staphylococcus aureus* in associative culture. *Applied Microbiology.* 13 (5), 646-649.

£.

Jozala A F, **Novaes L C** et **Junior A P.** (2015). Nisin. Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials. 104-119. <http://dx.doi.org/10.5772/60932>.

K.

Karpinski T M et Szkaradkiewicz A K. (2013). Characteristic of Bacteriocines and their Application. Polish Journal of Microbiology. 62 (3), 223-235.

Karska-Wysocki B, Bazo M et Smoragiewicz W. (2009). *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* agaist methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Microbiological reseach. 2006, 1-13.

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.

Krockel L. (2013). The role of Lactic Acid Bacteria in Safety and Flavour Development of Meat Products. Lactic Acid Bacteria-R and D for Food, Health and Livestock Purposes. 130-152. <http://dx.doi.org/10.5772/51117>.

L.

Labioui H, Elmoualdi L, EL Yachioui M et Ouhssine M. (2005). Séléction de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordreau. 144, 237-250.

Le Bouguenec C et Servin A L. (2006). Difusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/DrDAEC): hitherto unrecognized pathogens. FEMS Microbial lett. 256, 185-194.

Le Loir Y et Gantier M. (2009). *Staphylococcus aureus*. Lavoisier. Paris. 277p.

Ludwing W, Schleifer K-H et Whitman X B. (2009). Order: Lactobacillales. In: De Vos P, Garrity G M , Jones D, Krieg N R , Ludwig W, Rainey F A, Schleifer K-H et Whitman W B. (2009). Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Second Edition Volume Three: The Firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. p464.

M.

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

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

Mami A. (2013). Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliquée dans les toxi-infections alimentaires en

Algérie. Thèse de Doctorat de Microbiologie Appliquée. Université d'Oran, Faculté des Sciences, Oran, 164p.

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

Moon N J. (1983). Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Microbiology*. 55, 453-460.

Morisset D Berjaud J M, Frere J et Héchard Y. (2005). Bacteriones des bactéries lactiques. In : Luquet F-M et Corrieu G. Bactéries lactiques et probiotiques. Lavoisier. Paris. pp113-194.

N.

Nobmann P, Smith A, Dunne G, Henahan G et Bourke P. (2009). The antibacterial efficacy and structure activity relationship of novel carbohydrate fatty acid derivatives against *Listeria* spp. and food spoilage microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 128, 440-445.

Novel G. (1993). Les bactéries lactiques. In : Leveau J Y et Bouix M. Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier. Paris. pp170-331.

P.

Parsons J B, Yao J, Frank M W, Jackson P et Rock C O. 2012°. Membrane Disruption by Antimicrobial Fatty Acids Releases Low-Molecular-Weight Proteins from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 194(19), 5294-5304.

Perez R, Zendo et Sonomoto K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB) Various structures and applications. *Microbial Cell Factories*. 13 Suppl 1 : S3.

Petschow B W, Batema R P et Ford L L. (1996). Susceptibility of *Helicobacter pylori* to Bactericidal Properties of Medium-Chain Monoglycerides and Free Fatty Acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Feb. 40(2), 302-306.

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

Piard J C et Desmazeaud M. (1992). Inhibiting factors produced by acid lactic bacteria. 2. Bacteriocins and other antimicrobial substances. *Lait*. 72, 132-142.

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

Privat K et Thonart P. (2011). Action des cultures protectrices : Cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 15(2), 339-348.



Rodriguez J M, Martinez M I, Horn N et Dodd H M. (2003). Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 80, 101-116.

Rousseau V. (2004). Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale. Thèse de Doctorat en sciences Ecologiques Vétérinaire Agronomiques et Bioingénieries. Institut National des Sciences Appliquées de Toulous, France. 186p.



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

Savadogo A et Traore A S. (2011). La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 5(5), 2057-2075.

Schillinger U, Geisen R et Holzapfel W H. (196). Potentel of antagonistic microorganisms 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.

Shnurer J et Magnusson J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as bioconservatives. *Trends in Food Sciences et Technology*. 16, 70-78.

Shleifer K-H. (2009). Family I. Lactobacillaceae. In: De Vos P, Garrity G M , Jones D, Krieg N R , Ludwig W, Rainey F A, Schleifer K-H et Whitman W B. (2009). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Second Edition Volume Three: The Firmicutes*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. p465.



Tabak S et Bensoltane A. (2011). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature et technologie*.(6), 71-79.

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

Titiek F D, Endang S R, Djoko W et Slamet S. (1996). Antimicrobial Substance Produced by *Lactobacillus* sp. TGR-2 Isolated From Growof. Indonesian Food and Nutrition Progress. 3(2), 29-34.

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

Y.

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

Z.

Zacharof M R et Lovitt R W. (2012^o). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. Asia-Pacific Chemical, biological and Environmental Engineering Procedia. 2, 50-56.

Zagorec M et Christians S. (2013). Flore protectrice pour la conservation des aliments. QUAI .Paris.145p.

Zendo T. (2013). Screening and Characterization of Novel Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. Bioscience. Biotechnology, and Biochemistry. 77 (5), 893-899.

Annexes

Annexe I. Résultats

Tableau I : Test de spots à l'égard de St5.

Souches lactiques	Essai 1	Essai 2	Moyenne
1	10	20	15
2	2	18	10
3	3	20	11,5
4	12	22	17
5	6	18	12
6	4	16	10
7	6	16	11
8	2	14	8
9	12	16	14
10	10	20	15
11	5	20	12,5
12	12	20	16
13	4	10	7
14	0	18	9
15	0	12	6
16	10	10	10
17	6	16	11
18	2	12	7
19	4	14	9
20	4	16	10
21	8	14	11
22	8	16	12
23	8	20	14
24	8	16	12
25	4	20	12
26	4	18	11
27	8	16	12
28	4	16	10
29	4	12	8
30	6	14	10
31	8	12	10

Tableau II : Test des spots à l'égard de St2.

Souches lactiques	Essai 1	Essai 2	Moyenne
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	6	3
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	16	8
11	0	0	0
12	0	8	2
13	0	6	3
14	0	11	5,5
15	0	24	12
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	20	0	10
20	18	18	18
21	18	18	9
22	18	18	18
23	20	19	19,5
24	4	19	11,5
25	0	0	0
26	0	0	0
27	0	0	0
28	10	0	5
29	0	0	0
30	0	0	0
31	0	0	0

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

Souches lactiques	<i>E.coli B</i>	<i>E.coli I</i>	<i>E.coli Z</i>
1	5	0	9
2	15	0	6
3	13,5	0	4
4	15,5	8	6
5	14	6	0
6	13	8	0
7	13,5	0	8
8	17	0	6
9	12	0	0
10	17	24	0
11	14	28	0
12	14	16	0
13	9	0	0
14	11	0	0
15	12	0	0
16	13	0	0
17	8,5	24	12
18	14	22	9
19	18	14	0
20	7,5	14	0
21	9	14	0
22	10	10	20
23	7	14	0
24	6	12	18
25	7	12	7
26	5,5	0	8
27	12	12	0
28	5	10	0
29	12	10	0
30	14	10	0
31	16	14	0

Tableau IV : Test des spots à l'égard de *Pseudomonas*.

Souches lactiques	Ps M	Ps G
1	16	18
2	12	14
3	22	16
4	18	12
5	18	24
6	32	26
7	30	14
8	32	10
9	28	12
10	30	8
11	24	24
12	28	14
13	12	20
14	20	24
15	30	18
16	30	14
17	29	28
18	28	30
19	18	22
20	18	30
21	20	20
22	24	32
23	26	18
24	28	28
25	20	26
26	18	24
27	18	32
28	24	20
29	6	26
30	20	14
31	18	28

Tableau V : Test des puits avec le surnageant natif à l'égard d'*E coli* I.

Souches lactiques	Essai 1	Essai2	Moyenne
1	10	8	9
2	6	6	6
3	8	10	9
4	12	7	9,5
5	4	10	7
6	6	10	8
7	4	10	7
8	6	6	6
9	4	7	5,5
10	2	11	6,5
11	2	9	5,5
12	2	8	5
13	0	8	4
14	0	4	2
15	6	10	8
16	0	0	0
17	8	7	7,5
18	6	4	5
19	8	7	7,5
20	6	5	5,5
21	0	0	0
22	0	0	0
23	0	0	0
24	0	0	0
25	0	0	0
26	0	0	0
27	0	0	0
28	0	0	0
29	2	0	1
30	6	0	3
31	0	0	0

Tableau VI : Test des puits avec le surnageant natif à l'égard de St5.

Souches lactiques	Essai1	Essai2	Essai3	Moyenne
1	16	4	6	8,666
2	14	4	6	8
3	12	3	5	6,666
4	12	4	10	8,666
5	16	4	6	8,666
6	10	3	10	7,666
7	9	5	9	7,666
8	5	3	8	5,333
9	8	5	8	7
10	10	4	7	7
11	8	3	7	6
12	7,5	1	8	5,5
13	6	1	6	4,333
14	8	2	5	5
15	6	5	4	5
16	8	4	5	5,666
17	4,5	4	10	6,166
18	6	3	6	5
19	5	3	9	5,666
20	10	2	4	5,333
21	11	0	5	5,333
22	5	0	6	3,666
23	6	0	8	4,666
24	12	0	5	5,666
25	4	3	0	2,333
26	0	1	6	2,333
27	3	0	8	3,666
28	2,5	4	7	4,5
29	3	3	7	4,333
30	0	5	6	3,666
31	11	10	9	10

Tableau VII : Test des puits avec le surnageant natif à l'égard de St2.

Souches lactiques	Essai1	Essai2	Moyenne
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	6	0	3
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	0
22	0	0	0
23	0	0	0
24	0	0	0
25	0	0	0
26	0	0	0
27	0	0	0
28	0	0	0
29	0	0	0
30	0	0	0
31	0	0	0

Tableau VIII : Test des puits avec surnageant natif sur *E.coli* B et Z.

Souches lactiques	<i>E.coli</i> Z	<i>E.coli</i> B
1	3,5	4
2	4	8
3	4	5
4	4	4
5	1,5	3
6	4	2
7	4	4
8	4,5	5
9	4	4
10	7	4
11	4	2
12	3	2
13	4	1
14	6,5	0
15	5	5
16	1	1
17	4	2
18	1	3
19	6	1
20	3,5	0
21	0	0
22	0	0
23	2	1
24	0	0
25	1	0
26	1	0
27	0	0
28	0	1
29	3	0
30	4	2
31	1	1

Tableau IX : Test des puits avec surnageant natif sur PsM et PsG.

Souches lactiques	PsM	PsG
1	6	19
2	13	18
3	16	22
4	14	18
5	8	17
6	9	22
7	9	18
8	9	17
9	5	14
10	5	20
11	6	17
12	5	18
13	12	20
14	8	21
15	8	27
16	6	22
17	9	18
18	6	24
19	5	21
20	6	23
21	7	14
22	9	18
23	7	18
24	2	16
25	0	12
26	5	15
27	7	22
28	6	7
29	5	15
30	6	21
31	7	23

Tableau X : Test des puits avec le surnageant neutralisé.

Souches lactiques	St5	<i>E.coli</i> Z	PsM	PsG
1	0	0	24	2
2	5	3	22	2
3	4	3	24	7
4	0	3	15	0
5	0	1	28	0
6	4	3	18	5
7	3	0	15	3
8	2	3	30	4
9	3	4	18	2
10	4	2,5	20	0
11	3	4	14	5
12	5	3	20	5
13	3	0	28	7
14	1	0	27	2
15	2	3	26	6
16	4	0	25	2
17	4	1	23	1
18	0	4	19	5
19	6	2	20	6
20	0	0	26	0
21	0	0	20	0
22	2	0	16	8
23	0	0	24	2
24	0	0	22	0
25	0	0	27	0
26	0	1,5	0	0
27	6	0	17	2
28	7	0	14	3
29	6	5	19	0
30	6	4,5	0	6
31	6	1	21	5

Tableau XI : Test des puits avec surnageant traité à l'égard de PsM.

Souches lactiques	Traitement enzymatique		Traitement thermique			
	Papaïne	Trypsine	T1	T2	T3	T4
1	1	5	4	3	4	3
2	2	9	7	6	5	3
3	3	4	3	4	6	4
4	4	3	5	4	3	2
5	2	2	5	4	1	4
6	5	4	6	7	3	11
7	4	3	4	3	2	2
8	3	5	4	4	4	2
9	4	4	3	2	1	1
10	4	3	4	4	3	3
11	4	1	5	5	6	3
12	5	4	4	3	1	2
13	2	3	6	5	5	3
14	4	2	6	4	3	2
15	2	7	5	3	5	4
16	3	3	4	3	2	2
17	5	1	7	6	6	5
18	2	3	6	3	3	3
19	1	5	6	3	2	1
20	0	1	5	4	3	1
21	0	2	5	5	4	3
22	3	2	5	4	3	1
23	3	3	4	3	2	1
24	4	4	3	2	1	1
25	3	4	4	3	2	0
26	-	-	-	-	-	-
27	2	2	5	4	4	2
28	4	3	5	5	3	3
29	2	4	5	5	5	2
30	-	-	-	-	-	-
31	3	5	7	9	9	4

Tableau XII : Test des puits avec surnageant traité à l'égard de St5.

Souches lactiques	Traitement enzymatique		Traitement thermique			
	Papaïne	Trypsine	T1	T2	T3	T4
1	-	-	-	-	-	-
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	-	-	-	-	-	-
19	0	0	0	0	0	0
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-
22	4	0	0	0	0	0
23	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
27	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0

T1=60°C/30min, T2=70°C/30min, T3=80°C/30min, T4=121°C/20min

Tableau XIII : Tableau comparatif des résultats obtenus avec le test des puits à l'égard d'*E.coli* Z, PsG, St5 et PsM.

Surnageants	<i>E.coli</i> Z		PsG		St5								PsM		PsM							
	Natifs	Neutrasés	Natifs	Neutrasés	Natifs	Neutrasés	Traitement						Natifs	Neutrasés	Traitement							
							thermique				Enzymatique				Thermique				Enzymatique			
							T1	T2	T3	T4	Trypsine	Papaine			T1	T2	T3	T4	Trypsine	Papaine		
1	3,5	0	19	2	8,666	0	-	-	-	-	-	-	6	24	4	3	4	3	5	1		
2	4	3	18	2	8	5	0	0	0	0	0	0	13	22	7	6	5	3	9	2		
3	4	3	22	7	6,666	4	0	0	0	0	0	0	16	24	3	4	6	4	4	3		
4	4	3	18	0	8,666	0	-	-	-	-	-	-	14	15	5	4	3	2	3	4		
5	1,5	1	17	0	8,666	0	-	-	-	-	-	-	8	28	5	4	1	4	2	2		
6	4	3	22	5	7,666	4	0	0	0	0	0	0	9	18	6	7	3	11	4	5		
7	4	0	18	3	7,666	3	0	0	0	0	0	0	9	15	4	3	2	2	3	4		
8	4,5	3	17	4	5,333	2	0	0	0	0	0	0	9	30	4	4	4	2	5	3		
9	4	4	14	2	7	3	0	0	0	0	0	0	5	18	3	2	1	1	4	4		
10	7	2,5	20	0	7	4	0	0	0	0	0	0	5	20	4	4	3	3	3	4		
11	4	4	17	5	6	3	0	0	0	0	0	0	6	14	5	5	6	3	1	4		
12	3	3	18	5	5,5	5	0	0	0	0	0	0	5	20	4	3	1	2	4	5		
13	4	0	20	7	4,333	3	0	0	0	0	0	0	12	28	6	5	5	3	3	2		
14	6,5	0	21	2	5	1	0	0	0	0	0	0	8	27	6	4	3	2	2	4		
15	5	3	27	6	5	2	0	0	0	0	0	0	8	26	5	3	5	4	7	2		
16	1	0	22	2	5,666	4	0	0	0	0	0	0	6	25	4	3	2	2	3	3		
17	4	1	18	1	6,166	4	0	0	0	0	0	0	9	23	7	6	6	5	1	5		
18	1	4	24	5	5	0	-	-	-	-	-	-	6	19	6	3	3	3	3	2		
19	6	2	21	6	5,666	6	0	0	0	0	0	0	5	20	6	3	2	1	5	1		
20	3,5	0	23	0	5,333	0	-	-	-	-	-	-	6	26	5	4	3	1	1	0		
21	0	0	14	0	5,333	0	-	-	-	-	-	-	7	20	5	5	4	3	2	0		
22	0	0	18	8	3,666	2	0	0	0	0	0	4	9	16	5	4	3	1	2	3		
23	2	0	18	2	4,666	0	-	-	-	-	-	-	7	24	4	3	2	1	3	3		
24	0	0	16	0	5,666	0	-	-	-	-	-	-	2	22	3	2	1	1	4	4		
25	1	0	12	0	2,333	0	-	-	-	-	-	-	0	27	4	3	2	0	4	3		
26	1	1,5	15	0	2,333	0	-	-	-	-	-	-	5	0	-	-	-	-	-	-		
27	0	0	22	2	3,666	6	0	0	0	0	0	0	7	17	5	4	4	2	2	2		
28	0	0	7	3	4,5	7	0	0	0	0	0	0	6	14	5	5	3	3	3	4		
29	3	5	15	0	4,333	6	0	0	0	0	0	0	5	19	5	5	5	2	4	2		
30	4	4,5	21	6	3,666	6	0	0	0	0	0	0	6	0	-	-	-	-	-	-		
31	1	1	23	5	10	6	0	0	0	0	0	0	7	21	7	9	9	4	5	3		

Tableau XIV : Cinétique de croissance de St5 en culture pure (Log N (UFC/mL)).

Temps	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart type
0h	5,1	6,08	6,54	5,91	0,69
2h	5,57	8,21	6,25	6,68	1,87
4h	7,11	8,47	7,24	7,61	0,96
6h	9	9,37	8,43	8,93	0,26
24h	10,41	11,47	-	10,94	0,75

Tableau XV : Cinétique de croissance de St5 en culture mixte avec S4 (Log N (UFC/mL)).

Temps	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart type
0h	5,1	6,11	5,43	5,55	0,52
2h	5,37	6,2	6,09	5,89	0,45
4h	6,84	7,5	7,1	7,15	0,33
6h	8,41	8,24	8,17	8,27	0,12
24h	8,09	9,38	-	8,74	0,91

Annexe II. Composition des milieux des cultures utilisés**Tableau I** : Gélose Chapman.

Composition	Quantité (g/l)
Pancreatic digest of casein	5
Peptic digest of animal tissue	5
Extrait de viande	1
D Mannitol	10
Chlorure de sodium	75
Agar	15
Rouge phénol	0,025
pH final	7,4

Tableau II : Gélose et bouillon nutritive.

Composition	Quantité (g/l)
Peptone de viande	10
Extrait de viande	3
Extrait de levure	3
Chlorure de sodium	5

Agar	18
pH final	7,2

Tableau III : Gélose et bouillon MRS.

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

Tableau IV : Gélose et bouillon M17.

Composition	Quantité (g/l)
Peptone de soja	5
Peptone de viande	2,5
Tryptone	2,5
Extrait de levure	5
Extrait de viande	5
Lactose	5
Acide ascorbique	0,5
Glycérophosphate de sodium	19
Sulfate de magnésium	0,25
Agar	20
pH final	7,2

Tableau V : Gélose EMB.

Composition	Quantité (g/l)
Peptone	10
Lactose	5
Sucrose	5
Phosphate dipotassium	2
Eosine Y	0,4
Bleu de méthylène	0,065
Agar	13,5
pH final	7,2

Tableau VI : Milieu Mueller Hinton.

Composition	Quantité (g/l)
Extrait de viande	2
Hydrolysate acide de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	10
pH final	7,4

Tableau VII : Gélose PCA (Plate Count Agar).

Composition	Quantité (g/l)
Tryptone	5
Glucose	1
Extrait de levure	2,5
Agar	15
pH final	7,0

Tableau VIII : Peroxyde d'hydrogène 30%.

Composition	Quantité (%)
Assay	Min.28 max.33
Free acids (as H ₂ SO ₄)	max.0, 01
Residue on Evaporation	max.0, 01
Nitrogen (N)	max. 0, 005
Chlorides (Cl)	max.0, 001
Phosphates (PO ₄)	max. 0, 003
Sulfates (SO ₄)	Max. 0, 001

Tableau IX : Eau peptone exemple d'indole.

Composition	Quantité (g/L)
Peptone	10
Tryptone	10
Chlorure de sodium	5
pH final	7,2

Tableau X : Eau physiologique.

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

NB :

-Pour les milieux M17, MRS et GN, l'agar n'est ajouté que dans le cas des milieux gélosés.

-Les milieux ont subi un autoclavage à 121°C pendant 20min.

Résumé

Au cours de cette étude, l'activité antibactérienne de trente et une (31) souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits laitiers artisanaux, a été testée sur sept (7) souches pathogènes : 2 souches de *S.aureus*, 3 souches d'*E.coli* et 2 souches de *Pseudomonas*. Le criblage de souches lactiques dotées d'un pouvoir antibactérien a été mis en évidence par le test des spots ; les souches ayant présenté des zones d'inhibition ont fait l'objet d'un deuxième test, celui des puits. Pour déterminer la nature de l'effet antibactérien, des tests de puits ont été réalisés avec des surnageants de culture neutralisés. Ceux ayant donné une zone d'inhibition sont traités à des températures variées : 60°C, 80°C, 100°C/30min et à 121°C/20min et par des protéases : trypsine et la papaïne. Ces tests ont révélé l'apparition de zones d'inhibition avec *Pseudomonas* M et une disparition des zones de St5.

D'après les résultats de ces tests, les surnageants testés contiennent des substances qui pourraient être de nature protéique.

Mots clés: bactéries lactiques, *S.aureus*, *Pseudomonas*, *E.coli*, activité antibactérienne.

Abstract

In this study, the antibacterial activity of thirty-one (31) lactic acid bacteria strains isolated from artisanal dairy products, has been tested on seven (7) pathogenic strains : two strains of *S.aureus*, 3 strains of *E.coli* and two strains of *Pseudomonas*. Screening lactic strains with anti-bacterial power has been highlighted by the agar spot test; strains having presented inhibition zones were subject to a second test, the agar well diffusion assay. To determine the nature of the antibacterial effect, well tests were carried out with culture supernatants neutralized. Those which gave a zone of inhibition are treated at various temperatures : 60°C, 80°C, 100°C/30min, 121°C/20min and proteases : trypsin and papain. These tests revealed the appearance of inhibition zones with *Pseudomonas* M and a loss of those of *S.aureus* 5.

From the results of these tests, the tested supernatants contain substances which may be of proteic nature.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Staphylococcus aureus* , *Pseudomonas*, *E.coli* , antibacterial activity.