

N°Ref :.....

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème :

Activité antimicrobienne des Bactéries lactiques

Présenté par :

- HADJAZZEM Bisma.
- MAZOUZ Maroua.

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{me} RABHI Nour El Houda (MCB) Centre Universitaire de Mila

Examinatrice : M^{me} AMARI Salima (MAA) Centre Universitaire de Mila

Promotrice : M^{elle} Hadeb Sawsen (MAA) Centre Universitaire de Mila

Année Universitaire: 2020/2021

Remerciement

En premier lieu, nous tenons à remercier notre Dieu, notre créateur pour nous avoir donné la force pour accomplir ce travail.

*Nous exprimons nos profonds remerciements et nos vives reconnaissances à **Melle. Hadeb sawsen**. Maître Assistante au Centre Universitaire de Mila pour avoir accepté de diriger et de réaliser ce travail. Nous vous remercions pour votre confiance, votre soutien et votre disponibilité. Vos qualités morales, intellectuelles et surtout votre intérêt pour la science forcent le respect et l'admiration .*

*Nous exprimons également nos vifs remerciements à **Mme. Rabhi Nour El Houda** Maître de conférences au Centre Universitaire de Mila d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury de notre mémoire. Votre simplicité et votre modestie sont à la dimension de votre envergure scientifique .*

*Nous tenons à exprimer notre vive reconnaissance à **Mme. Amari Salima** Maître Assistante au Centre Universitaire de Mila pour avoir accepté de juger ce travail et nous honorer de sa présence. Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance à ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail .*

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À :

Mes chers parents, pour leurs dévouements,

leurs amours, leurs sacrifices leurs encouragements

leurs tendresses, leurs soutiens et leurs prières tout au long de mes études.

pour toute leurs présences dans ma vieJusqu'au bout,

À la source de la tendresse de patience et de générosité, la flamme de mon cœurma

mère "Kaouache Naima", qui m'appris que la patience estle Secret du succès.

À la lumière de mes jours, la source de mes efforts mon père "Nour Eddine",

À mes chères sœurs Naredjes, Sara, Khawla, Sabrina Mon seul frère Zakariya

pour leurs encouragements et pour leurs aidesdans les moments difficiles

mes niècesArwa , Riham , ZinebMon neveuAdem, Didoqui m'a soutenu durant

toute la durée de réalisation de ce travail

Toute ma grande famille surtout ma grand-mère Horia

À mes chères amiesHela: Amira, Imen, Romaissa , Lilia, qui n'ont pas cessé de

m'encourager.

À mon cher binôme Besma pour le travail que nous avons fourniEt à tous mes

camarades de C.U.M.



Maroua





Dédicaces

*Avant toute chose, je remercie ALLAH qui ma donné la
patience, le courage pour réaliser ce mémoire*

Je dédie ce modeste travail à :

*Mon père à qui je dois le grand amour et le profond respect.
A l'être le plus chère à mon cœur, ma mère, qui a toujours cru en
moi.*

Mon frère Hasni qui est tous ce que j'ai dans ma vie.

*Mes chères cousines Amani, Rania et Ines qui ont été
toujours à mes cotés pour me soutenir et me donner le
courage.*

Mes chères amies : Hanine, Amira, Imane et chaima.

*À mon cher binôme Maroua pour le travail que nous avons
fourni*

*Enfin, à ceux qui m'ont soutenu et aidé de près ou de loin à
réaliser ce travail.*



Besma

Activité antimicrobienne des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très utilisées en industrie agroalimentaire grâce à leur rôle dans la fermentation et la conservation des aliments par production de plusieurs facteurs inhibiteurs. Dans le but de mettre en évidence l'effet antimicrobien de telles bactéries, nous avons étudié le pouvoir antagoniste de trois souches lactiques locales d'origine laitier du genre *Lactobacillus* vis-à-vis de cinq souches pathogènes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Nous avons aussi réalisé un test de coexistence pour étudier le type d'interaction entre ces souches lactiques.

L'activité antimicrobienne a été réalisée suivant deux méthodes : la méthode des spots et des disques. Les résultats ont révélé que toutes les souches de *Lactobacillus* testées produisent et excrètent dans le milieu de culture des substances inhibitrices capables d'inhiber la croissance des cinq souches pathogènes. Ceci est observé par l'apparition des zones d'inhibition importantes avec des diamètres différents s'étalant entre 7 et 21mm, soit pour le contact direct ou indirect (le surnageant natif et neutralisé) . Le test de coexistence montre que les trois souches *Lactobacillus* testées ont été symbiotiques et n'exercent pas une activité inhibitrice entre elles, ce qui permet leurs utilisations comme ferment, agent de conservation ou probiotique.

Mots clé : Bactéries lactiques ; *Lactobacillus* ; activité antimicrobienne ; substance inhibitrice ; souches pathogènes.

Antimicrobial activity of lactic acid bacteria

The use of lactic acid bacteria in food industry is due to the important role played by these bacteria in the fermentation and preservation of food by the production of several inhibitory factors. To demonstrate the antimicrobial effect of such bacteria, we have studied the antagonist power of three local lactic acid bacteria of *Lactobacillus* genus against five indicator strains: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*. We also conducted a coexistence test to study the interaction type between these LAB. Antimicrobial activity was performed using two methods: the spot and disc method.

The results revealed that all strains of *Lactobacillus* tested produce and excrete inhibiting substances in the culture medium that inhibit the growth of the five pathogenic strains. This is observed by the appearance of significant inhibition zones with different diameters ranged from 7 to 21mm for either direct contact or for native and neutralized supernatant. The coexistence test showed that the three *Lactobacillus* strains tested were symbiotic and do not exert any inhibitory activity between them, which allows their uses as a ferment, conservative or probiotic.

Keywords: Lactic acid bacteria ; *Lactobacillus* ; Antimicrobial activity; inhibitory substance ; pathogenic strains.

النشاط المضاد للميكروبات لبكتيريا حمض اللاكتيك

تستخدم بكتيريا حمض اللاكتيك على نطاق واسع في صناعة الأغذية بسبب دورها في تخمير الأطعمة وحفظها من خلال إنتاج عدة عوامل مثبطة. ولكي نبين التأثير المثبط لمثل هذه البكتيريا ، قمنا بدراسة القوة المضادة لثلاث سلالات محلية من بكتيريا حمض اللاكتيك معزولة من الحليب ضد خمس سلالات ممرضة: "*Staphylococcus aureus*" ، "*Escherichia coli*" ، "*Salmonella gallinarum*" ، "*Bacillus cereus*" ، "*Pseudomonas aeruginosa*" كما أجرينا اختبار التعايش لدراسة نوع التفاعل بين سلالات حمض اللاكتيك.

تم إجراء النشاط المضاد للميكروبات باستخدام طريقتين: طريقة البقعة والقرص ، حيث أظهرت النتائج أن جميع سلالات *Lactobacillus* المختبرة تنتج وتفرز في وسط الاستزراع مواد فعالة قادرة على تثبيط نمو السلالات الخمسة المسببة للأمراض، ويلاحظ ذلك من خلال ظهور مناطق كبيرة من التثبيط بأقطار مختلفة تتراوح بين 7 و 21 ملم سواء بالاتصال المباشر أو ناتج الترشيح . يُظهر اختبار التعايش أن سلالات *Lactobacillus* الثلاث التي تم اختبارها كانت تكافلية ولا تمارس نشاطاً مثبطاً فيما بينها ، مما يسمح باستخدامها كخميرة أو كمادة حافظة.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك ، النشاط المضاد للميكروبات ، *Lactobacillus* ، مواد مثبطة ، السلالات المسببة للأمراض.

Table des matières

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

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Les bactéries lactiques

I.1.1.Généralités.....	03
I.1.2.Définition	03
I.1.3.Habitat	03
I.1.4.Classification des bactéries lactiques.....	04
I.1.4.1.Le genre <i>Lactobacillus</i>	04
I.1.4.2. Le genre <i>Lactococcus</i>	07
I.1.4.3.Le genre <i>Bifidobacterium</i>	08
I.1.4.4.Le genre <i>Streptococcus</i>	09
I.1.4.5. Le genre <i>Enterococcus</i>	10
I.1.5.Métabolisme des bactéries lactiques.....	11
I.1.5.1. Métabolisme des carbohydrates.....	11
I.1.5.2.Métabolisme protéolytique.....	13
I.1.5.3.Métabolisme lipolytique	14
I.1.5.4. Métabolisme du citrate	14
I.1.6.Intérêts et applications industrielles des bactéries lactiques.....	17
I.1.6.1.Domaine alimentaire	17
I.1.6.2.Domaine thérapeutique.....	17
I.1.6.3.Domaine Cosmétique	18
I.1.6.4.Domaine Industrielle.....	18

Chapitre 2 : Activités antimicrobiennes

I.2.1.Les interactions entre les microorganismes.....	19
I.2.1.1. Interactions positives.....	19

I.2.1.2. Interactions négatives	19
I.2.2. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques	19
I.2.3. Les métabolites antimicrobiens non peptidiques.....	21
I.2.3.1. Les acides organiques.....	21
I.2.3.2. Le peroxyde d'hydrogène.....	21
I.2.3.3. Le dioxyde de carbone	21
I.2.3.4. Reutérine.....	21
I.2.3.5. Le diacétyl.....	22
I.2.4. Les métabolites antimicrobiens peptidiques : Les bactériocines.....	22
I.2.4.1. Définition.....	22
I.2.4.2. Classification des bactériocines	23
I.2.4.2.1. Bactériocine de classe I : lantibiotiques.....	23
I.2.4.2.2. Bactériocines de classe II : les peptides non modifiés	23
I.2.4.2.3. Bactériocines de classe III : Bactériolysines	24
I.2.4.2.4. Bactériocines de Classe IV : Bactériocine complexe	24
I.2.4.3. La biosynthèse des bactériocines.....	24
I.2.4.4. Mode d'action de bactériocine.....	25
I.2.4.5. Applications potentielles des bactériocines.....	26
I.2.4.5.1. Domaine alimentaire.....	26
I.2.4.5.2. Domaine thérapeutique	27
I.2.4.5.3. Domaine vétérinaire	28
I.2.4.5.4. Domaine agricole	28

Etude expérimentale

Matériels et méthodes

II. Matériels et méthodes.....	29
II.1. Matériels.....	29

II.1.1.Matériels biologiques.....	29
II.1.1.1.Les souches cibles	29
II.1.1.2.Les souches de références	29
II.1.2.Milieus de culture	30
II.1.3. Appareillage.....	30
II.1.4. Réactifs, colorants et autres	30
II.2. Méthodes.....	31
II.2.1. Revivification et purification des souches bactériennes.....	31
II.2.2.Conservation des isolats.....	32
II.2.2.1.Conservation à court terme.....	32
II.2.2.2.Conservation à long terme.....	32
II.2.3.Confirmation de la pureté	32
II.2.3.1.Examen macroscopique	32
II.2.3.2.Examen microscopique	32
II.2.3.3.Recherche de la catalase.....	33
II.2.4.Etude des interactions bactériennes	33
II.2.4.1. Test de coexistence.....	33
II.2.5. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	33
II.2.5.1. Préparation des suspensions bactériennes.....	34
II.2.5.2. Méthode des spots.....	34
II.2.5.3. Méthode des disques	34
II.2.5.4.Activité inhibitrice du surnageant.....	35
II.2.5.4.1.Préparation des surnageants	35
II.2.5.4.2.Effet du surnageant natif et neutralisé	35

Résultat et discussion

III. Résultat et discussion.....	36
----------------------------------	----

III.1.Revivification et confirmation de la pureté des souches.....	36
III.1.1. Les bactéries lactiques.....	36
III.1.1.1.Examen macroscopique	36
III.1.1.2. Examen microscopique.....	37
III.1.2. Les bactéries pathogènes de référence.....	38
III.1.2.1.Examen macroscopique	38
III.1.2.2. Examen microscopique.....	39
III.2.Les interactions entre les bactéries lactiques	42
III.3.Activité antimicrobienne des souches lactiques.....	43
III.3.1.Méthode des spots.....	43
III.3.2.Méthode des disques.....	44
III.3.3.Activité inhibitrice du surnageant	47
III.3.3.1.Cas de surnageant natif.....	50
III.3.3.2. Cas de surnageant neutralisé.....	51
III.4.Comparaison entre d'activité des LB vis-à-vis les souches pathogènes en utilisant la méthode des disques et des puits.....	53
Conclusion et perspectives	57

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

N°	Intitulé	Page
1	Métabolites antimicrobiens de faible masse moléculaire secrétés par les bactéries lactiques autres que les bactériocines	20
2	Souches de bactéries lactiques utilisées	29
3	Souches de références utilisées	30
4	Observation macroscopique des bactéries lactiques sur milieu MRS.	36
5	Observation microscopique des souches lactiques	37
6	Observation macroscopique des bactéries pathogènes	39
7	Observation microscopique des bactéries pathogènes	40
8	Interactions entre les bactéries lactiques	42
9	Illustration de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques (LB 1, LB 2 et LB 3) vis-à-vis des souches pathogènes par méthode des disques	45
10	Illustration de l'effet inhibiteur des surnageants natif et neutralisé (LB 1, LB 2 et LB 3) vis-à-vis les souches pathogènes par la méthode des puits	48
11	variation de pH après 6 h et 24h	51

Liste des figures

N°	Intitulé	Page
1	Arbre phylogénique des bactéries lactiques	5
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	6
3	Nouvelle classification de <i>Lactobacillus</i>	7
4	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>crimoris</i> au microscope électronique	8
5	<i>Bifidobacterium sp</i>	9
6	<i>Streptococcus thermophilus</i> au microscope électronique	9
7	<i>Enterococcus faecalis</i> au microscope électronique	10
8	La fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voies Homo et Hétérofermentaire	12
9	Le système protéolytique chez LAB	13
10	Principales voies de la lipolyse	14
11	Le métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques	16
12	Mode d'action des bactériocines	26
13	Exemples d'application des bactériocines	27
14	Les interactions entre les souches lactiques	42
15	L'activité antagoniste des souches lactiques vis-à-vis les bactéries pathogènes	44
16	L'activité antagoniste des souches lactiques isolée vis-à-vis les bactéries pathogènes	46
17	L'activité antagoniste des surnageants natif et neutralisé vis-à-vis les bactéries pathogènes par la méthode des puits	50

18	Taux d'inhibition de <i>Bacillus cereus</i> obtenu par les souches lactiques selon les méthodes des disques et des puits (surnageant natif et neutralisé)	53
19	Taux d'inhibition de <i>E. coli</i> obtenu par les souches lactiques selon les méthodes des disques et des puits (surnageant natif et neutralisé)	54
20	Taux d'inhibition de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par les souches lactiques selon les méthodes des disques et des puits (surnageant natif et neutralisé)	54
21	Taux d'inhibition de <i>Salmonella gallinarum</i> par les souches lactiques selon les méthodes des disques et des puits (surnageant natif et neutralisé)	55
22	Taux d'inhibition de <i>Staphylococcus aureus</i> par les souches lactiques selon les méthodes des disques et des puits (surnageant natif et neutralisé)	55

Liste des Abréviations

❖ Unités de mesures

C° : degré Celsius

g : gramme

h : heure

ml : millilitre

mm : millimètre

µl : microlitre

µm : micromètre

% : pour Cent

KDa : kilo dalton

L : Litre

min : minute

Nm : Nano mètre

❖ Autres Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNr : Acide Ribonucléique ribosomal

ATB : antibiotiques

ATP : Adénosine triphosphate

BAL : Bactéries lactiques

LB : *Lactobacillus*

CG : CytosineGuanine

CO₂ : Dioxyde de carbone

Dha : Didéhydroalanine

Dhb : Didéhydrobutyrine

EPS : Exopolysaccharide

GRAS : Generally Recognized as Safe

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

NaCl : Chlorure de sodium

LB 1 : *Lactobacillus plantarum*

LB 2 : *Lactobacillus brevis*

LB 3 : *Lactobacillus casei*

E. coli : *Escherichia coli*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

LDH : Lactate déshydrogénase

MH : Mueller-Hinton

MRS : Milieu de Man Rogosa and Sharpe

NaCl : Chlorure de Sodium

NaOH : Hydroxyde de Sodium

O₂ : Oxygène

OH : Groupement hydroxyle

OMS : l'organisation Mondiale de la Santé

PH : Potentiel d'hydrogène

Introduction

Introduction

Les infections alimentaires sont à la base de plus de 9000 morts chaque année dans le monde malgré l'évolution des moyens technologiques modernes de transformation des aliments . Les chercheurs et les industriels de l'agroalimentaire sont de plus en plus contraints à réduire l'emploi des traitements physiques (hautes pressions, rayons ionisants, pasteurisation, stérilisation, congélation, réfrigération,...), chimiques (nitrites, sulfites), en utilisant des bactéries comme une outil de prévention **(Ren et al., 2018)** .

La découverte de la relation symbiotique entre l'homme et les bactéries a conduit à une nouvelle façon de voir les bactéries comme potentiellement bénéfiques, plutôt que pathogènes **(Tripathi et Giri, 2014)** . Au milieu du XIXème siècle, un intérêt pour les microorganismes a eu lieu avec la découverte des « bactéries d'acides lactiques » . En 1857, Louis Pasteur a montré que le processus de fermentation est provoqué par des microorganismes, peu après l'isolement réussi d'une bactérie lactique est survenu . En 1887, Joseph Lister a isolé la souche *Bacterium lactis* à partir du lait fermenté **(Preedy, 2010)** .

Le lait et les produits laitiers contiennent de nombreux nutriments essentiels et sont caractérisés par une microflore lactique riche et diversifiée . Les bactéries lactiques sont parmi les bactéries les plus utilisées dans les fermentations alimentaires grâce à la production d'une large gamme de métabolites, participant ainsi à l'amélioration du goût et de la texture des produits alimentaires fermentés **(Mokoena, 2017 ; Ruiz et al., 2019)** .

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis plusieurs siècles comme des agents protecteurs, ils sont caractérisés par la synthèse des métabolites antimicrobiennes ; grâce à ses propriétés les bactéries lactiques ayant des rôles différentes : dans la préservation des aliments, la prévention d'empoisonnement, l'augmentation de la valeur nutritive et l'amélioration de la qualité organoleptique des aliments et dans la santé, certaines bactéries lactiques sont largement utilisées comme probiotiques tels que : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* **(Ajao et al., 2021)** .

Étymologiquement, «probiotiques» est un nom qui signifie «pour la vie» se sont des microorganismes vivants qui administrés en quantité suffisante, confèrent des bienfaits à l'hôte . leurs mécanismes d'action basés sur l'inhibition des agents pathogènes dont la production d'acides organiques et des substances antibactériennes notamment les peroxydes d'hydrogène, les bactériocines et les défensines **(Derqaoui et al., 2021)** .

Parmi les avantages exercés par les probiotiques sur la santé de l'hôte : la réduction de l'intolérance au lactose, du cholestérol et de la pression artérielle, la prévention du cancer du côlon, des symptômes allergiques chez l'enfant, l'inflammation de l'épithélium intestinal dans le cas des maladies chroniques du système digestif, la stimulation du système immunitaire, et la réduction des diarrhées . Tous ces effets bénéfiques se font spécialement grâce au contact direct entre les cellules, à la sécrétion de diverses molécules et/ou à l'alimentation microbienne croisée (**Devi et al., 2015 ; Gómez et al., 2016 ; Mokoena, 2017**) .

A travers de cette étude, nous avons essayé d'évaluer l'activité antimicrobienne de quelques souches de bactéries lactiques locales et étudier le type d'interaction entre les souches .

Notre manuscrit est structuré en trois parties, la première partie est consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour d'un premier chapitre qui donne une vue générale sur les bactéries lactiques, classification, leurs voies métaboliques, les intérêts et les applications industrielles et un deuxième chapitre intitulé les interactions entre les microorganismes, activités et les métabolites antimicrobiennes . Dans la seconde partie du manuscrit nous exposons le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation des objectifs de notre travail. Elle comporte l'étude de l'activité antimicrobienne de certaines souches des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes . La troisième partie du notre manuscrit est consacrée à l'interprétation des résultats obtenus et leurs discussions . Une conclusion générale récapitulant les principaux résultats de cette étude avec une présentation des principales perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique d'étude .

Synthèse Bibliographique



Chapitre 1

Les bactéries lactiques

I.1.1.Généralités

Les bactéries lactiques constituent l'un des groupes incontournables de la microbiologie alimentaire, sont ubiquistes et on les trouve dans certains aliments tels que le lait et ses dérivés, la viande, les fruits et les légumes. Elles représentent aussi une partie de la microflore intestinale et génitale humaine et animale (**Dridier et Prevost, 2009 ; Leonard, 2013**) . Elles jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales . Leur capacité à fermenter les glucides et à un moindre mesure de dégrader les protéines et les graisses présentes dans ces substrats (**Mozzi et al.,2010**). Sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation . Cette bioconservation par les bactéries lactiques est due à leurs capacités à produire plusieurs métabolites antimicrobiens, tels que les acides organiques (acide lactique, acide acétique....), le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, le diacétyle, la reutéline, le dioxyde de carbone et les bactériocines (**Djadouni, 2013 ; Hammi, 2016**) .

I.1.2.Définition

Les bactéries lactiques sont des microorganismes procaryotes hétérotrophes et chimio-organotrophes, hétérogènes présentant des caractéristiques morphologiques, physiologiques, et métaboliques variées . Elles Regroupent les bactéries à coloration de gram positif généralement immobiles non sporulée, elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate, ni oxydase, en forme de bâtonnets ou de coques (**Drouaultet Corthier, 2001 ; Dridier et Prévost, 2006**) .

Les bactéries lactiques sont dépourvues de système de respiration fonctionnelle, leur énergie est obtenue par la phosphorylation au niveau du substrat . Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires, ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*).Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les BAL sont dites : homofermentaires et hétérofermentaires (**Axelson, 2004 ;Carine et Philippe,2009**) .

I.1.3.Habitat

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature susceptible d'être retrouvés dans tous types d'habitat en raison de leur bonne capacité

d'adaptation(Axelsson, 2004 ; Belyagoubi, 2014) . Elles peuvent se retrouver à l'état libre dans l'environnement (sol, eau, eaux usées, fumier,...),ou vivent en association avec un hôte, tel que l'homme,l'animal, l'écosystème bactérien : le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères, dans des divers produits alimentaires comme les produits laitiers fermentés (lait fermenté, fromage,...) et même sur la surface des végétaux (plantes, fruits et légumes,...) (Makhloufi, 2011 ; Gálvez et al.,2011) .

I.1.4.Classification des bactéries lactiques

Au début du XXe siècle, le terme bactérie lactique, a été introduit dans la monographie d'Orla-Jensen (1919), ce qui constitue toujours la base du système de classification actuel . Les critères de description des bactéries utilisées incluent sur les critères phénotypiques tel que :la morphologie (basée sur la composition de la paroi cellulaire bactérienne, incluant la nature des acides gras tels que l'acide lactobacillique et les acides gras insaturés), le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (Gilarováet al.,1994 ; DeAmbrosinietal.,1996 ; Boumediene, 2013 ; Liu et al., 2014 ; König et Fröhlich, 2017) . Les critères génotypiques : la méthode de référence est la méthode d'hybridation ADN-ADN, ou le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, la détermination du %CG était la première méthode basé sur l'utilisation de l'ADN dans la taxonomie et la classification bactérienne (Debeyer, 2020) .

Une autre classification, basée sur la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides a subdivisé les bactéries lactiques en trois groupes : Le groupe renferme majoritairement les *Lactobacilles* homofermentaires ,Le groupe II contient les bactéries hétérofermentaires et regroupe les espèces des genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et *Weissella*, ainsi que quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et le groupe III regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant aux genres *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ainsi il y'a des espèces capables d'être homo- ou hétérofermentaires selon les conditions environnementales (Mcleodet al., 2008) .

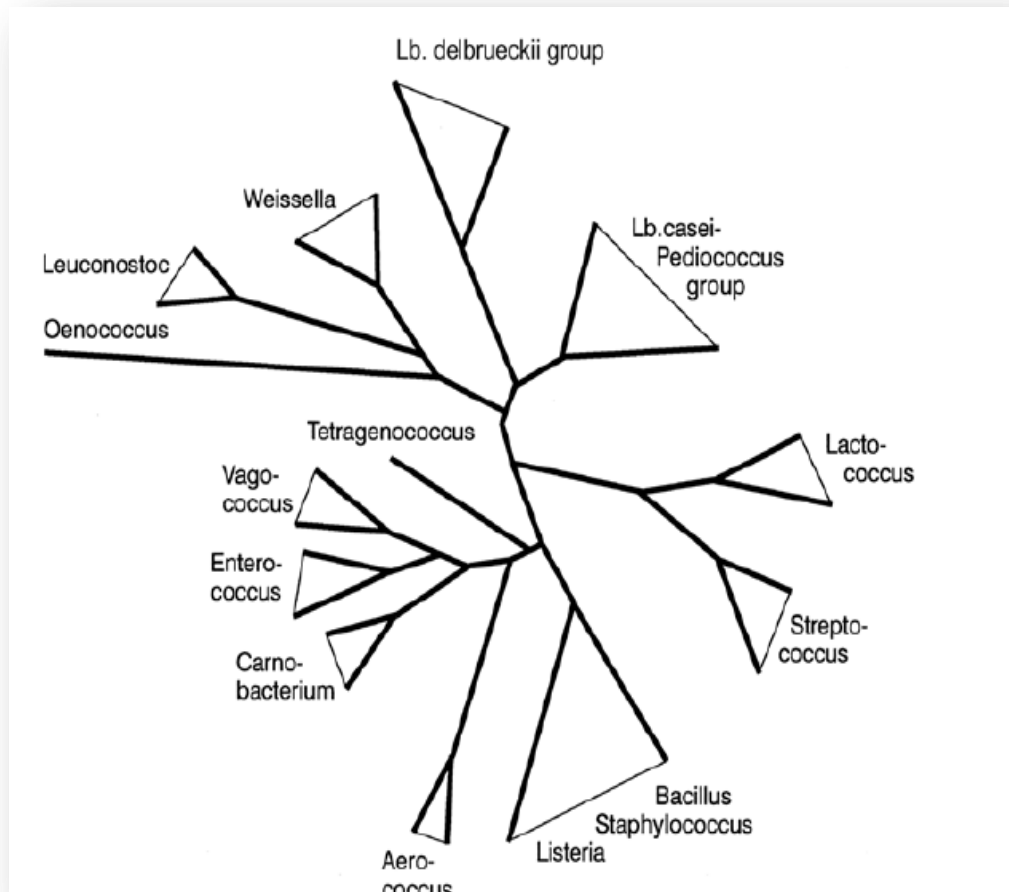


Figure1:Arbre phylogénique des bactéries lactiques (Axelsson,2004) .

I.1.4.1.Le genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* appartient au phylum des *Firmicutes*, la classe des *Bacilli* et l'ordre *Lactobacillales*, il présente le genre plus grand et le plus hétérogène très répandu dans les environnements végétaux, animaux et humains (dans la flore buccale, l'iléon et le côlon, et sont également dominantes dans la flore vaginale). Sont des bacilles regroupent en chaînettes, anaérobies facultatifs à gram positif non sporulés sont catalase, gélatinase et nitrate réductase négative. Ils sont dépourvus de cytochrome, leur type respiratoires est anaérobies ou micro-aérophile (Sherid et al.,2016 ;Menad, 2017) .

Les *Lactobacillus* sont développent rapidement à température comprise entre 40 et 50°C, le pH optimal de croissance est compris entre 5,5 et 6,2,leurs pourcentages en GC sont de 36 à 47% (Guiraud, 2003 ; Kouakou et Thonart, 2011;Debeyer, 2020).Ils ont des besoins nutritionnels complexes (les glucides, les acides aminés, les

peptides, les esters d'acides gras, les sels, les dérivés d'acides nucléiques et vitamines) . Ces bactéries sont employées depuis longtemps pour la fermentation et la conservation de matières premières végétales alimentaires. Les *Lactobacillus* sont subdivisés par leur type fermentaire par Orla-Jensen en trois groupes (Hammes et Vogel, 2012 ; Belhamra, 2017):

- **Le groupe *Thermobacterium*** : comprend les *Lactobacilles* homofermentaires obligatoires, thermophiles qui se développent à 45°C et non à 15°C. Fermentent le glucose et le gluconate sans production de CO₂. Les espèces les plus fréquentes sont *Lactobacillus helveticus*, *L.jugurti*, *L.bulgaricus*, *L.lactis*, *L.acidophilus*, *L.leichamnii*, *L.delbrueckii*, *L.kifirofaciens*, *L.mali* .
- **Le groupe *Streptobacterium***: regroupe les *Lactobacilles* homofermentaires mais qui peuvent être hétérofermentaires facultatives en fonction du substrat, mésophiles qui se développent à 15°C, le CO₂ est dégagé lors de la fermentation de gluconate et non produit lors de la fermentation du glucose. Il comporte les espèces *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. sake*, *L. acetotolerans*, *L. graminis*, *L. rhamnosus*,...etc .
- **Le groupe *Betabacterium*** : comprend les *Lactobacilles* hétérofermentaires stricts qui sont *Lactobacillus fermentum*, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. viridiscens*, *L. kefir*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. sanfrancisco* .

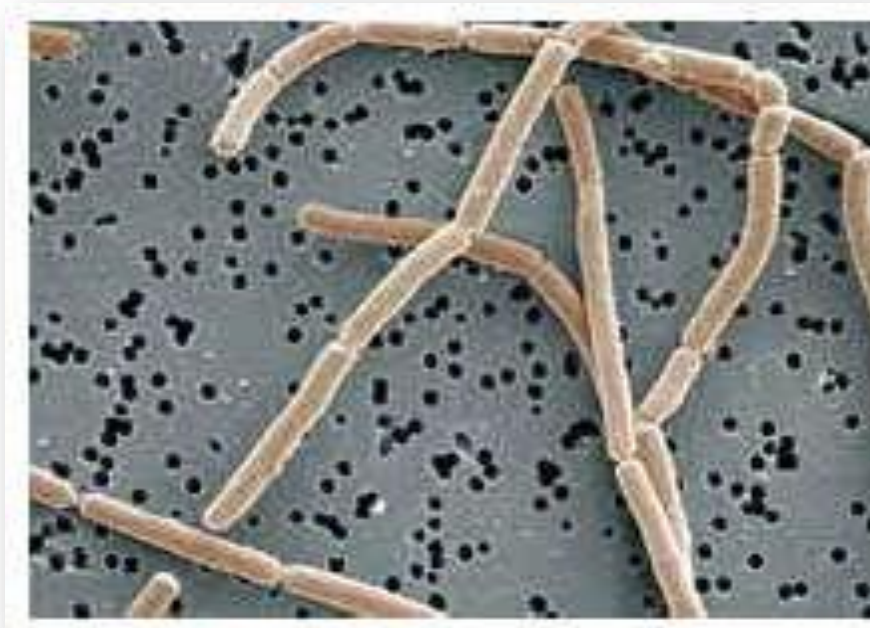


Figure 2 : *Lactobacillus acidophilus*(Maghnia, 2011) .

Il y'a un nouveaux redécoupage du genre des *Lactobacilles*(*Lactobacillus*) en 25 genres : 24 nouveaux genre plus l'ancien genre de *Lactobacillus* (Zheng, 2020):

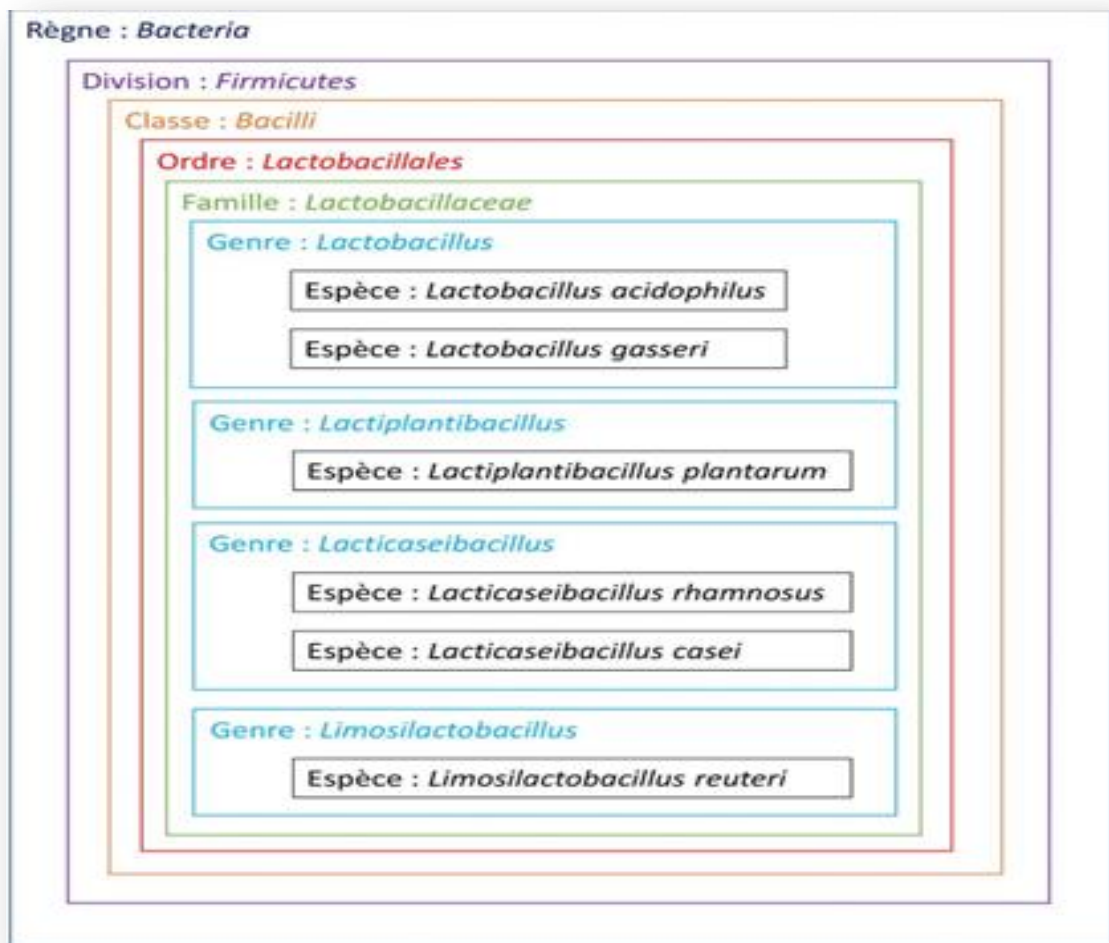


Figure3 : Nouvelle classification de *Lactobacillus* (Zheng, 2020).

I.1.4.2. Le genre *Lactococcus*

Le *Lactococcus* est une bactérie lactique faible en CG, en forme d'ovoïdes associés en paires ou en chaînettes de longueur variable, mésophile avec un optimum de croissance à 30°C . Son métabolisme est anaérobie facultatif et elle est capable de se multiplier en aérobiose en présence d'hème . La surface de *Lactococcus* est recouverte d'une couche de polysaccharide lié de manière covalente au peptidoglycane de la paroi cellulaire, la structure de ce polysaccharide de paroi varie entre les souches .Les *Lactococcus* présente dans la sphère uro-génitale de la femme, chez les végétaux céréales, pomme de terre, pois, haricots,... etc., retrouve surtout en grandes quantités

dans le lait cru des bovins largement utilisée comme levain dans les fermentations laitières (Teuber, 2015; Yu et al., 2017) .

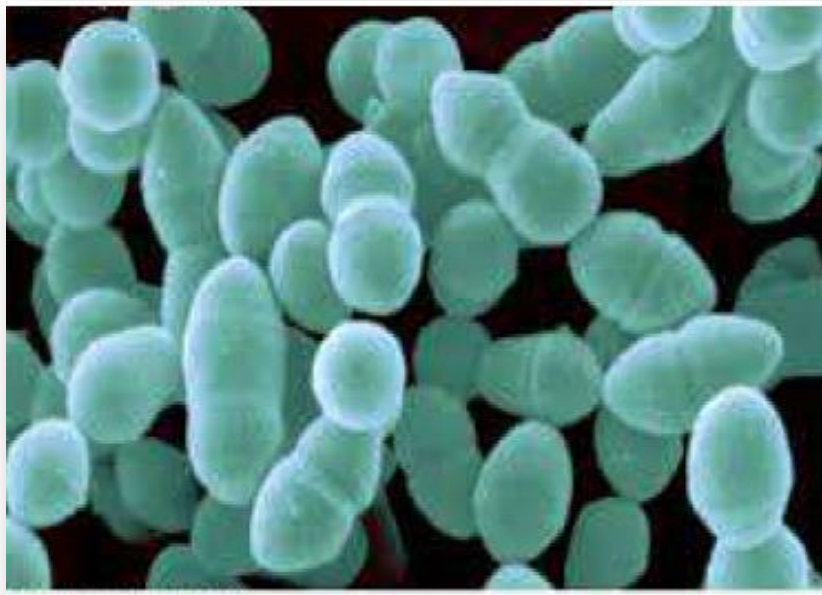


Figure 4 : *Lactococcus lactis*, au microscope électronique (Corrieu et Luquet, 2008) .

I.1.4.3. Le genre *Bifidobacterium*

Le nom *Bifidobacterium*, qui a été attribué à cette bactérie par Christian Gottfried Ehrenberg en 1838, vient du latin « *bifidus* » qui signifie en latin « fendu en deux » et de « *bactérium* » traduction de « bâton », en raison de sa morphologie bifide en Y. Appartenant à l'ordre des *Bifidobacteriales*, classée en trois sous-espèces distinctes (*B. longum* subsp. *longum*, *infantis* et *suis*) (Paiser, 2015 ; Fidelle, 2021). Les *bifidobactéries* sont des bacilles à gram positif, anaérobies stricts, à haut pourcentage en CG, non sporulés, de forme irrégulière, comportant souvent des ramifications . Ces bactéries glucidolytiques dégradent les hexoses par une voie particulière : la voie du fructose-6-phosphate. Actuellement, 47 espèces sont décrites . L'habitat principal de ce genre est le tube digestif de l'homme et des animaux, et il appartient au phylum des *Actinobacteria*, un des trois phyla dominants dans le microbiote de l'homme. Son établissement est précoce chez les nouveau-nés et les oligosaccharides du lait maternel favorisent son implantation très dominante chez le nouveau-né allaité . Ce genre a un très faible pouvoir pathogène, excepté *Bifidobacterium dentium* qui a été associé à des pathologies dentaires (Butel et al., 2014) .

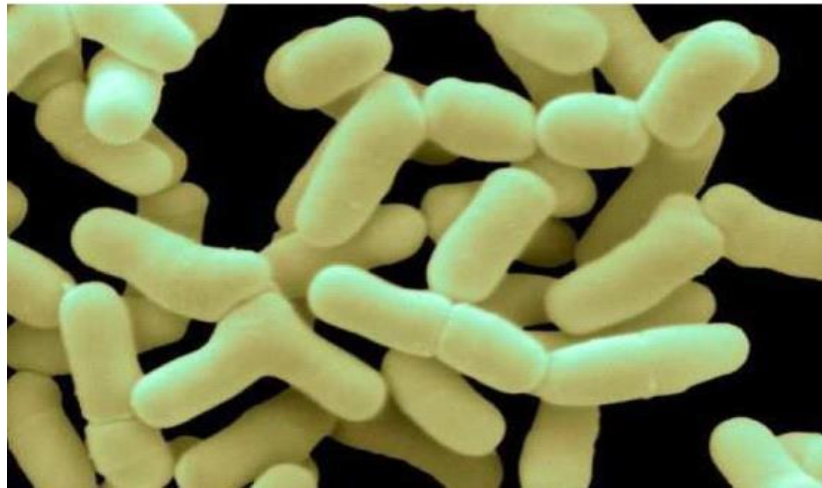


Figure 5 : *Bifidobacterium sp* (Wallace et al., 2003) .

I.1.4.4. Le genre *Streptococcus*

La famille de *Streptococcaceae* ou famille des *Streptocoques* est une grande famille de bactéries. Ces ont des cocci gram positive, en chaînettes, il existe différents types: grandes, petite et même des fois des diplocoques car les *Streptococcus Pneumoniae* immobile, elles sont anaérobies préférentiel aérotolestants ce qui signifie que sa croissance est favorisée par une atmosphère enrichie en CO₂, leur catalase est négative . Elles ont des propriétés atmosphériques proches des *Staphylocoques* . On les retrouve de manière assez importante dans le tube digestif. La famille de *Streptocoque* comprend deux genres: le genre *Streptococcus* avec les *Streptocoques sensu*, les *Pneumocoques* set Le genre *Entérocoques* (Patel et Gupta, 2018 ; Park et al., 2019) .

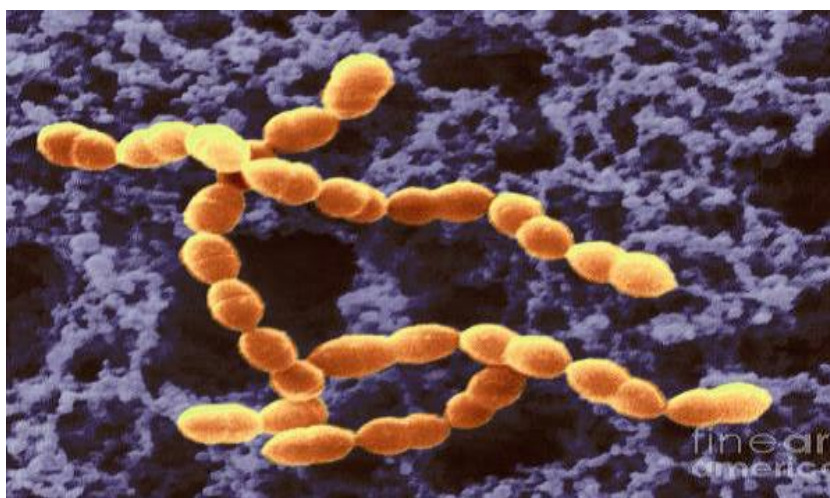


Figure 6 : *Streptococcus thermophilus* au microscope électronique (Furet et al., 2004) .

I.1.4.5. Le genre *Enterococcus*

Les *Enterococcus* représentent le groupe des *Entérocoques*, généralement groupés isolés, en paires, en chainettes ou en amas, leur morphologie peut varier selon les conditions de culture, anaérobies facultatives, non sporulé de forme ovoïde, ubiquitaire, gram-positives ils ont été isolés du sol, des eaux de surface et de l'eau de mer ; en association avec des plantes; dans les produits alimentaires fermentés; une partie du microbiote intestinal des vertébrés et des invertébrés ; et agent responsable des maladies humaines . Ils sont composés de *Streptocoques fécaux* (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*), toutes les deux sont utilisées comme probiotiques . Il se caractérise par sa tolérance à 6,5% de NaCl, au pH 9,6 et par la croissance à 10°C et 45°C. De plus, les *Enterococcus* sont très résistantes au séchage (**Hanchi et al., 2018 ; Gracia et Rice ,2019**) .

Elles peuvent jouer un rôle bénéfique dans la maturation et le développement de l'arôme de certains produits alimentaires traditionnellement fermentés tels que les fromages et la charcuterie . Elles sont également utilisés comme probiotiques humains, pour traiter les maladies diarrhéiques causées par pathogènes d'origine alimentaire (**Jouber, 2016**) .



Figure7: *Enterococcus faecalis* au microscope électronique (**Wallace et al., 2003**) .

I.1.5.Métabolisme des bactéries lactiques

La croissance nécessite la production d'énergie, les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle, parce qu'elles ne possèdent pas un système respiratoire fonctionnel, elles doivent obtenir leur énergie par phosphorylation au niveau de substrat (Atlan, 2008) .

I.1.5.1. Métabolisme des carbohydrates

Toutes les bactéries lactiques possèdent un métabolisme fermentaire, leur permettant en utilisant des sucres fermentescibles, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique) . Bien que les bactéries lactiques constituent un certain nombre de genres divers, elles sont regroupées en tant que homofermentaires ou hétérofermentaires en fonction du produit final de leur fermentation (Alaoui et al.,2016) :

- **Les bactéries lactiques homofermentaires:** possèdent l'enzyme aldolase et sont capables de fermenter le glucose plus directement en acide lactique que les hétérofermentaire . Les espèces des genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, et certaines de *Lactobacillus* dans les conditions standard de croissance, fermentent les sucres par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas en pyruvate, ce dernier est converti en acide lactique par le lactate déshydrogénase (LDH) . Dans certaines conditions de croissance (limitation de carbone, excès du carbone des sucres lentement métabolisé), le métabolisme homolactique peut se transformer en métabolisme mixte caractérisé par la production d'acétate, formate, éthanol et /ou du CO₂ en plus de l'acide lactique (Kowalczyk et al., 2015) .
- **Les bactéries lactiques hétérofermentaires :** produisent de l'acide lactique comme principal produit en plus de dioxyde de carbone, de l'acide acétique et de l'éthanol à partir de la fermentation du glucose . Les *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et certaines espèces de *Lactobacillus* fermentent les sucres généralement par la voie de phosphocétolase . Les pentoses sont fermentés en pyruvate et acétylcholine qui sont convertis ultérieurement en lactate et acétate respectivement. Les hexoses peuvent être convertis en lactate, éthanol et CO₂ (Mozziet Vignolo, 2010; Jagadeesh, 2015 ;Kowalczyk et al., 2015) .

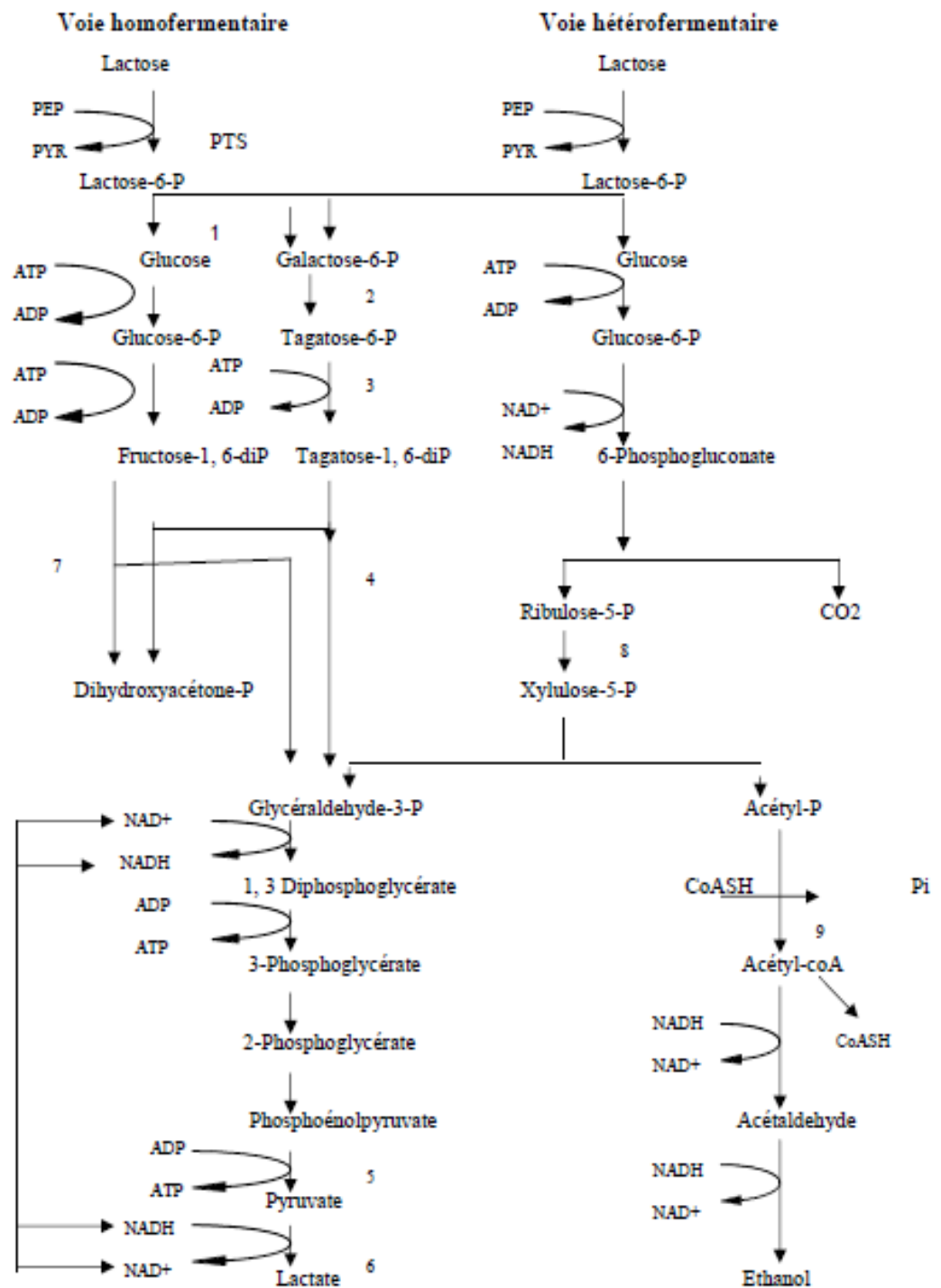


Figure8: La fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voies Homo et Hétérofermentaire(Bekhouche, 2006) .

1 : phospho- β -galactosidase ; 2 : tagatose-6-phosphate Isomérase ; 3 : tagatose-6-phosphate Kinase ; 4 : tagatose-1,6-diphosphate aldolase ; 5 : pyruvate Kinase ; 6 : lactate déshydrogénase;

7 : fructose-1, 6-diphosphate aldolase ; 8 : pentose-5-phosphate cétolase ; 9 : éthanol déshydrogénase .

I.1.5.2.Métabolisme protéolytique

L'incapacité des bactéries lactiques à synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique, nécessite un fonctionnement actif de leur système protéolytique dans les environnements où les protéines constituent la principale source d'azote . Le système protéolytique est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalyse l'hydrolyse de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés . Ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides(Maghnia, 2011) . Certaines souches de *L. Lactissubsp* sont capables de synthétiser la plupart des acides aminés dont elles ont besoin (Leonard, 2013) .

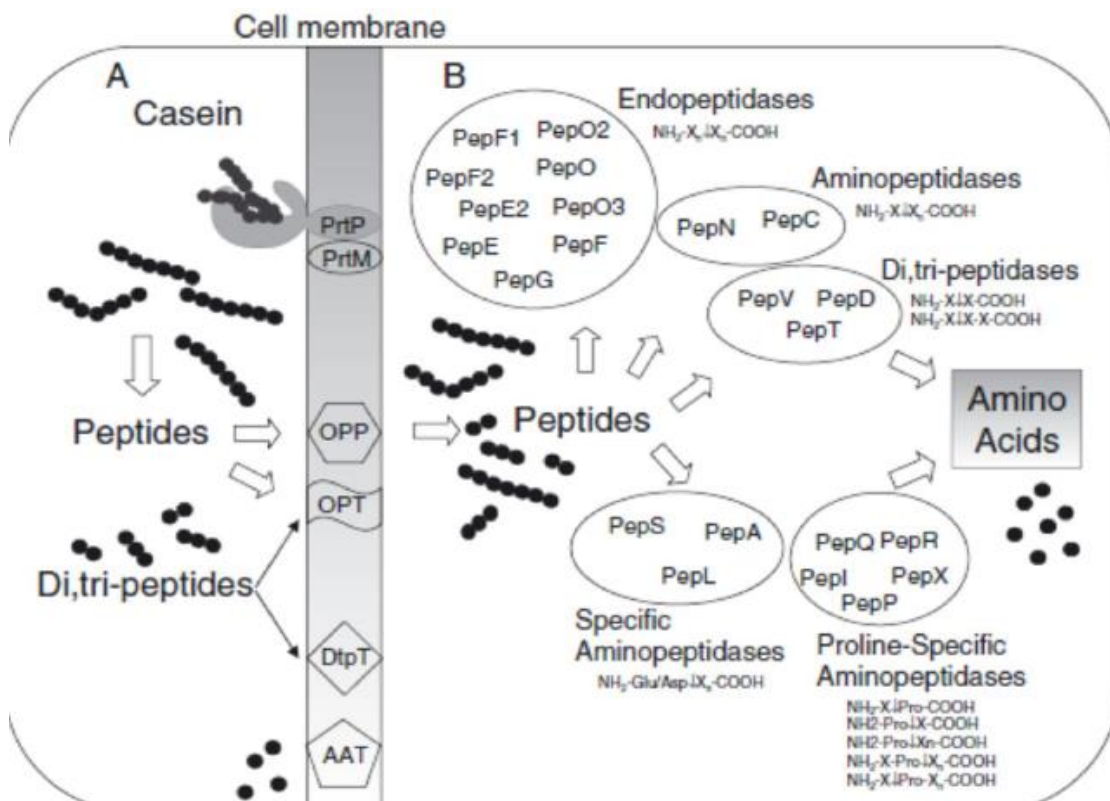


Figure 9 : Le système protéolytique chez les bactéries lactiques (Mayo et al., 2010) .

I.1.5.3. Métabolisme lipolytique

Les bactéries lactiques sont connues comme faiblement lipolytique comparées à d'autres bactéries.

Les bactéries appartenant au genre *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Pedococcus* sont lipolytiques tandis que les *Lactococcus* ont une activité stérasique. Les activités lipasiques et estérasiques sont maximales pendant la phase exponentielle de croissance, les lipases bactériennes catalysent la production des acides gras à longues chaînes à partir des mono et diglycérides, alors que les estérases permettent la libération des acides gras volatils, dont la concentration augmente pendant l'affinage. Ils sont également des précurseurs pour la formation de méthylcétones, alcools, lactones et esters présente les différentes voies conduisant à la formation de ces composés (Dellali, 2012).

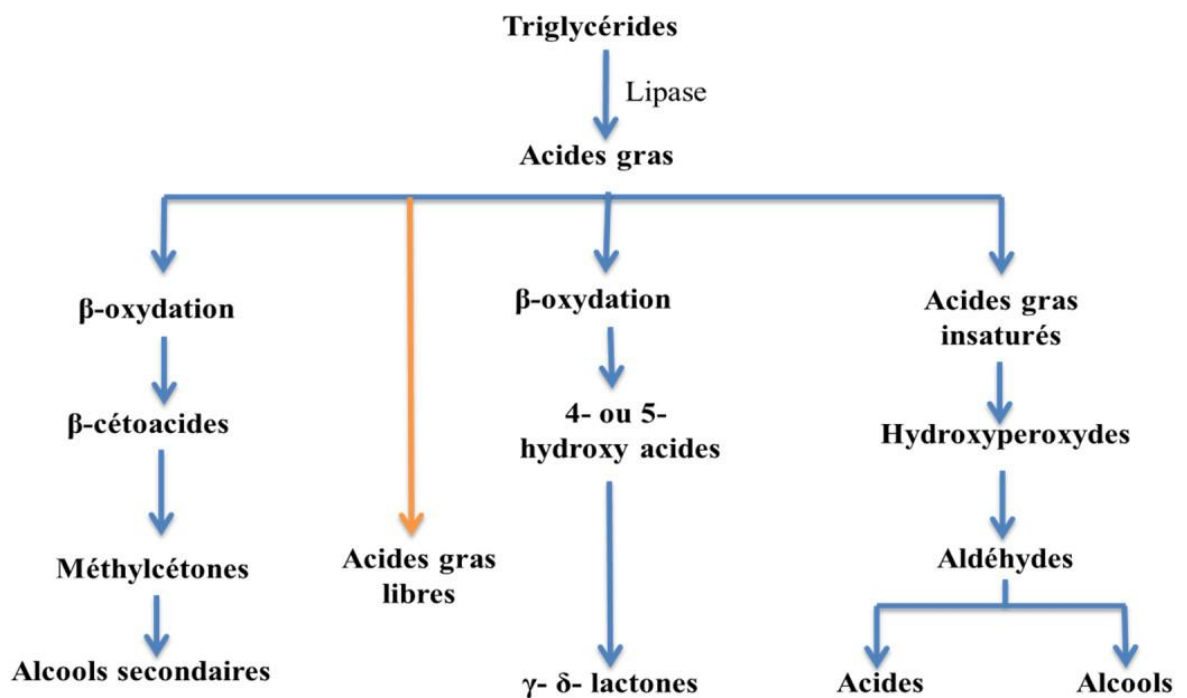


Figure 10 : Principales voies de la lipolyse (Siegumfeldtet al.,2000).

I.1.5.4. Métabolisme du citrate

Le citrate est un intermédiaire central du cycle des acides tricarboxyliques. Il joue un rôle important dans le métabolisme énergétique des cellules vivantes et

également un précurseur pour la synthèse des acides aminés . L'acide citrique est utilisé par nombreuses espèces des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostocet* *Lactobacillus* . Le citrate ne peut être dégradé qu'en présence d'un substrat fermentescible et d'une source d'azote, il est transporté à l'intérieur des cellules par une citrate-perméase, où il est scindé en acétate (en majeure partie excrétés) et enoxaloacétate par le complexe enzymatique citrate lyase . L'oxaloacétate est ensuite converti en pyruvate et en CO₂ par une oxaloacétate décarboxylase . Des transformations successives du pyruvate aboutissent à la formation de composés aromatisants et le produit fini est le 2,3-butylen-glycol (2,3-butanediol) (Bekhouche, 2006;Drider et Prevost, 2009) .

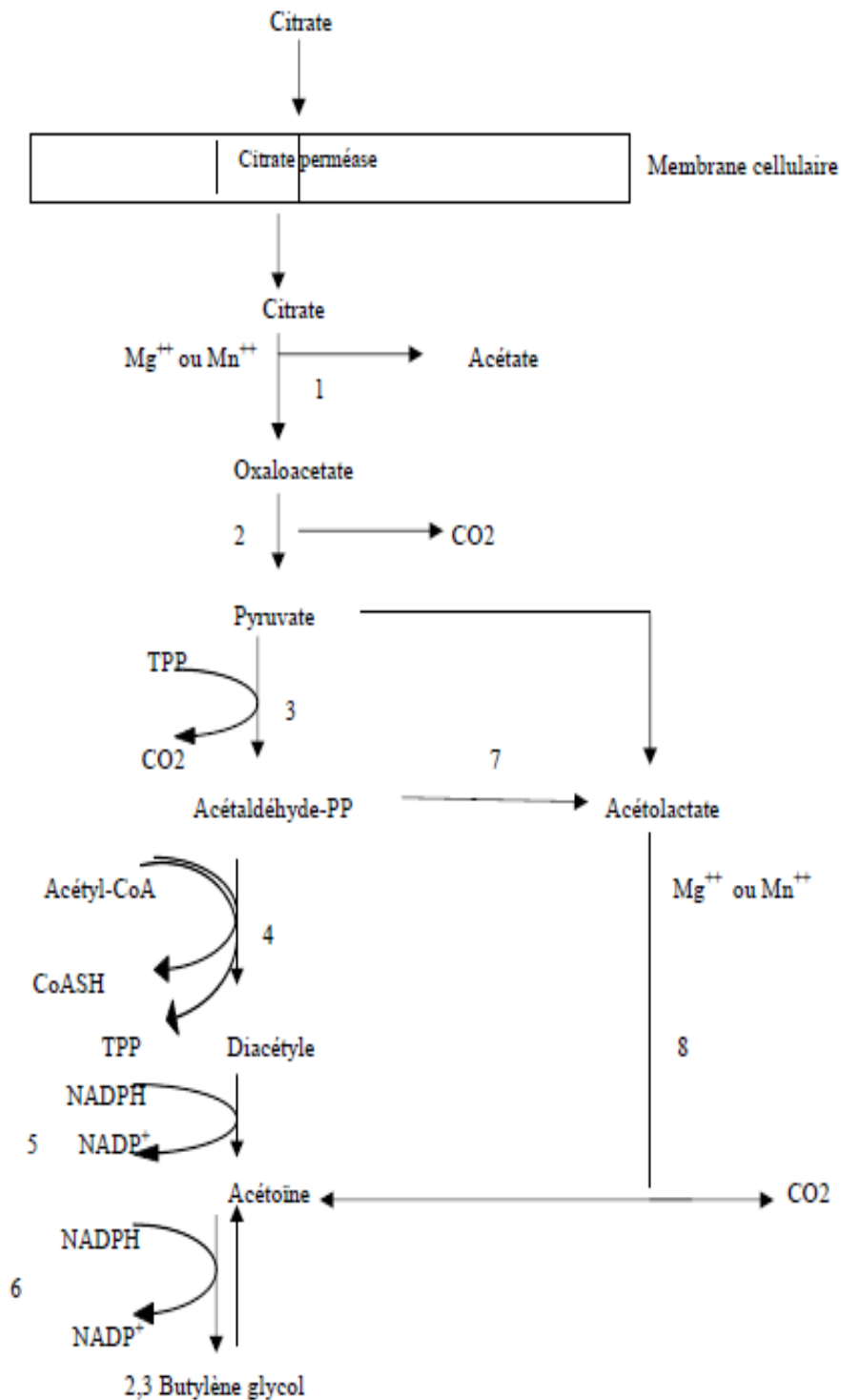


Figure 11:Le métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques (Bekhouche, 2006).

TPP : thiamine pyrophosphate; 1 : citrate lyase (citritase); 2 : oxaloacétate décarboxylase; 3 : pyruvate décarboxylase; 4 : diacétyle synthétase; 5 : diacétyle réductase; 6 : acétoïne réductase;

7 : acétolactate synthétase; 8 : acétolactate décarboxylase .

I.1.6. Intérêts et applications industrielles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs technologies pour répondre aux besoins de l'industrie alimentaire, cosmétique, pharmaceutique...etc (**Bouzaid et al., 2016**) .

I.1.6.1. Domaine alimentaire

Depuis longtemps, les bactéries lactiques sont utilisées de façon consciente ou non pour leurs activités technologiques . Elles sont consommées dans les produits alimentaires fermentés (produits dérivés du lait, de la viande et du poisson, le vin, la bière, le pain, les produits végétaux,...), par ce qu'elles se caractérisent par une sécurité hygiénique, une stabilité de stockage et des propriétés sensorielles attrayantes (**Mami, et al., 2010 ; Al-Tawaha et Meng, 2018**) . De plus, les EPS produits par BAL contribuent à la qualité du lait fermenté, en particulier à sa texture, saveur et sa viscosité. Ces molécules peuvent maintenir une certaine onctuosité du lait fermenté et un bon goût tout en réduisant l'utilisation des additifs alimentaires . L'effet conservateur des bactéries lactiques est souvent dû à la capacité à produire des composés inhibiteurs, y compris le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, les acides organiques (acide lactique et acétique), le dioxyde de carbone, les bactériocines ou les substances analogues aux antibiotiques (**Chun-lei et al., 2014 ; Ngozi, 2017 ; Reuben et al., 2020**) .

I.1.6.2. Domaine thérapeutique

L'action des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques. En 2001 un comité d'experts de l'Organisation des Nations pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définissait les probiotiques comme des micro- organismes vivants qui lorsqu'ils sont consommés en quantité suffisante dans l'alimentation (**Boumediene, 2013 ; Yan et Min, 2014 ; Shehata et al., 2016**) . Parmi les avantages exercés par les probiotiques sur la santé de l'hôte: la réduction de l'intolérance au lactose, des allergies, du cholestérol, la pression artérielle et la prévention du cancer du côlon,...etc . Tous ces effets bénéfiques se font spécialement grâce au contact direct entre les cellules, à la sécrétion de diverses molécules et/ou à l'alimentation microbienne croisée (**Gómez et al., 2016 ; Mokoena, 2017**) .

I.1.6.3.Domaine Cosmétique

La capacité de retenue d'eau de l'acide lactique le rend approprié à l'usage comme produit hydratant dans les formulations cosmétiques . Le lactate d'éthyle est un ingrédient actif dans plusieurs préparations anti-acné . L'occurrence naturelle de l'acide lactique dans le corps humain fait qu'il est très utile comme substance active dans les produits cosmétiques **(Wee et al., 2006)** .

I.1.6.4.Domaine Industrielle

L'acide lactique est utilisé dans divers procédés industriels, comme: agent de détartrage, dissolvant, nettoyant, mouillant,... etc . En raison de l'augmentation des quantités de déchets plastiques dans le monde entier, des efforts considérables de recherches et de développement ont été consacrés afin de substituer les thermoplastiques conventionnels par des matériaux biodégradables, à une seule utilisation **(Reddy et al., 2008)** .

Chapitre 2

Activités antimicrobiennes

I.2.1. Les interactions entre les microorganismes

L'évolution des conditions physico-chimiques et la disponibilité en nutriments sont des éléments importants pour le développement des microorganismes . Ils peuvent ainsi générer des phénomènes d'interactions . Ces interactions peuvent s'établir entre différentes populations (moisissures, bactéries) et au sein même d'une population regroupant différentes espèces ainsi qu'entre différentes souches d'une même espèce. Les interactions sont classées selon une approche phénoménologique basée sur leurs effets positifs ou négatifs et ou une approche mécanistique c'est-à-dire directe (contact physique entre les bactéries) ou indirecte (substance produite ou consommée par un des microorganismes) (**Tahlaiti, 2019**) .

I.2.1.1. Interactions positives

Quand on parle d'interactions positives, on différencie le commensalisme où l'un des partenaires est stimulé par la production d'une substance essentielle ou par la destruction d'un facteur inhibiteur, du mutualisme où, dans ce cas, l'interaction est bénéfique aux deux partenaires (**Cholet, 2006**) .

I.2.1.2. Interactions négatives

Il existe divers mécanismes d'inhibition des microorganismes entre eux . Si l'inhibition intervient par la production de substances inhibitrices et si un seul des deux microorganismes est inhibé par l'autre, ils convient de parler d'amensalisme . En revanche, si les mécanismes d'inhibition sont réciproques, il s'agit alors d'un phénomène de compétition . Cette compétition peut s'exercer vis-à-vis de l'espace disponible (inhibition de contact) et/ou de la disponibilité en substrats . L'antagonisme désigne une lutte réciproque des deux populations par la production de molécules inhibitrice, généralement spécifiques (**Cholet, 2006 ; Monnet et al., 2008**) .

I.2.2. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques

Les microorganismes possèdent un groupe extraordinaire de défense microbienne pour maintenir leurs existences ou leurs niches écologiques contre des concurrents ou des infections . La production des peptides microbiens, c'est une première barrière de défense, ces peptides ont un effet direct sur les microorganismes, par exemples

déstabiliser la membrane bactérienne, virale ou fongique ou agir sur d'autres cibles (Djadouni, 2013) .

Plusieurs études ont montré l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes (Rodrigues et al., 2005 ; Reis et al., 2012 ; Mercha et al., 2020) . Les propriétés antimicrobiennes de ces bactéries peuvent être associées à de nombreux éléments . Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques, synthétisent des molécules à actions bactéricides et ou bactériostatiques tels que l'acide lactique, des acides organiques, le diacétyl, le dioxyde de carbone, ... (Chentouf, 2015 ; Bouzaidet al., 2016) .

Tableau 1 : Métabolites antimicrobiens de faible masse moléculaire sécrétés par les bactéries lactiques autres que les bactériocines (Leonard, 2013) .

Composés antimicrobiens	Souches productrices	Spectre microbien
Acide lactique	Toutes les bactéries lactiques	Levures Bactéries gram+/-
Acide acétique	Bactéries lactiques hétéro fermentaires	Levures Bactéries gram+/-
Diacétyl	<i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i>	Levures Bactéries gram+/-
Peroxyde d'hydrogène	Toutes les bactéries lactiques	Levures Bactéries gram+/-
Dioxyde de carbone	Les bactéries lactiques hétérofermentaires	La plus part des groupes taxonomiques de micro organismes

I.2.3. Les métabolites antimicrobiens non peptidiques

I.2.3.1. Les acides organiques

Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation. Les principaux acides produits sont: l'acide lactique, l'acide acétique et propionique. Ces derniers permettent d'inhiber la croissance des levures et d'autres bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide.

L'effet inhibiteur de ces acides organiques est principalement provoqué par les molécules non dissociées qui diffusent à travers les couches lipidiques des membranes des microorganismes provoquant ainsi un abaissement du pH dans le cytoplasme qui a pour conséquence la déstabilisation des cellules (Zhitnitsky et al., 2014).

I.2.3.2. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) présente un effet antimicrobien qui peut être expliqué par la production de radicaux libres tels que le groupement superoxyde ($O_2\bullet$) et le groupement hydroxyle ($OH\bullet$) capables d'endommager l'ADN bactérien. En outre, le pouvoir inhibiteur du peroxyde d'hydrogène pourrait être dû à des réactions d'oxydation des groupes sulfhydryles provoquant une modification de la conformation des protéines et donc la perte de fonction des enzymes. De plus, il peut engendrer la peroxydation des lipides membranaires, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane du microorganisme cible (Nair et al., 2017).

I.2.3.3. Le dioxyde de carbone

Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone (CO_2) comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Toutefois, le dioxyde de carbone peut aussi, à faible concentration, stimuler la croissance de certaines bactéries (Singh, 2018).

I.2.3.4. Reutéline

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus*. La fermentation du glycérol se

déroule en deux étapes . Le glycérol sera tout d'abord déshydraté par un glycérol déshydratase pour former de la reutéline qui sera ensuite réduite en 1,3-propanediol par une oxydoréductase . Cette deuxième étape est inhibée en l'absence de glucose . La reutéline s'accumule alors dans le microorganisme producteur . À haute concentration, elle est excrétée dans le milieu . Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* sont plus résistantes (Langaet al., 2014) .

I.2.3.5. Le diacétyl

Le diacétyl ($C_4H_6O_2$) est un produit du métabolisme de citrate qui est responsable de l'arôme "beurre" de produits laitiers et qui inhibe la croissance bactérienne en interférant probablement avec les mécanismes gouvernant l'utilisation de l'arginine . Il est rarement présent dans l'aliment en quantité suffisante pour y exercer une activité antimicrobienne importante (Heita, 2014) .

I.2.4. Les métabolites antimicrobiens peptidiques : Les bactériocines

I.2.4.1. Définition

Le terme « bactériocine » fut utilisé pour la première fois en 1964 par André Lwoff, médecin et biologiste français (Dillenseger, 2019) . Les bactériocines sont des protéines, ou complexes de protéines possédant une activité bactéricide dirigée contre des espèces proches de la souche productrice . Ce sont des peptides antimicrobiens de 20 à 60 acides aminés synthétisés selon la voie ribosomique impliquant des groupes de gènes ou clusters comportant une ou plusieurs unités de transcription, génotypiquement spécifique, par les bactéries de gram positif, négatif et les archées (Sidhu et Nehra, 2017) .

Les bactériocines sont généralement cationiques, amphiphiles, thermostables, modifiés ou non post- traductionnellement, de masses moléculaires comprises entre 2 et 6 kDa . Elles représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leurs spectres d'action et de leurs modes d'action (Taale et al., 2016) .

Ces métabolites ne sont pas des antibiotiques mais elles possèdent des propriétés antibiotiques car elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques . Les bactériocines se différencient des antibiotiques par une synthèse ribosomale contrairement à la synthèse

enzymatique des antibiotiques, une activité à des concentrations bien plus faibles que celles et un spectre d'activité généralement plus restreint (**Mekri, 2016 ; Djelloul, 2021**).

I.2.4.2. Classification des bactériocines

Les bactériocines diffèrent entre elles par leur structure primaire, tridimensionnelle, mode d'export et leur mécanisme d'action . Ces critères permettent de classer les bactériocines en quatre classes comme proposé par Klaenhammer (1993). Ces classes sont :

I.2.4.2.1. Bactériocine de classe I : lantibiotiques

Les lantibiotiques, c'est-à-dire des petits peptides cationiques, hydrophobes et thermostables qui contiennent des acides aminés inhabituels (thioéther aminoacides lanthionine et / ou méthyl lanthionine) qui sont formés post-traductionnellement. Protéines de poids moléculaire inférieur à 10 kDa avec modifications post-traductionnelles comprend des protéines susceptibles de subir certaines modifications par leur biosynthèse, en raison de la présence d'une séquence de peptides signaux cela permettra la reconnaissance, le transport et le maintien du peptide inactif . Cette classe I peut être divisée en 3 sous-classes Ia, Ib et Ic selon la charge des peptides : **Ia** cationiques hydrophobes avec 34 acides aminés, **Ib** globulaires chargés négativement ou sans charge contenant jusqu'à 19 acides aminés et **Ic** leur structure cyclique formés de 2 peptides agissant en synergie (**Mekri, 2016 ; Gonzalez-perez et al., 2018**) .

I.2.4.2.2. Bactériocines de classe II : les peptides non modifiés

Cette classe regroupe les bactériocines ne possédant pas de cycles lanthionine . Leur taille n'excède pas en général 10 kDa et elles sont thermostables. Ce type de bactériocines ne subit aucune modification post-traductionnelle . Leur mode d'action consiste dans la majorité des cas à perméabiliser la membrane interne, ce qui induit une fuite des métabolites intracellulaires et in fine la mort bactérienne . Ces bactériocines sont de natures variées et appartiennent à différentes sous-classes (**Cherier, 2017**) : Les bactériocines de la **Classe IIa** posséder un 2ème pont disulfure dans leur partie C-terminale ce qui stabilise leur structure tertiaire. Ensuite la **Classe IIb** nécessitant l'association de 2 peptides pour être actives, de type E « Enhancing » où l'association des 2 peptides augmente mutuellement leur activité, ou S « Synergie » où ils sont

complémentaires . La **Classe IIc** se compose des bactériocines qui ne peuvent pas être rangées dans les sous-classes IIa et IIb (plantaricine A, lactococcine A, lactococcine 972...) (Dillenseger, 2019) .

I.2.4.2.3. Bactériocines de classe III : Bactériolysines

Les bactériocines de la classe III sont des protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur qui sont essentiellement des endopeptidas(**Calvez, 2009**) . La structure et le mode d'action des bactériocines de la classe III se différencient complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques . Cette classe renferme quatre bactériocines: l'helveticin, l'enterolysin A, la zoocin A, la millericin B produites par *Lactobacillus helveticus*, *Spreptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus milleri*(**Djelloul, 2021**) .

I.2.4.2.4. Bactériocines de Classe IV : Bactériocine complexe

La Classe IV est constituée des peptides nécessitant une partie lipidique ou carbohydrates pour avoir leur activité . A ce jour, aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite (**Makhloufi, 2012**) .

I.2.4.3. La biosynthèse des bactériocines

Les bactériocines sont produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance . Elles peuvent être dégradées par les protéases produites par les bactéries lactiques productrices ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture . Différentes protéines sont impliquées dans la production des bactériocines et sa régulation . Elles sont produites sous forme d'un pré peptide non-biologiquement actif qui subira des modifications post traductionnelles pour aboutir au peptide actif . Cette production est souvent régulée par un système de Quorum Sensing . Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée (**Delesa, 2017 ; Tahlaiti, 2019**) .

I.2.4.4. Mode d'action de bactériocine

Les bactériocine ont des mécanismes d'action distincts et peuvent être divisé en ceux qui favorisent un effet bactéricide, avec ou sans lyse cellulaire, et bactériostatiques, inhibant la croissance cellulaire . Les bactériocines altèrent la perméabilité membranaire des bactéries, soit inhibent la synthèse de leurs peptidoglycane, soit encore agissent en détruisant les liaisons peptidiques entre les peptidoglycans (Nes et al., 2011) .

Les lantibiotiques (bactériocines de classe I), interagissent avec les membranes cellulaires par interaction électrostatique ou par liaison à des récepteurs spécifiques. Ces interactions permettent de former des pores larges et non-spécifiques à la surface des cellules cibles, causant un efflux rapide des composés cytoplasmiques (ions, ATP, acides aminés,...). Elles détruisent donc les bactéries en augmentant leur perméabilité membranaire . Les bactériocines de Classe II agissent de la même manière, en provoquant la perméabilisation de la membrane, ce qui conduit à la mort cellulaire. Pour la Classe III, le mode d'action est complètement différent . En effet, elles agissent par hydrolyse des liens peptidiques entre les peptidoglycans de la membrane des bactéries sensibles. Selon le nombre de bactéries sensibles, le spectre d'action des bactériocines est plus ou moins large (étroit pour la zoocine A, large pour l'entérolysine A et la millericine B) (De freireBastos et al., 2015 ; Bali et al., 2016 ;Tenea et Yépez, 2016) .

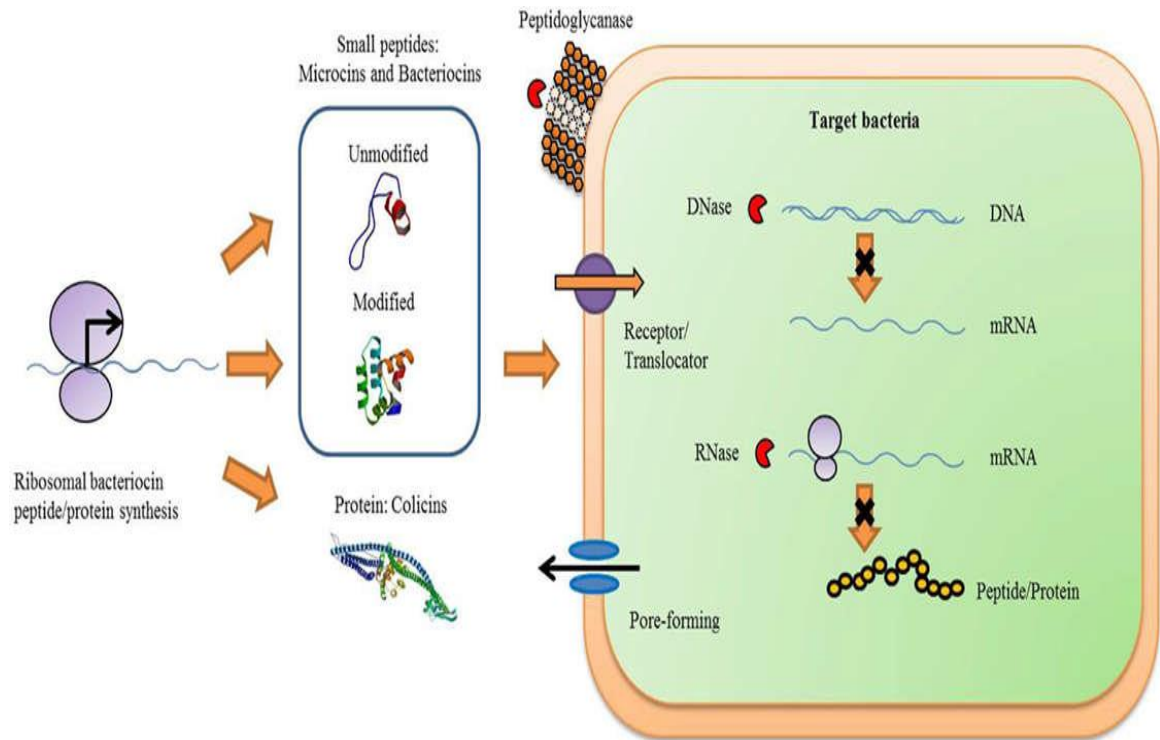


Figure12: Mode d'action des bactériocines (Yanget al., 2014) .

I.2.4.5. Applications potentielles des bactériocines

Les bactériocines produites par LAB ont attiré trop d'attention en raison de leur utilisation sûre et naturelle en tant qu'inhibiteur contre micro-organismes pathogènes dans la production alimentaire (Demir et Başbülbul, 2017) .

I.2.4.5.1. Domaine alimentaire

Les bactériocines sont incolore, inodore et sans saveur, et par conséquent, ne nuisent pas à l'acceptabilité de l'alimentation si elles sont utilisées comme supplément (figure13) . D'un autre côté, elles peuvent facilement être dégradées par les enzymes dans l'hôte ou dans l'environnement, ce qui réduit la possibilité d'interaction de ces fragments dégradés avec les souches cibles et les chances de développement de la résistance (Alvarez et al., 2018) .

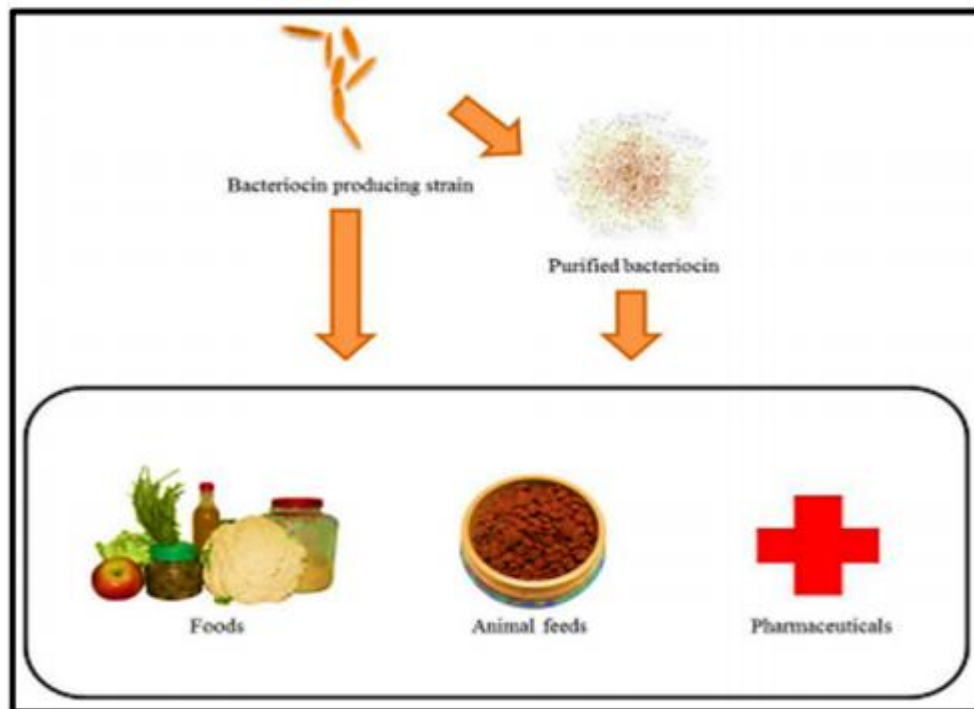


Figure13:Exemples d'application des bactériocines(Alvarez et al., 2018) .

Leur utilisation dans le domaine alimentaire est devenue très intéressante grâce à leur potentiel d'assurer une sécurité microbienne et une bonne qualité du produit alimentaire . L'utilisation des bactériocines comme additifs naturels dans les aliments a suscité l'intérêt du consommateur qui cherche à minimiser l'utilisation des additifs chimiques artificiels dans les produits alimentaires . Plusieurs études ont montré l'efficacité de la nisine en tant qu'agent de conservation dans les aliments comme la truite fumée, les produits à base d'œufs liquides pasteurisés, les fromages et d'autres produits laitiers . En effet, la nisine est la plus étudiée des bactériocines et la seule utilisée commercialement dans les produits alimentaires (Egan et al., 2016) .

I.2.4.5.2.Domaine thérapeutique

Il est urgent de trouver des solutions au nombre croissant d'infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques, l'émergence de la résistance des bactéries pathogènes a orienté la recherche vers de nouvelles molécules antimicrobiennes (Bemena et al., 2014) . Grâce à leur mode d'action différent des antibiotiques conventionnels, les bactériocines, pourraient être considérées comme une alternative prometteuse aux antibiotiques dans le cadre de contrôle de la prolifération et à l'inhibition des souches bactériennes pathogènes émergentes et le traitement des

infections cutanées, systémiques, urogénitales, des gingivites, la mastite, de l'otite,...etc(**Chikindas et al., 2018**) .

Dans le cas du traitement du cancer, certains chercheurs ont démontré que les bactériocines, ont une activité contre les cellules tumorales . À titre d'exemple, des recherches ont démontré in vitro que la nisine a montré des capacités de prévention de la croissance des cellules tumorales . Cette bactériocine et d'autres peptides antimicrobiens in vitro ont mis en évidence qu'ils pourraient avoir une application potentielle en tant que médicaments anticancéreux (**Chikindas et al., 2018 ; Ibrahim, 2019**) .

A cause de leur nature peptidique, les bactériocines sont susceptibles d'être modifiées génétiquement afin de développer des peptides de conception, de biosécurité et de stabilité sur mesure pour obtenir des médicaments plus efficaces dans les traitements (**Cotter et al., 2013 ; Chikindas et al., 2018**) .

I.2.4.5.3.Domaine vétérinaire

Les bactériocines pourraient être utilisées avec les ionophores dans une stratégie visant à prévenir l'apparition d'une résistance . L'utilisation d'une bactériocine à la place d'un antibiotique, par intermittence, aiderait à détruire les populations résistantes. Les ionophores antibiotiques ont un très large spectre d'action, donc ils peuvent agir sur à peu près la moitié de la flore naturelle trouvée dans le rumen des bovins, alors que les bactériocines sont par contre extrêmement spécifiques, ce qui permet, par exemple, de cibler seulement les bactéries qui dégradent des protéines alimentaires ou seulement celles qui produisent du méthane . Un autre avantage qui s'ajoute, tient au fait que les bactériocines sont des protéines non toxiques qui se digèrent facilement. Comme elles sont digérées par l'animal, il n'y a aucun risque qu'il reste des résidus dans la viande ou le lait . Par contre, les ionophores antibiotiques classiques ne sont pas digestibles, sont très toxiques et doivent être manipulés et administrés avec précaution (**Menad,2017**) .

I.2.4.5.4.Domaine agricole

La protection des plantes contre les microorganismes phytopathogènes ainsi que la préservation des semences, sont les objets de l'exploitation des bactériocines en agriculture . Dans ce cas, les substances antibactériennes et substances antifongiques seront associées afin de lutter contre les ravageurs phytopathogènes(**Khodja, 2018**) .

Etude Expérimentale



Matériels et méthodes

II. Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée dans le laboratoire de microbiologie, département des sciences de la nature et de la vie, centre universitaire Abdlhafid Boussouf -Mila- durant la période avril-juin de l'année 2021. L'objectif de ce travail repose sur :

- Etude de l'activité antimicrobienne de quelques souches de bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes de référence,
- Vérification de type d'interaction entre ces bactéries lactiques .

II.1. Matériels

II.1.1. Matériels biologiques

Pour la réalisation de la partie expérimentale, nous nous sommes servi dumatériel biologique suivant :

II.1.1.1. Les souches cibles

Trois souches des bactéries lactiques locales (**Hadef ,2012**) ont été utilisées pour la réalisation de cette étude . Ces souches ont été identifiées par les techniques de microbiologie classique. Le nom des espèces et leurs origines sont portés sur le tableau 2 .

Tableau 2 : Souches de bactéries lactiques utilisées.

Souches bactériennes	Code	Origine
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LB 1	Produits laitiers
<i>Lactobacillus brevis</i>	LB2	Produits laitiers
<i>Lactobacillus casei</i>	LB 3	Produits laitiers

II.1.1.2. Les souches de références

Pour la mise en évidence des activités antimicrobiennes des souches lactiques, cinq (05) bactéries indicatrices de références ont été utilisées (tableau 3) : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aereuginasa* . Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire de Contrôle de qualité et de la conformité "Ghaouat" d'Aïn Mlila, Oum El Bouaghi .

Tableau 3 : Souches de références utilisées.

Souches bactériennes	Code	Gram
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	Positive
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC10987	Positive
<i>Escherichia coli</i>	ATCC11303	Négative
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	Négative
<i>Salmonella gallinarum</i>	ATCC700623	Négative

II.1.2. Milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés lors de notre travail étaient soit liquide, soit solide par addition d'Agar (15g/L). Ils sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 10 min. (**Annexe I**) .

- Gélose Chapman ;
- Gélose Hektoen ;
- Gélose King A ;
- Gélose Mueller-Hinton ;
- Milieu MRS 1% de lait écrémé +0,05% d'extrait de levure ;
- Milieu MRS bouillon et gélose ;
- Milieu nutritif bouillon et gélose .

II.1.3. Appareillage

- Agitateur électrique (Stuart) ;
- Autoclave (Pbinternational) ;
- Bain marie (memmert);
- Balance (Kern);
- Centrifugeuse (Sigma);
- Etuve (Memmert) ;

- Microonde (Rotel) ;
- Micropipette (Socorex) ;
- Microscope optique (Optika);
- pH-mètre (Hannainstruments) ;
- Pied a coulisse (Stainless hardened);
- Réfrigérateur (Campingaz);
- Spectrophotomètre (Jenway);
- Vortex électrique (Fisher scientific) .

II.1.4. Réactifs, colorants et autres

- L'eau oxygéné ;
- Eau physiologique ;
- Ethanol 96° ;
- Extrait de levure ;
- Fuchsine ;
- Glycérol ;
- Huile à immersion ;
- Lait écrémé ;
- Lugol ;
- NaCl ;
- NaOH ;
- Violet de Gentiane .

II.2. Méthodes

II.2.1. Revivification et purification des souches bactériennes

La revivification des souches consiste à les cultiver sur des milieux liquides et les incuber à 37°C pendant 24 à 48h (les LB sur bouillon MRS et les bactéries pathogènes de références sur bouillon nutritif) . Le développement de ces bactéries se traduit par un trouble et une pastille blanche au fond de tube caractéristique des LB .

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon (MRS, milieu nutritif, chapman, King A et Hektoen) . Sur gélose,

L'ensemencement a été effectué par la méthode des stries, l'incubation a été faite à 37°C pendant 24h jusqu'à l'obtention des colonies homogènes de même forme, même taille et de même couleur (**Idoui et al., 2009**) .

II.2.2.Conservation des isolats

II.2.2.1.Conservation à court terme

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu MRS solide. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines (**Badiset al., 2005 ; Brahimi, 2015**).

II.2.2.2.Conservation à long terme

La conservation à long terme des souches est effectuée sur milieu enrichi à raison de 0,05 % d'extrait de levure et 20% de glycérol à -20°C . En cas de besoin, les souches sont repiquées avant l'utilisation (**Badis et al., 2005 ; Belarbi, 2011 et Chentouf, 2015**).

II.2.3.Confirmation de la pureté

II.2.3.1.Examen macroscopique

La morphologie des colonies et leur dimension sont étudiées à partir des cultures obtenues sur la gélose MRS et la gélose nutritive . Elle consiste à étudier la forme, l'aspect, le contour, la surface et la couleur des colonies .

II.2.3.2.Examen microscopique

L'observation microscopique au grossissement ($G \times 100$) permet de classer les bactéries selon leur gram (+/-), leur morphologie cellulaire (les coques et les bâtonnets) et leur mode d'association . Elle a été effectuée sur un frottis bactérien, préparé à partir des colonies suspectes en cultures pures .

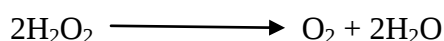
➤ Coloration de Gram

La coloration de gram a été effectuée après l'examen macroscopique des colonies sur gélose, et dans le but d'écarter tout ce qui ne peut pas être pure, les isolats ont été soumis à la coloration de gram en suivant la méthode décrite par Camille en

2014.(Annexe II) .

II.2.3.3.Recherche de la catalase

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase . Celle-ci décompose l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame en verre, sur laquelle on ajoute une goutte du H_2O_2 à 10 volumes . La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz (Guy et al., 2006) .

II.2.4.Etude des interactions bactériennes

Il existe deux types d'interactions entre les micro-organismes : direct et indirect. Dans cette partie nous avons étudié l'effet entre les souches pures (bactéries lactiques) sur la croissance des unes sur les autres et d'autre part, les souches lactiques vis-à-vis des souches pathogènes de références .

II.2.4.1. Test de coexistence

L'interaction entre les souches lactiques a été étudiée selon le protocole expérimental décrit par (Guo et al.,2010),qui consiste à ensemencer en stries perpendiculaires croisées la surface d'une gélose MRS, préalablement coulée dans des boîtes de Pétri, à partir des suspensions bactériennes jeunes (18 heures) préparées dans le bouillon MRS .

La symbiose est révélée par l'absence des zones d'inhibition (au niveau des points de rencontre entre les stries croisées) par contre l'antagonisme se traduit par la présence de ces dernières après une incubation à 37°C pendant 24h .

II.2.5. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

Les souches de bactéries lactiques sont testées pour leur pouvoir antibactérien à partir des cultures jeunes en phase de croissance (phase exponentielle) contre cinq bactéries pathogènes de références : *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC11303, *Salmonella gallinarum* ATCC700623, *Bacillus cereus* ATCC10987 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 .

Le principe de la détection de l'activité antimicrobienne est basé sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans des milieux de culture solides pour inhiber la croissance des micro-organismes indicateurs sensibles . La mise en évidence de l'activité antimicrobienne est effectuée sur quelques souches représentant des espèces d'intérêt . Les souches révélant une activité inhibitrice sont testées par la suite par des tests indirect dit des puits (**Izquierdo et al., 2009**) .

Pour confirmer l'activité antagoniste de nos 3 souches lactiques, nous avons utilisé deux méthodes : la méthode des spots et des disques .

II.2.5.1. Préparation des suspensions bactériennes

Pour réaliser le test d'antagonisme, il faut avoir des pré-cultures jeunes des souches cibles et des souches indicatrices . A partir des boîtes de Pétri de gélose MRS et gélose nutritive, nous avons ensemencé chacune des souches lactiques et pathogènes dans des tubes à essai contenant 10 ml du bouillon MRS et du bouillon nutritif respectivement. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures .

La standardisation des souches indicatrices consiste à réaliser des dilutions de ces cultures dans l'eau physiologique pour obtenir une densité optique à 600nm comprise entre 0,08 et 0,1 .

II.2.5.2. Méthode des spots

La méthode décrite par (**Alegria et al., 2010**) a été appliquée : après avoir rempli les boîtes de Pétri avec de la gélose MRS (solidifiée et séchée), les suspensions bactériennes des souches LB1, LB2 et LB3 sont déposées en spots sur la surface . Les boîtes sont séchées près du bec benzun pendant 30 min puis incubées à 37°C pendant 18 h . Après la période d'incubation, les spots sont recouverts d'une couche de 10 ml d'une gélose Mueller-Hinton (MH) en surfusion ensemencée avec 1 ml d'une culture jeune des souches indicatrices, puis les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h. L'apparition d'un halo clair autour du spot détermine l'inhibition par la souche lactique .

II.2.5.3. Méthode des disques

Le milieu Mueller-Hinton est coulé dans des boîtes de Pétri stériles, après solidification du milieu, les boîtes sont ensemencées en surface par la suspension de la souche pathogène avec un écouvillon stérile, les disques de papiers Wattman stériles de

06 mm de diamètre sont ensuite déposés sur le milieu de culture (trois disques : un disque pour chaque souche de bactéries lactiques), chaque disque reçoit un volume de 10 µl de la suspension des bactéries lactiques (LB1, LB2 et LB3) . Une fois les boîtes sont séchées à température ambiante, elles sont incubées à 37°C pendant 24h . L'inhibition de la souche indicatrice se traduit par la formation de zones claires autour des disques et les diamètres des zones sont mesurés (Shehata et al., 2016) .

II.2.5.4. Activité inhibitrice du surnageant

Pour mieux connaître les agents intervenant dans l'activité antimicrobienne des souches lactiques, nous avons évalué l'activité inhibitrice du surnageant natif et celui neutralisé de nos souches en appliquant la technique de diffusion en puits sur gélose décrite par (Argyri et al., 2013) . Ce test consiste à mettre en contact le surnageant récupéré après centrifugation des cultures des souches lactiques avec les cinq souches cibles .

II.2.5.4.1. Préparation des surnageants

Les cultures bactériennes jeunes (LB1, LB2 et LB3) de 18h sont soumises à une centrifugation à 10000 rpm/12min, ensuite, les surnageants obtenus ont été divisés en deux volumes dont le premier est dit surnageant natif, et le deuxième est ajusté à pH 6,5 avec du NaOH (1N) : le surnageant neutralisé .

II.2.5.4.2. Effet du surnageant natif et neutralisé

Un volume du milieu MH est coulé dans des boîtes de Pétri stériles . Après solidification du milieu, les boîtes sontensemencées en surface par la suspension de la souche pathogène (la DO_{600} varie entre 0,08 et 0,1), puis des puits de 6 mm de diamètre sont confectionnés stérilement, et seront remplis par 50µl de surnageant (natif ou neutralisé) et de bouillon MRS comme témoin . Les boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C pendant 2heures pour permettre la bonne diffusion des substances inhibitrices . Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, l'activité antimicrobienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits. Les diamètres des zones seront mesurés et le résultat est considéré positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 2mm .

Résultats et Discussion



III. Résultat et discussion

III.1.Revivification et confirmation de la pureté des souches

III.1.1. Les bactéries lactiques

III.1.1.1.Examen macroscopique

La revivification des souches lactiques a été réalisée sur milieu MRS. L'observation macroscopique a indiqué la présence d'un trouble homogène avec une pastille blanche au fond de tube désignant la viabilité de la souche lactique. Sur milieu solide, l'ensemble des colonies étudiées révèle un aspect presque semblable; elles sont lisses légèrement bombées, avec contour régulier, translucides ou opaques, de petite taille 1 - 2 mm, et de couleur blanche (Tableau 4).

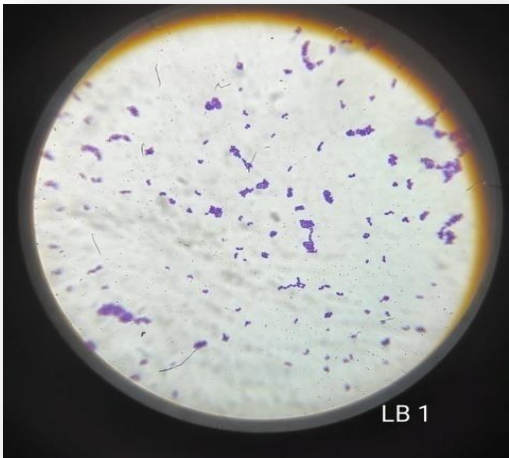
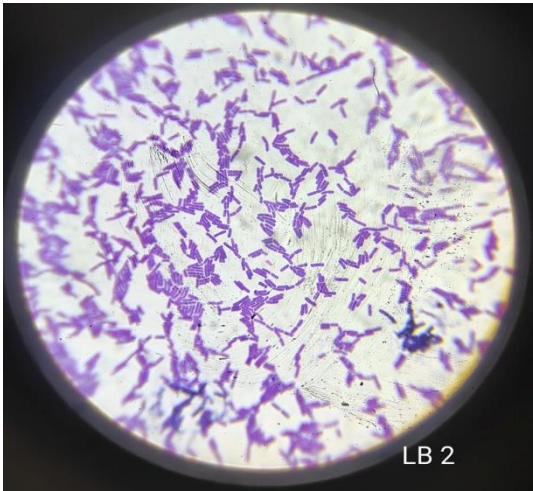
Tableau 4: Observation macroscopique des bactéries lactique sur milieu MRS .

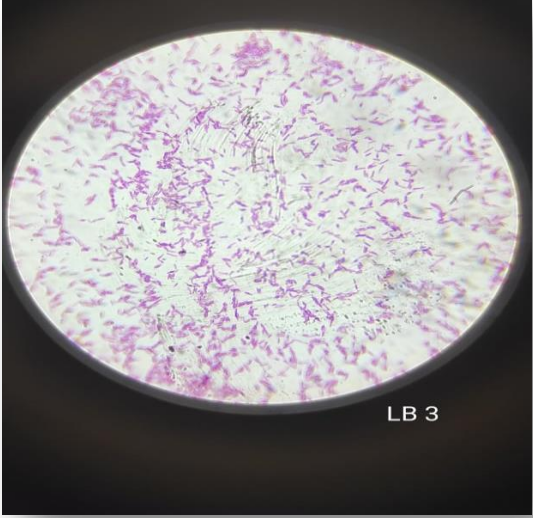
Les souches	Examen macroscopique						
	Gélose					Bouillon	
	Dimension mm	Forme	Couleur	Conteur	Surface	Culot	Trouble
LB 1	0,8 < Ø < 1	Bombée	Blanche, opaque	Régulier	Lisse	+	+
LB 2	0,8 < Ø < 1	Bombée	Blanche, translucide	Régulier	Lisse	+	+
LB 3	0,8 < Ø < 1	Bombée	Blanche, Opaque	Régulier	Lisse	+	+

III.1.1.2. Examen microscopique

L'étude microscopique des bactéries lactiques après la coloration de gram (tableau 13), nous a révélé que les souches sont toutes à gram positif . Ce test nous a permis de distinguer également la morphologie et le mode de regroupement des bactéries lactiques : les trois souches (LB1, LB2 et LB3) sont sous forme de bâtonnets . Ces souches ont été disposées en paires, en courtes chaînettes ou isolées .

Tableau 5 : Observation microscopique des souches lactiques (avec grossissement $\times 100$) .

Les souches	Gram	Forme
 LB 1	Gram positif	Bacille isolée ou dipobacille
 LB 2	Gram positif	Bacilles en courtes chaînettes

 LB 3	Gram positif	Bacilles en courtes chaînes
---	--------------	-----------------------------

La confirmation de la pureté est complétée par la recherche de la catalase. Nous avons noté une absence de la formation des bulles (aucune enzyme catalase pour hydrolyser le peroxyde d'hydrogène) représente une réaction négative .

III.1.2. Les bactéries pathogènes de référence

III.1.2.1.Examen macroscopique

Les milieux Nutritif, Chapman, Hektoen et King A ont été utilisés pour la revivification et la confirmation de la pureté des souches pathogènes de référence . L'observation macroscopique des cultures en milieu liquide a révélé la présence d'un trouble homogène indiquant une bonne croissance des souches . Sur milieu solide, les colonies étudiées possèdent des aspects différents résumés dans le tableau 6 .

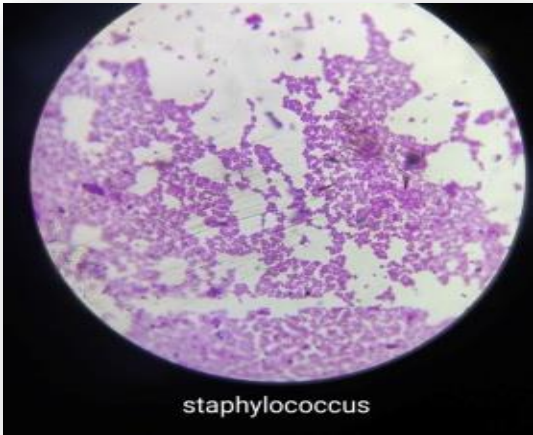
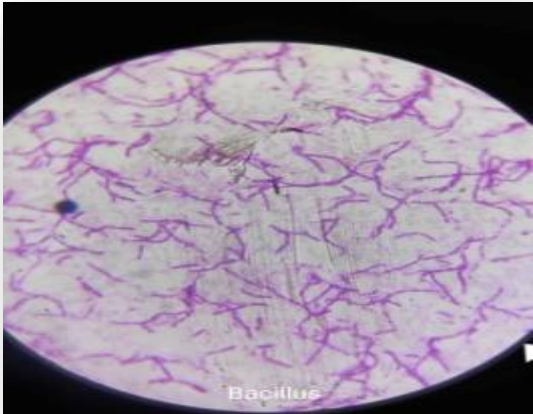
Tableau 6 : Observation macroscopique des bactéries pathogènes de référence .

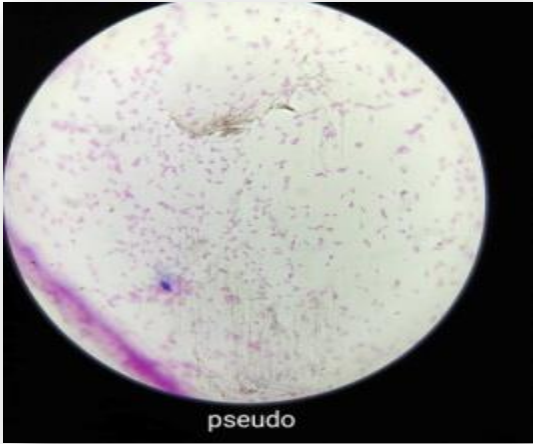
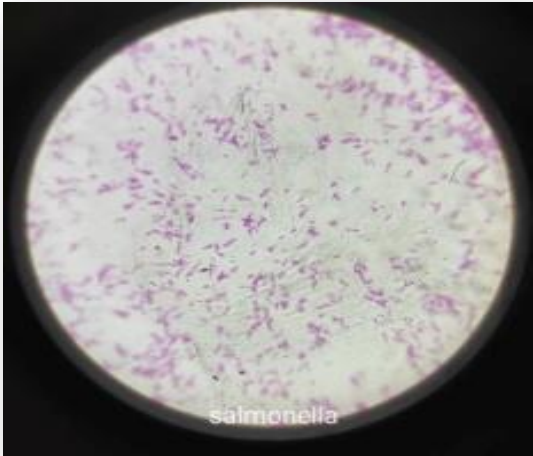
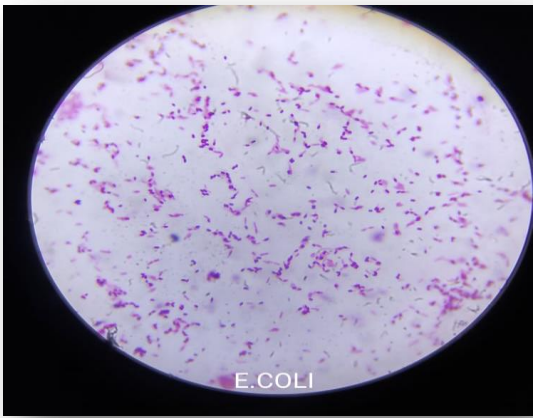
Les souches	Examen macroscopique					
	Gélose					Bouillon
	Dimension mm	Forme	Couleur	Contour	Surface	Trouble
<i>Salmonella gallinarum</i> (Hektoen)	$0,7 < \varnothing < 1,5$	Ronde	Blanc crème	Bordure en brosse des cellules intestinales	Lisse	+
<i>E. coli</i> (milieu nutritif)	$1 < \varnothing < 2$	Ronde	Blanc	Bords réguliers	Lisse	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (King A)	$2 < \varnothing < 4$	Ronde	Blanc	Bords irréguliers	Lisse bombée	+
<i>Bacillus cereus</i> (milieu nutritif)	$0,5 < \varnothing < 2,5$	Ronde	Blanc crème ou jaune	Bords irréguliers	Lisse brillante	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (Chapman)	$0,7 < \varnothing < 1$	Ronde	Blanc	Bords réguliers	Lisse	+

III.1.2.2. Examen microscopique

Pour confirmer la pureté des souches pathogènes de référence revivifiées, une de coloration de gram a été réalisée . Cette dernière a permis de distinguer entre les bactéries à gram positif (de couleur violette) et les bactéries à gram négatif (de couleur rose). La forme et le mode de disposition a été aussi noté : ces bactéries sont sous forme de bâtonnet ou de coques regroupé différemment (tableau 7).

Tableau 7 : Observation microscopique des bactéries pathogènes (avec grossissement $\times 100$) .

Les souches	Gram	Forme
 staphylococcus <i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	Cocci arrondie sous la forme diplocoque ou sous forme d'amas ayant la forme de grappes de raisin
 Bacillus <i>Bacillus cereus</i>	Positif	Bâtonnet, forme irrégulière

 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	Bâtonnet (isolé ou en diplobacilles)
 <i>Salmonella gallinarum</i>	Négatif	Bâtonnet
 <i>E.coli</i>	Négatif	Bâtonnet

III.2. Les interactions entre les bactéries lactiques

Ce test est d'une grande importance, il va mettre en évidence les caractéristiques que possèdent certaines souches de bactéries lactiques à stimuler ou inhiber d'autres souches de même espèce ou d'espèce différente, une fois mise en contacte . Le tableau 8 et la figure 14 présentent les résultats obtenus.

Dans l'industrie de fermentation, il est assez rare l'utilisation d'une seule souche de bactéries lactiques . En règle générale, on associe plusieurs souches, voir plusieurs espèces et genres bactériens . Donc ce test est nécessaire pour combiner entre les souches lactiques étudiées à fin d'obtenir des collections de probiotiques ou des ferments mixtes .

Tableau 8: Interactions entre les bactéries lactiques .

Les souches	LB 2	LB 3
LB 1	-	-
LB 2	-	-

- : symbiose

Les résultats obtenus montrent que tous les *Lactobacillus* testées sont symbiotiques et n'exercent aucune activité inhibitrice entre elles . Cela est en accord avec les résultats trouvés par **Guo et al. (2010)** et **Hadef(2012)** qui ont analysé des souches de bactéries lactiques . D'autre part, ils sont en contradiction à ceux obtenus par **Tahlaiti (2019)** qui a montré qu'il y a des inhibitions inter-bactériennes entre les *Lactobacillus* testées avec un taux de 62,05%.



Figure 14 : Les interactions entre les souches lactiques.

III.3. Activité antimicrobienne des souches lactiques

Les bactéries lactiques sont connues par la production de plusieurs types de composés antimicrobiens: les acides organiques, les bactériocines, les acides gras à courte chaîne, le diacétyl et le peroxyde d'hydrogène (Armas et al., 2017 ; Reuben et al., 2020). D'un autre côté, l'activité antibactérienne des bactéries lactiques est de grande importance pour une colonisation réussie des muqueuses intestinales . Ces organismes peuvent fonctionner comme des barrières microbiennes contre les pathogènes gastro-intestinaux par exclusion compétitive, modulation du système immunitaire de l'hôte et la production de composés inhibiteurs (Al-Dhabi et al., 2020 ; Barzegar et al., 2021) .

Pour détecter l'activité antimicrobienne vis-à-vis les bactéries pathogènes, plusieurs méthodes ont été utilisées . En général, les tests d'antagonisme sont basés sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans des milieux de cultures solides impliquent la détection de l'inhibition de la croissance des micro-organismes indicateurs sensibles .

III.3.1. Méthode des spots

L'activité antimicrobienne des bactéries lactiques a été testée sur milieu MRS (milieu favorisant la croissance des LB par la méthode des spots . A travers les résultats obtenus, nous constatons que les trois souches lactiques possèdent une activité antagoniste à l'égard des souches indicatrices utilisées et l'effet inhibiteur diffère d'une souche à une autre dont nous avons noté des zones d'inhibition importante avec les deux souches *Salmonella gallinarum* ATCC700623, et *Bacillus cereus* ATCC10987 .

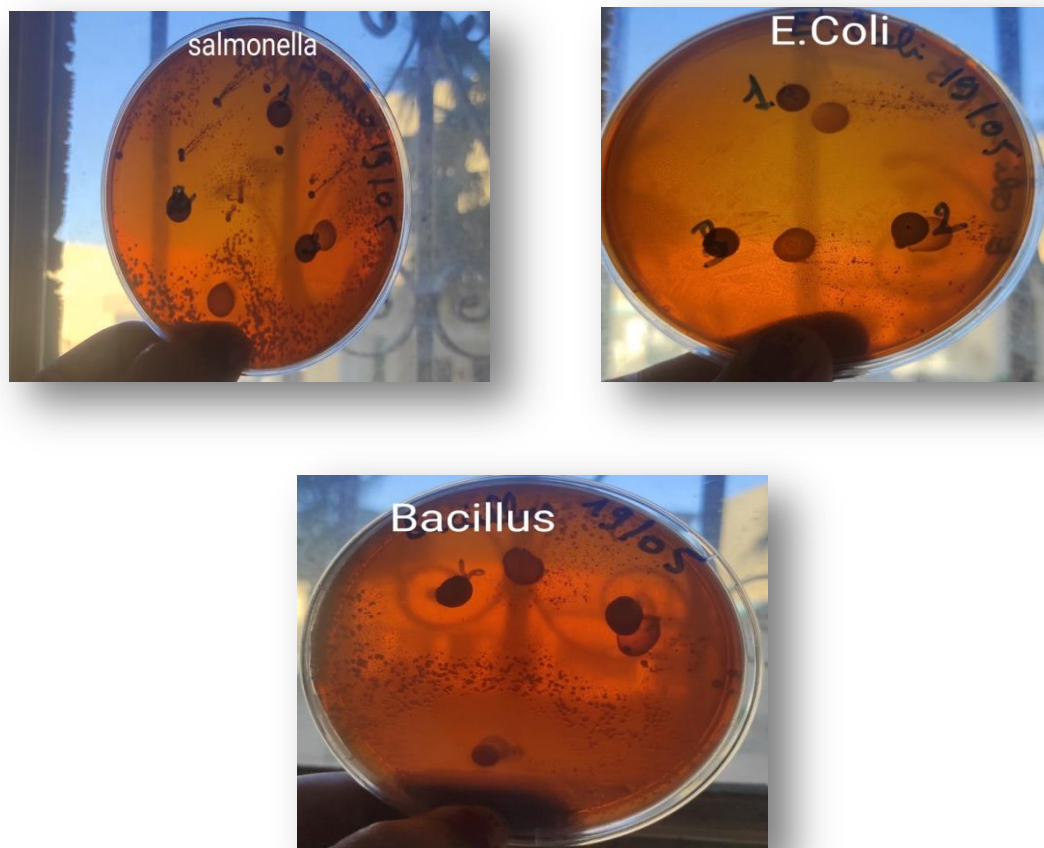


Figure 15 : L'activité antagoniste des souches lactiques vis-à-vis les bactéries pathogènes. (*Salmonella gallinarum* ATCC700623, *Bacillus cereus* ATCC10987 et *E. coli* ATCC11303).

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par **Obabiyi et al. (2018)** et **Bouguerra (2021)** en utilisant la même technique. Ils ont trouvé que tous les isolats lactiques représentent un effet active contre toutes les bactéries indicatrices à gram + et à gram - .

III.3.2.Méthode des disques

Pour tester l'antagonisme des souches lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes et d'altération des aliments, la technique des disques sur milieu Mueller-Hinton a été appliquée. Cette méthode est la plus utilisée pour le dépistage de ce type d'activité . Le milieu Mueller-Hinton est recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la méthode de diffusion. Le tableau 9 résume les résultats obtenus .

Tableau 9 : Illustration de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques (LB 1, LB 2 et LB 3) vis-à-vis des souches pathogènes par méthode des disques .

(*E. coli* ATCC11303, *Salmonella gallinarum* ATCC700623, *Bacillus cereus* ATCC10987, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853).

Les souches pathogènes	Dimension des zones d'inhibition mm		
	LB 1	LB 2	LB 3
<i>Salmonella gallinarum</i>	7,4	8,5	10,9
<i>Bacillus cereus</i>	7	8,1	8,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,8	7,6	10,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,6	10	8
<i>E. coli</i>	10	14,5	11,5



A



B



C

Figure 16 : L'activité antagoniste des souches lactiques isolée vis-à-vis les bactéries pathogènes (A : *Bacillus cereus* ATCC10987 ; B : *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ;C: *E. coli* ATCC11303).

Sur la base des résultats obtenus, les trois souches lactiques possèdent une activité antimicrobienne plus ou moins importante d'une souche à une autre (malgré les conditions de culture elles même) :

- LB 1 possède une haute activité contre *E. coli* et *Staphylococcus aureus* avec spectre d'action entre 9,8 -10 mm, une activité moyenne contre *Salmonella gallinarum* et *Bacillus cereus* 7 -7,4 mm, et une faible activité contre *Pseudomonas aeruginosa* avec 6,6 mm ;
- LB 2 possède une haute activité contre *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* avec une zone d'inhibition s'étalant entre 10 -14,5 mm et contre *Salmonella gallinarum*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* avec un diamètre entre 7,6 - 8,5 mm;
- LB 3 possède une haute activité contre *E. coli*, *Salmonella gallinarum* et *Staphylococcus aureus* avec spectre d'action entre 10,4 -11,5 mm et une activité moyenne contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus* pour un spectre d'action d'environ 8,1 mm .

Le diamètre des zones d'inhibition varie entre les souches, une Zi maximale était détectée avec *E. coli* à 14,5 mm par la souche LB2 et le diamètre minimal observé contre *Pseudomonas aeruginosa* à 6,6 mm par la souche LB1 . Les LB 1 et LB 3 possèdent un haut spectre d'action contre les mêmes souches pathogènes *E. coli* et *S. aureus*.

La méthode de (**Fleming et al.,1975**) repose sur les interactions entre cellule –cellule ,c.-à-d., un contact directe, l'effet inhibiteur de ce test remonte à plusieurs facteurs : la concurrence pour les nutriments sans synthèse des métabolites inhibiteurs ou à leur faible production sous les conditions de culture utilisées .

Nos résultats sont similaires avec ceux de **Belhamra (2019)**,qui a trouvé que les souches de *Lactobacillus* testées ont une activité inhibitrice contre les microorganismes pathogènes de gram positif et négatif et elles ont donné un bon spectre d'activité contre *Salmonella gallinarum* et *Staphylococcus aureus* . La différence est que *E. coli* et *Bacillus cereus* ont donné un même effet, par contre dans notre travail *E. coli* est très sensible par rapport *Bacillus cereus* .

Les travaux de **Nigam et al.(2012)** **Ravindran et al.(2016)** ont montré une bonne inhibition de quelques collections de bactéries lactiques à l'égard des souches pathogènes. De même, **Yerlikaya et al. (2021)**ont confirmé l'effet antagoniste des *Lactobacillus* et *Streptococcus* utilisés comme ferment dans l'industrie laitière.

III.3.3.Activité inhibitrice du surnageant

Pour mieux comprendre les mécanismes de l'activité inhibitrice de nos bactéries lactiques, la méthode de diffusion en puits a été effectuée. Cette technique permet de mettre en contact les surnageants natif et neutralisé, (après élimination des cellules par centrifugation) des bactéries lactiques avec les souches pathogènes indicatrices . Cela peut indiquer l'agent responsable impliqué dans le phénomène d'inhibition. L'activité inhibitrice se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits (Figure 17). Les résultats sont illustrés dans le tableau 10 et la figure17 .

Tableau 10 : Illustration de l'effet inhibiteur des surnageants natif et neutralisé (LB 1, LB 2 et LB 3) vis-à-vis les souches pathogènes par la méthode des puits .

Les souches pathogènes	Dimension des zones d'inhibition mm					
	Surnageant natif			Surnageant neutralisé		
	LB 1	LB 2	LB 3	LB 1	LB 2	LB 3
<i>Salmonella gallinarum</i>	6	6	6	6	6	7
<i>Bacillus cereus</i>	11,5	15	21	15	21	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,5	20	15	11	15	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	9	10	6,5	12	9
<i>E. coli</i>	8	7	6,5	11	12,5	6



a



a'

A : *Salmonella gallinarum* ATCC 700623 (a : natif, a' : neutralisé).

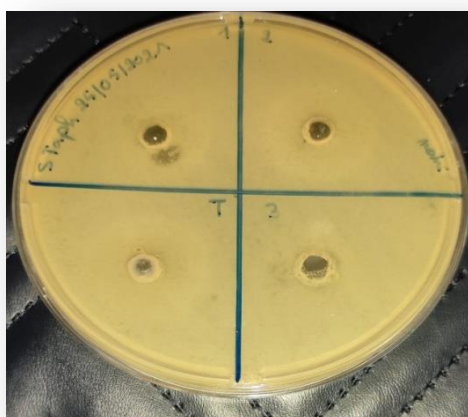


b

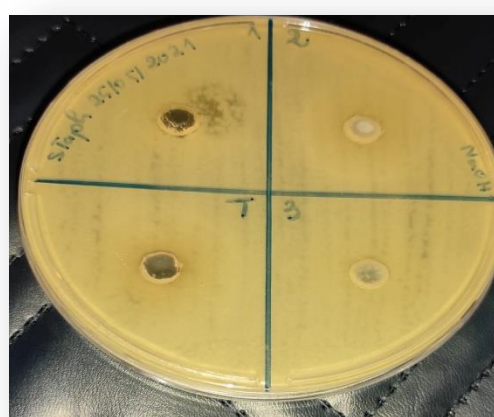


b'

B : *Bacillus cereus* ATCC10987 (b : natif, b' : neutralisé) .

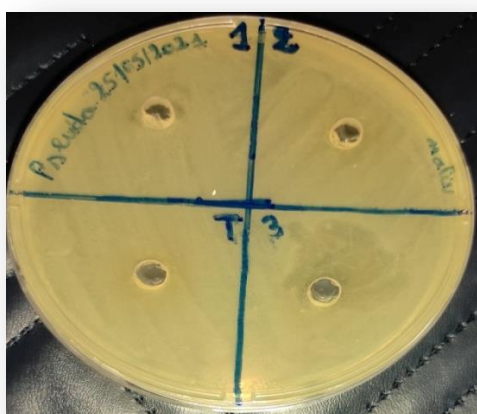


c



c'

C : *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (c : natif ; c' : neutralisé) .



d



d'

D : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (d : natif, d' : neutralisé) .



e

e'

E : *E. coli* ATCC 11303 (e: natif, e' : neutralisé) .

Figure 17: L'activité antagoniste des surnageants natif et neutralisé vis-à-vis les bactéries pathogènes par la méthode des puits .

Ces résultats confirment que nos bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antimicrobienne. L'ensemble des souches ne présente pas le même spectre d'action vis-à-vis les bactéries pathogènes . La majorité des souches sont actives sur les bactéries à gram positif mais pas tous sur les bactéries à gram négatif .

III.3.3.1. Cas de surnageant natif

- LB 1 possède une haute activité contre *Bacillus cereus* avec spectre d'action de 11,5 mm, moyennement contre *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* entre 8 - 9 mm et absence d'activité contre *Salmonella gallinarum*;
- LB 2 possède une haute activité contre *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* avec spectre d'action entre 15-20 mm, une moyenne activité contre *Pseudomonas aeruginosa* 9 mm, presque nulle pour *E. Coli* avec 7 mm et absence d'activité contre *Salmonella gallinarum*;
- LB3 possède une haute activité contre *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* avec spectre entre 15-21 mm, une moyenne activité contre *Pseudomonas aeruginosa* avec spectre d'action de 10 mm et presque inexistante chez *E. coli*, *Salmonella gallinarum* avec diamètre de 6-6,5 mm .

D'après ces résultats les LB2 et LB3 possèdent un haut spectre d'action contre *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*, alors que LB1 a un faible spectre d'action par rapport aux autres *Lactobacillus*. La souche de *Salmonella gallinarum* est résistante pour toutes les souches.

Tous les *Lactobacillus* ayant une activité inhibitrice vis-à-vis des souches nuisibles, ceci est dû à la sécrétion de tous les métabolites toxiques (l'acide lactique, H_2O_2 , CO_2 et bactériocines) qui travaillent en coopération entre eux. Ces derniers sont libérés grâce à l'influence des bactéries pathogènes sur LB avec des effets spécifiques d'une souche à une autre.

Ces résultats se concordent avec ceux obtenus par **Tebyania et al. (2017)** qui ont noté que les métabolites de *Lactobacillus* agissent avec un potentiel élevé à l'encontre des bactéries à gram positifs. De même **Menad (2017)** a montré que les *Lactobacillus* ne possèdent aucune activité contre la souche *Salmonella gallinarum*.

Pour confirmer l'effet du surnageant natif à la différence du surnageant neutralisé, nous avons mesuré le pH après 6 h et 24 h d'incubation de nos souches lactiques. D'après le tableau 19 ci-dessous, nous avons remarqué qu'il y a une vraie diminution du pH après 6 et 24 heures et cela confirme que les LB produisent de l'acide lactique. Mais avec certaines souches comme *Salmonella gallinarum* cette diminution de pH n'est pas responsable de l'effet inhibiteur.

Tableau 11 : Variation de pH après 6 h et 24 h.

LB	MRS	pH après 6 heures	pH après 24 heures
LB 1	6,5	5,70	4,17
LB 2	6,5	5,73	4,20
LB 3	6,5	5,61	4,60

III.3.3.2. Cas de surnageant neutralisé

L'addition de NaOH et l'incubation en conditions d'anaérobiose ont servi à éliminer l'effet inhibiteur des acides organiques et le peroxyde d'hydrogène.

- LB 1 neutralisé possède une haute activité contre *Bacillus cereus* avec une zone d'inhibition de 15mm, moyenne activité contre *E. coli* et *Staphylococcus aureus* avec un spectre de 11mm, et presque nulle contre *Pseudomonas aeruginosa* avec 6,5 mm et absence d'activité contre *Salmonella gallinarum*;
- LB 2 neutralisé possède une haute activité contre *Bacillus cereus* avec 21 mm, une moyenne activité contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli* avec spectre entre 12-15 mm et absence d'activité contre *Salmonella gallinarum*;
- LB 3 neutralisé possède une haute activité contre *Bacillus cereus* avec une zone d'inhibition de 15 mm, une moyenne activité contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* avec spectre entre 9-10 mm et faible activité contre *Salmonella gallinarum* avec 7 mm et absence d'activité contre *E. coli*.

LB2 est très active avec spectre d'action maximale de 21 mm . Tous les *Lactobacillus* ayant une activité inhibitrice élevée contre *Bacillus cereus* ; et toujours *Salmonella gallinarum* résiste au ses isolats .

D'après ces résultats obtenus, nous pouvons déduire que les trois souches de *Lactobacillus* se caractérisent par la production de substances inhibitrices du genre bactériocine vis-à-vis les bactéries pathogènes . Généralement ces substances fonctionnent selon la spécificité des souches : composition des protéines, des phospholipides membranaires et de la couche de peptidoglycane . Le poids moléculaire et la propriété hydrophobe du bactériocine empêchent d'atteindre la barrière membranaire des bactéries pathogènes à gram négatif mais la présence des récepteurs spécifiques dans les bactéries à gram positif permet de la traversée facilement(Simons, A et al., 2020) .

Nos résultats obtenus ont montré que 60% des souches testée ont manifesté une excellente activité antagoniste à l'égard des souches pathogènes, à l'opposé, 40% des souches testées ont présenté une faible activité antagoniste ; cela ne corresponde pas aux travaux des deux auteurs **Mekri(2016)** et **Djelloul(2021)**,qui ont montré que les souches ayant une excellente activité appariaient avec un faible pourcentage, alors que les isolats a faible activité appariaient avec un haut pourcentage .

Selon **Menad(2017)**qui étudié l'effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis *Salmonella gallinarum sp*, les *Lactobacillus* génèrent des substances antimicrobiennes ont un effet meilleure contre cette souche, cela est en contradiction avec nos résultats où les *Lactobacillus* n'ont pas présenté aucun effet inhibiteur .

Ce pendant **Tahlaiti(2019)** a étudié les propriétés technologiques et inhibitrices de quelques bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté. Il a constaté une absence totale des zones d'inhibition malgré le nombre important de répétitions. Ce dernier se concorde avec nos résultats .

III.4.Comparaison entre d'activité desLB vis-à-vis les souches pathogènesen utilisant la méthode des disques et des puits

Cette comparaison aide à comprendre le mécanisme d'inhibition de nos souches lactiques et leurs comportement vis-à-vis les bactéries pathogènes . Les résultats sont illustrés dans les figures 18, 19, 20,21 et 22 .

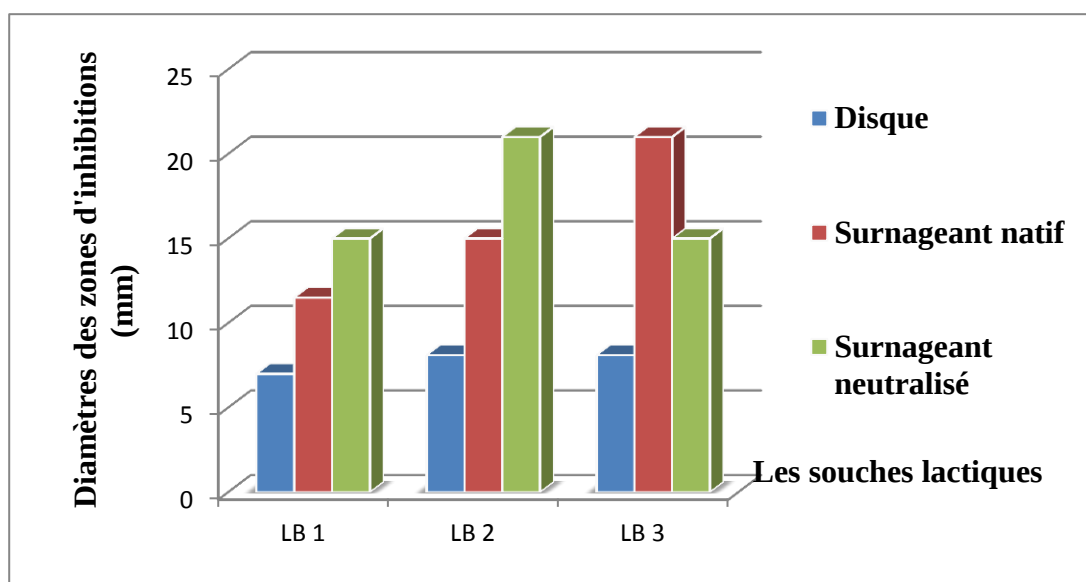


Figure 18 : Taux d'inhibition de *Bacillus cereus* obtenu par les souches lactiques selon les méthodes des disques et des puits (surnageant natif et neutralisé) .

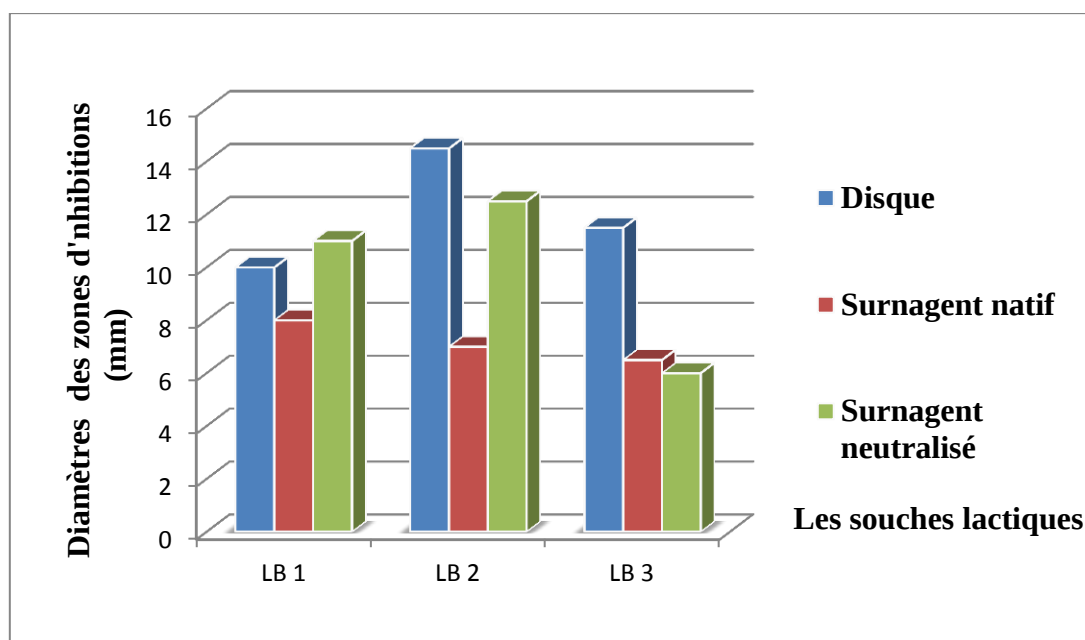


Figure 19 : Taux d'inhibition de *E. coli* obtenu par les souches lactiques selon les méthodes des disques et des puits (surnageant natif et neutralisé) .

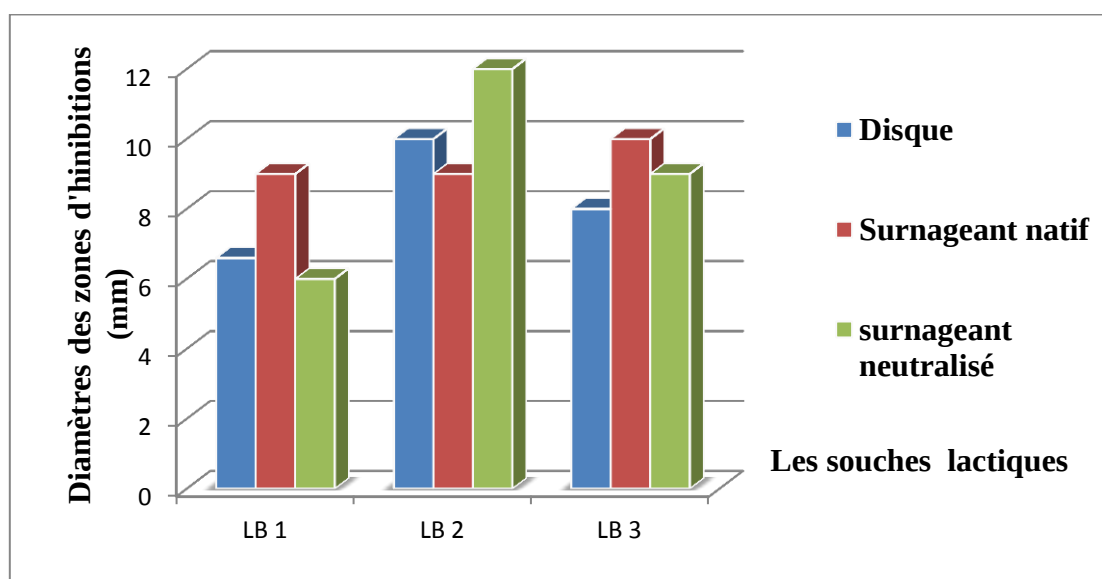


Figure 20 : Taux d'inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* par les souches lactiques selon les méthodes des disques et des puits (surnageant natif et neutralisé) .

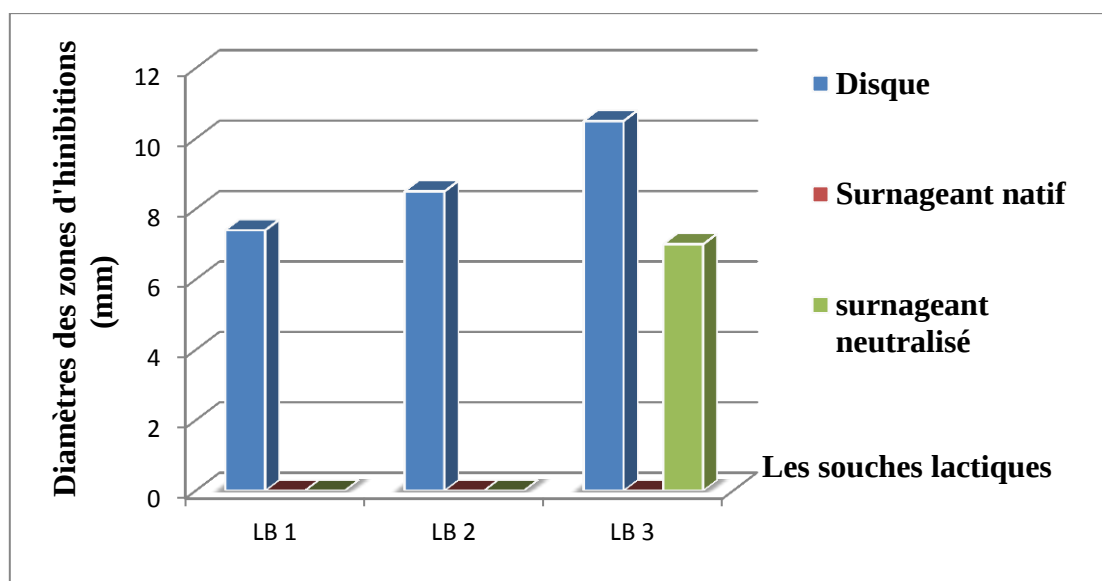


Figure 21 : Taux d'inhibition de *Salmonella gallinarum* par les souches lactiques selon les méthodes des disques et des puits (surnageant natif et neutralisé) .

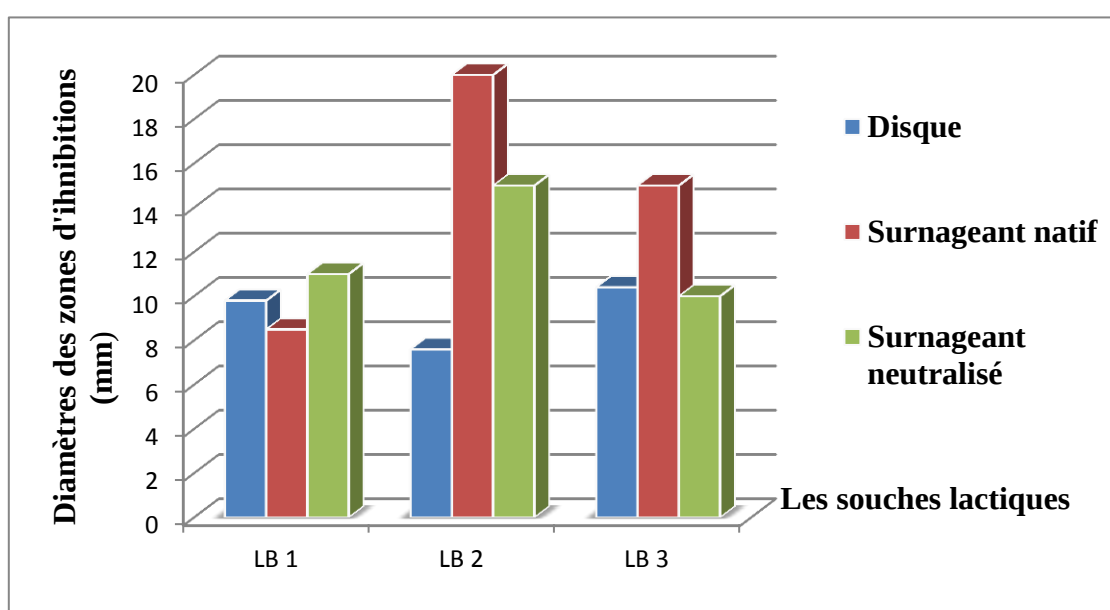


Figure 22 : Taux d'inhibition de *Staphylococcus aureus* par les souches lactiques selon les méthodes des disques et des puits (surnageant natif et neutralisé) .

Selon ces résultats, les souches de *Lactobacillus* possèdent une activité inhibitrice avec un pourcentage différent, cette inhibition est meilleure pour les bactéries à gram négatif et gram positif . L'effet inhibiteur de ces bactéries contre les souches pathogènes est en général dû à une compétition aux nutriments, mais la méthode de défense varie par fois : grâce au

contact des membranes soit dû à la complémentarité du récepteur, soit à partir des signaux, ou bien par la sécrétion des molécules à faible poids moléculaire tel que H_2O_2 , CO_2 et l'acide lactique ou les molécules à poids moléculaire élevé comme les bactériocines . De plus, ces souches lactiques n'influencent pas les souches à gram positif par le contact direct (**Morchid el Idrisi, 2017**) . Les bactériocines donnent un meilleur effet quand elles se trouvent unique dans le milieu et agissent mieux sur les bactéries à gram positif que les bactéries à gram négatif (**Mokena, 2017**) .

Dans la méthode des puits se sont les métabolites qui jouent le rôle d'inhibition: le surnageant natif comprend principalement l'acide lactique et les bactériocines ,son spectre d'activité est généralement faible par rapport au surnageant neutralisé (parmi ses composants : les bactériocines)(**Menad, 2017**) . Nous avons pensé qu'il y a une compétition entre les deux métabolites soit dans la sécrétion, ou dans l'expression génique, soit une des deux molécules joue comme une substance compétitive, ou bien, la bactériocine est inactivée à cause de son pH optimal qui varie entre 6,5 et 7 pour certaines espèces(**Ajao, O et al., 2021**) .

Conclusion



Conclusion et perspectives

Les bactéries lactiques sont des microorganismes qui ont un effet bénéfique sur la santé en inhibant le développement d'autres microorganismes indésirables ou pathogènes . Elles ont un rôle important dans l'amélioration de la digestion et le maintien de l'équilibre de la flore intestinale et de l'équilibre acido-basique au niveau du côlon . Elles sont très utilisées en industrie agroalimentaire grâce à leur rôle dans la fermentation et la conservation des aliments par production de plusieurs facteurs inhibiteurs .

L'objectif de cette étude est d'apporter une contribution à la caractérisation et la détermination du pouvoir antibactérien des bactéries lactiques . Nous avons testées trois souches des *Lactobacilles* locales d'origine laitier (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus casei*) à partir des cultures jeunes en phase exponentielle contre cinq bactéries pathogènes de référence : *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC10987, *Escherichia coli* ATCC11303, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Salmonella gallinarum* ATCC700623 . La détection de l'activité antimicrobienne est basée sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans des milieux de culture solides pour inhiber la croissance des microorganismes indicateurs sensibles .

En premier lieu, le test de coexistence a été réalisé pour connaître le type d'interaction existant entre les souches lactiques de la même collection par la méthode des stries . Les résultats ont montré que les souches ont été symbiotiques et n'ont présenté aucun effet d'antagonisme entre elles .

Après, nous avons utilisé la méthode des spots sur gélose MRS pour la détection de l'existence d'un effet inhibiteur des souches lactiques (LB 1, LB 2, LB 3) vis-à-vis les souches pathogènes . L'apparition des halos clair autour des spots a indiqué qu'il y a une activité antimicrobienne contre ces bactéries de référence, le meilleur diamètre d'inhibition est détecté avec *Escherichia coli* .

Nous avons par la suite réalisé deux tests : test des disques et des puits. Les résultats de la méthode des disques montrent que les trois souches de *Lactobacillus* ont une activité antimicrobienne contre les bactéries soit à gram positif ou à gram négatif . Les plus grandes zones d'inhibition ont été observées chez la souche LB 2, surtout pour *Escherichia coli*, alors

Conclusion et perspectives

que LB 1 ne présente aucune activité antibactérienne contre *Salmonella gallinarum*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* .

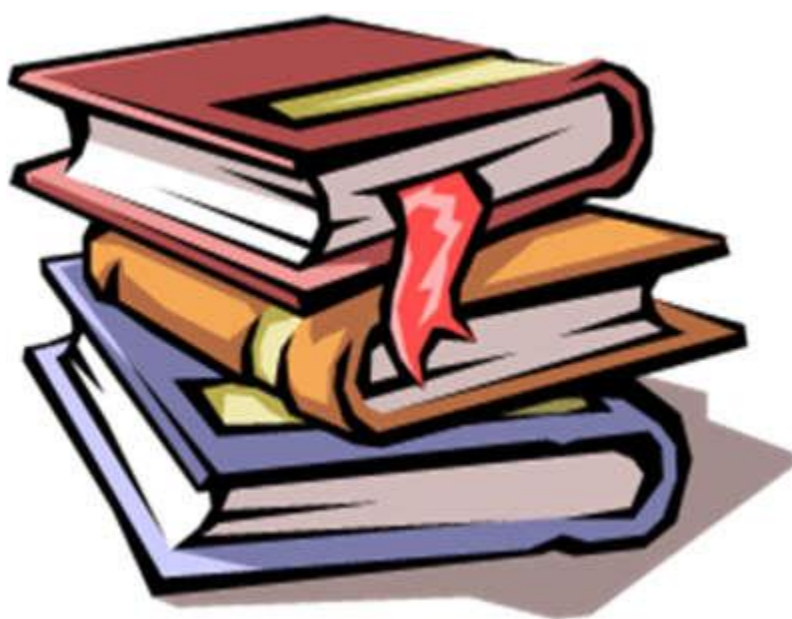
De plus, les résultats de l'effet des surnageants par la méthode des puits montrent que la majorité des isolats ont été actives vis-à-vis les bactéries à gram positif mais pas pour toutes les bactéries à gram négatif . Pour le surnageant natif, les résultats ont été positif pour toutes les souches à l'exception de *Salmonella gallinarum*. LB 2 et LB 3 donnent des meilleures activités pour *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* avec des diamètres d'inhibition de 20 et 21 mm successive . Le surnageant neutralisé (qui contient des bactériocines) a enregistré le meilleur résultat pour LB 2 contre *Bacillus cereus* . Alors que les trois *Lactobacillus* testées ne présentent aucune activité antibactérienne contre *Salmonella gallinarum* .

Les résultats fournis par cette étude sont notamment intéressants . Les souches indigènes ont montré une activité inhibitrice remarquable, ce qui permet de les utiliser dans l'avenir comme des ferments dans l'industrie alimentaire, ou comme agent de conservation ou probiotique.

Les perspectives pour continuer cette étude sont très larges, mais on peut suggérer dans l'avenir de :

- Rechercher la nature exacte des facteurs inhibiteurs (bactériocines, polysaccharides,... etc) ;
- Etudier l'activité antimicrobienne des souches des bactéries lactiques à l'égard des souches multi résistantes ;
- Etudier les propriétés probiotiques des souches isolées *in vivo* et *in vitro* ;
- Etudier les profils biotechnologiques comme l'activité protéolytique et antibactérienne en utilisant des techniques plus approfondies .

Références bibliographiques



« A »

- Ajao, O., Banwo, K., Ogunremi, O., et Sanni, A. (2021). Antimicrobial properties and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from raw beef in Ibadan, Nigeria. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 770-773.
- Al-Dhabi, N. A., Valan Arasu, M., Vijayaraghavan, P., Esmail, G. A., Duraipandiyan, V., Kim, Y. O., ... et Kim, H. J. (2020). Probiotic and antioxidant potential of *Lactobacillus reuteri* LR12 and *Lactobacillus lactis* LR10 isolated from pineapple puree and quality analysis of pineapple-flavored goat milk yoghurt during storage. *Microorganisms*, 8(10), 1461.
- Alegría, Á., Delgado, S., Rocas, C., López, B., et Mayo, B. (2010). Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International journal of food microbiology*, 143(1-2), 61-66.
- Al-Tawaha, R., et Meng, C. (2018). Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. *Advances in Environmental Biology*, 12, 16-27.
- Alvarez-Sieiro, P., Redruello, B., Del Rio, B., Martin, M. C., Fernandez, M., Ladero, V., et Alvarez, M. A. (2018). *Lactobacillus rossiae* strain isolated from sourdough produces putrescine from arginine. *Scientific reports*, 8(1), 1-10.
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., et Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food microbiology*, 33(2), 282-291.
- Armas, F., Camperio, C., et Marianelli, C. (2017). In vitro assessment of the probiotic potential of *Lactococcus lactis* LMG 7930 against ruminant mastitis-causing pathogens. *PLoS One*, 12(1), e0169543.
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Dans: Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A. (dirs.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (3rd Ed). Marcel Dekker, New York.

« B »

- Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., et Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations caprines locales "arabes et kabyles". *Sciences et Technologie. C, Biotechnologies*, 30-37.

Références bibliographiques

- Bali, V., Panesar, P. S., Bera, M. B., et Kennedy, J. F. (2016). Bacteriocins: recent trends and potential applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(5), 817-834.
- Barefoot, S. F., et Klaenhammer, T. R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental microbiology*, 45(6), 1808-1815.
- Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., et Falah, F. (2021). Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of *Lactobacillus* strains isolated from Iranian raw milk cheeses. *Food Science et Nutrition*.
- Bekhouche, F. (2006). *Bactéries lactiques du lait cru de vache et microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes* (Thèse de doctorat, université de Mentouri Constantine).
- Belarbi, F. (2011). *Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes* (Mémoire de Magister, Université d'Oran).
- Belhamra, Z. (2017). *Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires* (Thèse de doctorat, université de Ferhat Abbas Sétif 1).
- Bellil, Y. (2020). *Caractérisation et évaluation des aptitudes technologiques des Leuconostocs isolés du lait de chamelle Algérien et leurs applications* (Thèse de doctorat, Université Oran1).
- Belyagoubi, L. (2014). *Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens* (Thèse de doctorat, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen).
- Bemena, L. D., Mohamed, L. A., Fernandes, A. M., et Lee, B. H. (2014). Applications of bacteriocins in food, livestock health and medicine. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(12), 924-49.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., ... et Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome research*, 11(5), 731-753.
- Boumediene, K. (2013). *Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes* (Mémoire de Magister, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen).
- Bouzaid, M., Chatoui, R., Latrache, H., et Hasib, A. (2016). Activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées de viande hachée de dromadaire et du lait cru de vache (Maroc). *Microbiologie industrielle sanitaire et environnementale*, 10(1), 1-12.

Références bibliographiques

- Brahimi, S. (2015). *Isolement et caractérisation biotechnologiques des bactéries lactiques isolée à partir des margines d'olives « AMOREDJ » fermentés* (Thèse de Mgister, Université d'Oran).
- Butel, M. J. (2014). Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *Journal des Anti-infectieux*, 16(2), 33-43.

« C »

- Caridi, A., Micari, P., Caparra, P., Cufari, A., et Sarullo, V. (2003). Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal*, 13(2-3), 191-200.
- Chentouf, H. (2015). *Effet des substances antimicrobiennes produites par Leuconostoc mesenteroides isolées à partir du lait cru de chamelle d'algérie sur la croissance de Listeria monocytogenes dans les produits alimentaires* (Thèse de doctorat, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).
- Cherier, D. (2017). *Caractérisation biochimique et structurale de bactériocines ciblant le métabolisme du peptidoglycane bactérien, alternative potentielle aux antibiotiques* (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay).
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., et Dicks, L. M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current opinion in biotechnology*, 49, 23-28.
- Cholet, O. (2006). *Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire* (Thèse de doctorat, Institut national agronomique Paris-Grignon).
- Chun-lei, Z., Jia-qi, L., Hai-tao, G., Jie, W., et Ri-hua, X. (2014). Selection of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolates from Inner Mongolian traditional yoghurt. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 64(4), 254-260.
- Corrieu, G., et Luquet, F. M. (2008). Métabolisme et ingénierie métabolique. Dans Atlan, D., Béal, C., Champomier-Verges, M. C., Chapot-Chartier, M. P., Chouayekh, H., Coccagn-
- Bousquet, M., et Deghorain, M (dirs), *Bacteries Lactiques–De la genetique aux ferments* (1st Ed).Tec et doc.
- Corrieu, G., et Luquet, F. M. (2008). *Bactéries lactiques*. Tec et doc. *Chemical and pharmaceutical bulletin* ,44(12) ,2263-2267.

« D »

Références bibliographiques

- De Ambrosini, V. M., Gonzalez, S., Perdigon, G., Holgado, A. P. D. R., et Oliver, G. (1996). Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 44(12), 2263-2267.
- De Freire Bastos, M. D. C., Coelho, M. L. V., et Da Silva Santos, O. C. (2015). Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 161(4), 683-700.
- Debeyer, C. (2020). *Les probiotiques dans la prise en charge d'affections gastro-intestinales et vaginales* (Thèse de doctorat, Université de Lille).
- Delesa, D. A. (2017). Bacteriocin as an advanced technology in food industry. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(12), 178-190.
- Demir, E., et Başbülbul, G. (2017). Screening of bacteriocin production in lactic acid bacteria isolated from fermented dairy products. *Biotechnology Journal International*, 1-9.
- Dillenseger, H. (2019). *Les bactériocines: en alternative aux traitements antibiotiques* (Thèse de doctorat, Université de Bordeaux).
- Djadouni, F. (2013). *Evolution de l'activité antimicrobienne des isolats des bactéries lactiques et détermination des spectres d'action de leurs biopeptides vis-à-vis des germes d'altération*. (Thèse de doctorat, Université d'Oran).
- Djelloul, D. S. (2021). *Isolement et identification des bactéries antagonistes vis-à-vis des souches pathogènes multirésistantes* (Thèse de doctorat, Université de Djilali liabes de Sidi bel Abbes).
- 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.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., et Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(2), 564-582.
- Drouault, S., et Corthier, G. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research*, 32(2), 101-117.

« E »

- Egan, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., et Cotter, P. D. (2016). Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems?. *Frontiers in microbiology*, 7, 461

« F »

Références bibliographiques

- Furet, J. P., Quénée, P., et Tailliez, P. (2004). Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International journal of food microbiology*, 97(2), 197-207.

« G »

- Gálvez, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., et Lucas, R. (2011). Food Applications and Regulation. Dans Drider, D., et Rebuffat, S. (dirs.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications* (1st Ed). Springer Verlag. Jaen, Spain.
- Gálvez, A., López, R. L., Pulido, R. P., et Burgos, M. J. G. (2014). Natural antimicrobials for food biopreservation. In *Food biopreservation*. Springer, New York.
- Garcia-Gutierrez, E., O'Connor, P. M., Colquhoun, I. J., Vior, N. M., Rodríguez, J. M., Mayer, M. J., ... et Narbad, A. (2020). Production of multiple bacteriocins, including the novel bacteriocin gassericin M, by *Lactobacillus gasseri* LM19, a strain isolated from human milk. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(9), 3869.
- Gilarova, R., Voldřich, M., Demnerova, K., Čerovský, M., et Dobiáš, J. (1994). Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 24(1-2), 315-319.
- Gómez, N. C., Ramiro, J. M., Quecan, B. X., et de Melo Franco, B. D. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in microbiology*, 7, 863.
- González-Pérez, C. J., Aispuro-Hernández, E., Vargas-Arispuro, I., et Martínez-Téllez, M. A. (2018). Induction of bacteriocins from lactic acid bacteria; a strategy to improve the safety of fresh fruits and vegetables. *Agricultural Research Technology Open Access Journal*, 14(4).
- Guerin, H. (2019). *Biosynthèse et rôle des polysaccharides de surface de Lactococcus lactis, composants essentiels de la paroi et récepteurs de bactériophage* (Thèse de doctorat, université Paris-Saclay).
- Guiraud, J. P., et Rosec, J. P. (2004). *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. Afnor.
- Guo, X. H., Kim, J. M., Nam, H. M., Park, S. Y., et Kim, J. M. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, 16(4), 321-326.

« H »

Références bibliographiques

- Hadeif, S. (2012). *Évaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales* (Mémoire de magister, Université de Kasdi merbah-ouargla).
- Hammes W P., et Vogel R F. (2012). The genus *Lactobacillus*. Dans Holzapfel, W. H .N., et Wood B J. (dirs.), *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Springer Science et Business Media.
- Hammi, I. (2016). *Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains et de différentes variétés de fromages français* (Thèse de doctorat, Université de Strasbourg).
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., et Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Frontiers in microbiology*, 9, 1791.
- Hansal, N. (2015). *Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de Leuconostoc mesenteroides isolé à partir du lait cru de chèvre et de et de chamelle* (Mémoire de Magister, Université d' Oran).
- Heita, L. (2014). *Antimicrobial activity profile of traditional fermented milk starter cultures from North-Eastern Namibia* (Thèse de doctorat, Université de Namibia).
- Hor, Y. Y., et Liong, M. T. (2014). Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. *Dermatologic Sinica*, 32(3), 141-147.

« I »

- Ibrahim, O. O. (2019). Classification of antimicrobial peptides bacteriocins, and the nature of some bacteriocins with potential applications in food safety and bio-pharmaceuticals. *EC Microbiology*, 15, 591-608.
- Ismaili, M. A., Guilal, J., Hamama, A., Saidi, B., et Zahar, M. (2016). Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *International Journal of Molecular Sciences*, 1, 81-94.
- Izquierdo Alegre, E. (2009). *Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique* (Thèse de doctorat, université Strasbourg).
- Izuchukwu, N. (2017). Comparative Application of Different Strategies of Bacteriocins Produced by *Carnobacterium maltaromaticum* MMF-32 for Inhibition of *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 in Cold-Smoked Haddock. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, 38(2), 311-340.

« J »

Références bibliographiques

- Jagadeesh, K. S. (2015). Lactic acid bacteria as a source of functional ingredients. *South Indian Journal of Biological Sciences*, 1(2), 70-71.

« K »

- Khodja, B. (2018). *Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bactéries lactiques productrice de bactériocine* (Thèse de doctorat, Université de Djillali liabes de Sidi bel Abbes).
- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), 337-349.
- König, H., Unden, G., et Fröhlich, J. (2009). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Heidelberg: Springer.
- Kowalczyk, M., Mayo, B., Fernández, M., et Aleksandrak P.T. (2015). Updates on Metabolism in Lactic Acid Bacteria in Light of Omic Technologies. Dans Mozzi F., Raya R.R., et Vignolo G.M. (dirs.), *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications* (2ndEd).Wiley-Blackwell.

« L »

- Lairini, S., Beqqali, N., Bouslamti, R., Belkhou, R., et Zerrouq, F. (2014). Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 10(4), 267-277.
- Langa, S., Martín-Cabrejas, I., Montiel, R., Landete, J. M., Medina, M., et Arqués, J. L. (2014). Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens. *Journal of dairy science*, 97(10), 6116-6121.
- Léonard, L. (2013). *Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique* (Thèse de doctorat, Université de Bourgogne).
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., et Cai, Y. (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. Dans Zhang,H., et Cai, Y.(dirs.), *Lactic acid bacteria* (1stEd). Springer, Dordrecht.

« M »

- Maghnia, D. (2011). *Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentés traditionnels algériens* (Thèse de doctorat, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).

Références bibliographiques

- Mahi, M. (2010). *Etude Technologique des Bactéries Lactiques Isolées à Partir du Lait de Brebis* (Thèse de doctorat, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).
- Makhloufi, K. M. (2011). *Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique Leuconostoc pseudomesenteroides isolée du boza* (Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).
- Mami, A. (2012). *Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines a large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie* (Thèse de doctorat, Université d'Oran).
- Mami, A., Hamedi, A. R., Henni, J., KERFOUF, A., et Kihal, M. (2010). Activité Anti-Bactérienne 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.
- Matamoros, S. (2008). *Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid* (Thèse de doctorat, Université de Nantes).
- Mayo, B., Aleksandrak- Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez - Martín, P., et Bardowski, J. (2010). Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. Dans Mozzì F., Raya, R.R., et Vignolo, G.M. (dirs.). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* (1st Ed). Blackwell Publishing, USA.
- McLeod, A., Nyquist, O. L., Snipen, L., Naterstad, K., et Axelsson, L. (2008). Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Systematic and applied microbiology*, 31(5), 393-403.
- Mekri, M. (2016). *Effet de synergie des bactériocines issues des bactéries lactiques et pseudo lactiques et des huiles essentielles d'Inula viscosa contre les germes pathogènes* (Thèse de doctorat, Université de Djilali liabes de Sidi bel Abbes).
- Menad, N. (2018). *Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de Salmonella sp* (Thèse de doctorat, Université de Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem).
- Mercha, I., Lakram, N., Kabbour, M. R., Bouksaim, M., et Zkhiri, F. (2020). Probiotic and technological features of Enterococcus and Weissella isolates from camel milk characterised by an Argane feeding regimen. *Archives of Microbiology*, 202(8), 2207-2219.
- Mokena, A.M. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, 22(8), 1255.

Références bibliographiques

- Monnet, V., Latrille, E., Béal, C., et Corrieu, G. (2008). Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. Dans Corrieu G., et Luquet F.M. (dirs.), *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* Tec et Doc, Lavoisier. Paris.
- Morchide el Idrisi, H. (2017). *Utilité des bactéries lactiques* (Thèse de Doctora, université mohammed v de rabat).
- Mozzi, F., et Vignolo, G. M. (2010). *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications* (1st Ed). John Wiley et Sons.

« N »

- Nair, M. S., Amalaradjou, M. A., et Venkitanarayanan, K. (2017). Antivirulence properties of probiotics in combating microbial pathogenesis. *Advances in applied microbiology*, 98, 1-29.
- Nes, I. F., Kjos, M., et Diep, D. B. (2011). Antimicrobial components of lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (4th Ed). Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, FL, 66(1), 285-329.

« P »

- Park, S. N., Lim, Y. K., Shin, J. H., Chang, Y. H., Shin, Y., Paek, J., ... et Kook, J. K. (2019). *Streptococcus gwangjuense* sp. nov., isolated from human pericoronitis. *Current microbiology*, 76(7), 799-803.
- Patel, S., et Gupta, R. S. (2018). Robust demarcation of fourteen different species groups within the genus *Streptococcus* based on genome-based phylogenies and molecular signatures. *Infection, Genetics and Evolution*, 66, 130-151.
- Preedy, V. R. (2010). *Bioactive foods in promoting health: Probiotics and prebiotics* (1st Ed). Academic Press.
- Privat, K., et Thonart, P. (2011). Action des cultures protectrices: cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(2), 339-348.

« R »

- Ravindran, L., Manjunath, N., Darshan, R. P., et Manuel, S. G. (2016). In vitro study analysis of antimicrobial properties of lactic acid bacteria against pathogens. *Journal of Biotechnology Innovation*, 5(2), 262-269.

Références bibliographiques

- Reddy, G., Altaf, M. D., Naveena, B. J., Venkateshwar, M., et Kumar, E. V. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation—a review. *Biotechnology advances*, 26(1), 22-34.
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., et Penna, A. L. B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124-140.
- Ren, D., Zhu, J., Gong, S., Liu, H., et Yu, H. (2018). Antimicrobial characteristics of lactic acid bacteria isolated from homemade fermented foods. *Bio Med research international*, 2018.
- Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, A. R. U., et Jahid, I. K. (2020). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *Journal of dairy science*, 103(2), 1223-123.
- Rodriguez, E., Arques, J. L., Nunez, M., Gaya, P., et Medina, M. (2005). Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in raw-milk cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3399-3404.

« S »

- Shehata, M. G., El Sohaimey, S. A., El-Sahn, M. A., et Youssef, M. M. (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 65-75.
- Sherid, M., Samo, S., Sulaiman, S., Husein, H., Sifuentes, H., et Sridhar, S. (2016). Liver abscess and bacteremia caused by *lactobacillus*: role of probiotics? Case report and review of the literature. *BMC gastroenterology*, 16(1), 1-6.
- Sidhu, P. K., et Nehra, K. (2019). Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing antimicrobial activity of bacteriocins. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 758-767.
- Siegumfeldt, H., Bjorn Rechinger, K., et Jakobsen, M. (2000). Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2330-2335.
- Simons, A., Alhanout, K., et Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*, 8(5), 639.

Références bibliographiques

- Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation-a review. *Open veterinary journal*, 8(1), 104-111.
- Stiles, M. E., et Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36(1), 1-29.

« T »

- Taale, E., Savadogo, A., Zongo, C., Tapsoba, F., Karou, S. D., et Traore, A. S. (2016). Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne: cas des bactériocines. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(1), 384-399.
- Tahlaiti, H. (2019). *Étude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté* (Thèse de doctorat, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).
- Tenea, G. N., et Yépez, L. (2016). Bioactive compounds of lactic acid bacteria. Case study: Evaluation of antimicrobial activity of bacteriocin-producing *lactobacillus* isolated from native ecological niches of Ecuador. *Probiotics and prebiotics in Human Nutrition and Health*, 149-167.
- Teuber, M. (2015). *Lactococcus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-21.

« V »

- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., et Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 60(2), 407-438.

« W »

- Wallace, T. D., Bradley, S., Buckley, N. D., et Green-Johnson, J. M. (2003). Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. *Journal of Food Protection*, 66(3), 466-472.
- Wee, Y. J., Yun, J. S., Kim, D., et Ryu, H. W. (2006). Batch and repeated batch production of L (+)-lactic acid by *Enterococcus faecalis* RKY1 using wood hydrolyzate and corn steep liquor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(6), 431.

Références bibliographiques

- Wels, M., Siezen, R., Van Hijum, S., Kelly, W. J., et Bachmann, H. (2019). Comparative genome analysis of *Lactococcus lactis* indicates niche adaptation and resolves genotype/phenotype disparity. *Frontiers in microbiology*, 10, 4.

« Y »

- Yan, T., et Goldman, R. D. (2020). Les probiotiques pour la diarrhée liée aux antibiotiques chez l'enfant. *Canadian Family Physician*, 66(1), e9-e11.
- Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., et Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology*, 5, 241.
- Yerlikaya, O., Saygili, D., et Akpınar, A. (2021). Evaluation of antimicrobial activity and antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from commercial yoghurt starter cultures. *Food Science and Technology*, 41, 418-425.
- Yu, J., Song, Y., Ren, Y., Qing, Y., Liu, W., et Sun, Z. (2017). Genome-level comparisons provide insight into the phylogeny and metabolic diversity of species within the genus *Lactococcus*. *BMC microbiology*, 17(1), 1-10.

« Z »

- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H., Mattarelli, P., ... et Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4):2782-2858.
- Zhitnitsky, D., Rose, J., et Lewinson, O. (2017). The highly synergistic, broad spectrum, antibacterial activity of organic acids and transition metals. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de culture (pour 1 litre d'eau distillée)

Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe)

- ❖ Peptone10g
- ❖ Extrait de viande10g
- ❖ Extrait de levure5g
- ❖ Glucose20g
- ❖ Tween 801mL
- ❖ Phosphate dipotassique2g
- ❖ Acétate de sodium5g
- ❖ Citrate de sodium2g
- ❖ Sulfate de magnésium0,2g
- ❖ Sulfate de manganèse0,05g
- ❖ Agar (gélose)15g
- ❖ Eau distillée1000 mL
- ❖ pH 6,5.

Autoclaver à 121 °C/10mn

Milieu nutritif

- ❖ Extrait de viande1g
- ❖ Peptone15g
- ❖ Chlorure de sodium5g
- ❖ Agar (gélose)15g
- ❖ pH=7,2

Autoclaver à 121 °C/10mn

Milieu Mueller-Hinton

- ❖ Infusion de viande de bœuf300ml
- ❖ Peptone de caséine17,5g
- ❖ Amidon de maïs1,5g
- ❖ Agar10,0g
- ❖ pH= 7,4

Milieu Hektoen

- ❖ Protease-peptone12,0g

Annexes

- ❖ Extrait de levure3,0g
- ❖ Lactose12,0g
- ❖ Saccharose12, 0g
- ❖ Salicine2, 0g
- ❖ Citrate de fer III et d'ammonium1,5g
- ❖ Sels biliaires9,0g
- ❖ Fuschine acide0,1g
- ❖ Bleu de bromothymole0,065g
- ❖ Chlorure de sodium5,0g
- ❖ Thiosulfate de sodium5,0g
- ❖ Agar13,0g

- ❖ pH = 7,5

Milieu de Chapman

- ❖ Extrait de viande (bovin ou porcin)..... 1g
- ❖ Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin) ..10g
- ❖ Chlorure de sodium75g
- ❖ Mannitol10g
- ❖ Agar.....15g
- ❖ Rouge de phénol.....0,025g

- ❖ pH=7,6

Milieu King A

- ❖ peptone dite "A"20,0 g
- ❖ glycérol10,0 g
- ❖ sulfate de potassium10,0 g
- ❖ chlorure de magnésium1, 4 g
- ❖ agar purifié12,0 g

- ❖ pH = 7,2

Annexe II : Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- ❖ Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- ❖ Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- ❖ Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;

Annexes

- ❖ Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;
- ❖ Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes;
- ❖ Laver à l'eau ;
- ❖ Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion
- ❖ (x100).
- ❖ Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.