



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de L'enseignement Supérieur et de la  
Recherche Scientifique.



Université Echahid Cheikh Larbi Tébessi-Tébessa

Faculté des Sciences Exactes et des sciences de la Nature et de la Vie.

Département de : Biologie Appliquée.

Domaine : Sciences de la nature et de la vie.

Filière : Sciences Biologiques.

Option : Microbiologie appliquée.

Mémoire présenter en vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER**

**Thème**

**Effets antimicrobiens des bactériocines semi purifiées  
issues de bactéries lactiques sur les bactéries pathogènes  
et/ou d'altération**

**Présenté par :**

Melle ABROUGUI Khouloud, Melle AOUADI Naima et Melle SIAD Yousra.

**Devant le jury composé de :**

Président	Mme. FERHI Selma	M.C.A.	Univ.E.C.L.T (Tébessa).
Examineur	Mme. SMAALI Saoussen	M.C.A.	Univ.E.C.L.T (Tébessa).
Promoteur	Mr. MECHAI Abdelbasset	Professeur	Univ.E.C.L.T(Tébessa).
Co-promoteur	Mme. MECHAI-DEBABZA Manel	M.C.A.	Univ.E.C.L.T(Tébessa).

Date de soutenance : 04 juin 2023

Note : **16/20**      Mention : **Très bien**

Année universitaire 2022/2023

# Dédicace

*A mes chères parents SIAD Reda et SIAD Mounira, que Dieu les garde, pour leur soutien durant mes années d'étude et ses encouragements, avec mes meilleures vœux de santé et de bonheur.*

*Je suis très fière de vous.*

*Je l'ai fait pour ce regard fier dans tes yeux,*

*A mon chère frère Abdelmadjed et ma petite sœur Bouchra.*

*A mes chères amies, mes belles binômes naima et khouloud, je leur souhaite la réussite et le bonheur dans leur vie.*

*A mes chères : Narimen, Yasmine, malak, marwa, Sabrina*

*A ma famille qui m'a soutenu et encouragé*

*Avec toute ma tendresse à tous mes amies sans exception.*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit réalisé je vous dis merci.*

كان وعدا مني و بكم تحقق. فشكرا

*Yousra*



# Dédicace

*Je dédie ce travail à l'âme de mon père Toufik, que Dieu ait pitié de son âme lui, et L'UI DIR, que ta volonté a été accomplie, père, et me voilà diplômé.*

*A ma chère mère Louahma, grâce à toi, j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je tiens à vous remercier pour votre amour, votre générosité et votre sacrifice pour moi. Ce travail est le résultat de tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation. Je t'aime maman et que Dieu te donne une bonne santé et une vie longue et heureuse.*

*A mon oncle AbdElHamid qui m'a accompagné pendant cinq ans tout au long de mon parcours académique.*

*A mes chers frères Yacoub et Yahya, ma chère soeur Suhaila, merci pour tes encouragements et ton soutien.*

*A mon mari, M. Bouqabrine Abdel Raouf; Être à mes côtés pour réaliser mon ambition scientifique.*

*A tous les membres de la famille, parmi eux: Ma tante Fatiha, ma grand-mère, j'espère que Dieu vous donnera la santé et prolongera votre vie.*

*A mes collègues et amis Yousra et Khouloud.*

*A ceux qui m'ont encouragé et soutenu.*

*Je vous aime tous*

*Naima*



# *Dédicace*

*Tout d'abord, je tiens à remercier DIEU*

*De m'avoir donné la force et le courage de mener*

*À bien ce modeste travail.*

*Je tiens à dédier cet humble travail à :*

*À ma tendre mère KHADIDJA et mon très cher père FAWZI*

*À mes frères : ADEM et AHMED MOUSTAFA*

*À mon binôme : YOUSRA et NAIMA*

*À mes meilleurs amis et mes belles cousines:*

*SARA; MERJEM; SIHEM; BELKIS; MARWA; HADJER;*

*RIM; KARIMA ; SALSABILE ; RAHMA ; IMEN ;*

*KHADIDJA ; AMINA*

*Tous ceux qui m'aiment et que j'aime*

*Khouloud*

# Remerciement.

*Avant tout, nous voudrions remercier « Allah » pour ses nombreuses cadeaux, et pour nous a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.*

*Nous adressons nos plus grands et premiers remerciements au Pr. **MECHAI ABDELBASSET**, pour son accord pour nous encadrer dans la réalisation de ce mémoire, pour son aide, pour nous orienter et pour sa patience avec nous, alors merci, monsieur, pour tous ces efforts et toute cette coopération que vous avez faite pour nous. Vous avez vraiment mérité nos remerciements les plus chaleureux,*

*Nous sommes particulièrement reconnaissantes à **FERHI Selma** maitre de conférences A à l'Université de Tébessa, d'avoir accepté de juger notre travail en tant que présidente ainsi que **SMAALI Saoussen** maitre de conférences A à l'Université de Tébessa, de bien vouloir évaluer et examiner ce mémoire.*

*Nous tenons également à remercier, dans les plus beaux termes, **Dr. MECHAI-DEBABZA MANEL**, pour son aide, ainsi que sa motivation, et aussi pour sa gentillesse avec nous. Merci beaucoup d'être l'une des plus belles choses qui se sont passées dans notre carrière universitaire.*

*Nous voudrions également remercier la belle et gentille femme qui était comme une sœur, qui a travaillé dur, aidé et guidé, et grâce à qui ce mémoire a été travaillé, à **BOUTALEB Naima** Merci beaucoup et nous souhaitons vous une vie pleine de succès et de bonheur. Bonne chance.*

*A vous tous, un grand merci*

# Résumé

Les bactéries lactiques ont toujours occupé une place importante parmi les auxiliaires de la technologie alimentaire, elles appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, qui se trouvent partout dans la nature ainsi que dans le système digestif de l'homme et jouent un rôle important dans la fermentation et la conservation des aliments, que ce soit en tant que microflore naturelle ou comme cultures ajoutées sous des conditions contrôlées.

L'objectif principal de ce projet de fin d'études est d'étudier et de tester la capacité des bactéries lactiques à inhiber les bactéries pathogènes et/ou d'altérations.

Au cours des travaux pratiques, nous avons d'abord procédé à la revivification de nos bactéries conservées, à savoir les sept souches lactiques et les souches testées (quatre pour les Gram négatifs et quatre pour les Gram positifs), puis nous avons examiné leur pureté par des repiquages successifs sur milieux gélosés appropriés, fin de les préparer pour les tests spécifiques au travail et lesquels est deux direct méthode des spots et test indirect méthode des puits.

Nos résultats ont montré que les bactéries lactiques se sont avérées avoir un large éventail de capacités contre les bactéries Gram-positives (*Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 ) et les champignons (*Aspergillus fumigatus* LB22), ainsi que les bactéries Gram-négatives (*Klebsiella pneumoniae* ssp *ozaneae* S19.E21 , *Escherichia coli* I S8.E14, *Raoultella terrigena* S15.E23, *Serratia odorefira* S43.E9.AS). Les résultats obtenus ont permis de constater qu'*Enterococcus durans* KMQ31 fait partie des souches les plus actives sur les souches testées, tandis que *Micrococcus luteus* ATCC 4698 montre très sensible envers les substances antimicrobiennes exercées par les souches lactiques, avec la production de zones d'inhibition estimées à 32 mm.

En conclusion, et sur la base de nos résultats, il a été confirmé que les bactéries lactiques sont reconnues comme étant saines, de statut "GRAS" (Generally Recognized As Safe) et capable jouent un rôle important dans la fermentation et la conservation des aliments.

**Mots clés :** bactéries lactiques, bactéries pathogènes, souches testées, capacités antagonistes, substances antimicrobiennes.

# Abstract

Lactic acid bacteria have always occupied an important place among the aids in food technology; they belong to group of beneficial bacteria, which are found everywhere in nature as well as in the human digestive system and play an important role in the fermentation and preservation of foods, either as natural microflora or as added cultures under controlled conditions.

The main objective of this graduation project is to study and test the ability of lactic acid bacteria to inhibit pathogenic and/or spoilage bacteria.

During the practical work, we first carried out the resuscitation of our preserved bacteria, namely the seven lactic strains and the strains tested (four for Gram negative and four for Gram positive), then we examined their purity. by successive subcultures on appropriate agar media, in order to prepare them for the specific tests at work and which are two, direct method of spots and indirect test method of wells.

Our results showed that lactic acid bacteria were found to have a wide range of abilities against Gram-positive bacteria (*Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778) and fungi (*Aspergillus fumigatus* LB22), also Gram-negative bacteria (*Klebsiella pneumoniae* ssp *ozaneae* S19.E21, *Escherichia coli* I S8.E14, *Raoultella terrigena* S15.E23, *Serratia odorefira* S43.E9.AS). The results obtained showed that *Enterococcus durans* KMQ31 is part of the most active strains on the strains tested, while *Micrococcus luteus* ATCC 4698 shows very sensitive towards the antimicrobial substances exerted by the lactic strains, with the production of zones of inhibition estimated at 32 mm.

In conclusion, and based on our results, it has been confirmed that lactic acid bacteria are recognized as healthy, of "GRAS" status (Generally Recognized As Safe) and able to play an important role in the fermentation and preservation of food.

**Keywords:** lactic acid bacteria, pathogenic bacteria, strains tested, antagonistic capacities, antimicrobial substances.

# ملخص

لطالما احتلت بكتيريا حمض اللاكتيك مكاناً مهماً بين الوسائل المساعدة في تكنولوجيا الغذاء ، فهي تنتمي إلى مجموعة من البكتيريا المفيدة ، والتي توجد في كل مكان في الطبيعة وكذلك في الجهاز الهضمي البشري وتلعب دوراً مهماً في تخمير وحفظ المواد الغذائية، إما على شكل نباتات طبيعية أو ثقافات مضافة تحت ظروف خاضعة للرقابة.

الهدف الرئيسي لمشروع التخرج هذا هو دراسة واختبار قدرة بكتيريا حمض اللاكتيك على تثبيط البكتيريا المسببة للأمراض و / أو التلف.

أثناء العمل العملي ، قمنا أولاً بإنعاش البكتيريا المحفوظة لدينا ، وهي السلالات اللبنية السبعة والسلالات المختبرة (أربع سلالات سالبة الجرام وأربع سلالات موجبة الجرام) ، ثم فحصنا نقاوتها بواسطة ثقافات فرعية متتالية على وسائط أجار مناسبة من أجل إعدادهم لاختبارات محددة في العمل وهما طريقة البقع المباشرة وطريقة الاختبار غير المباشرة للآبار.

أظهرت نتائجنا أن بكتيريا حمض اللاكتيك لديها مجموعة واسعة من القدرات ضد البكتيريا موجبة الجرام ( *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ، *Micrococcus luteus* ATCC 4698 )

والبطريات (*Bacillus cereus* ATCC 11778) والفطريات (*Aspergillus fumigatus* LB22) ، وكذلك البكتيريا السالبة الجرام (*Escherichia coli* I S8.E14 ، *Klebsiella pneumoniae* ssp *ozanae* S19.E21) ، *Serratia odorefira* S43.E9.AS ، *Raoultella terrigena* S15.E23). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن *Enterococcus durans* KMQ31 هو من أكثر السلالات نشاطاً في اختبار السلالات ، بينما أظهرت *Micrococcus luteus* ATCC 4698 أنها حساسة جداً تجاه المواد المضادة للميكروبات التي تنتجها سلالات اللاكتيك ، مع إنتاج مناطق تثبيط تقدر بـ 32 مم.

في الختام ، وبناءً على نتائجنا ، فقد تم التأكيد على أن بكتيريا حمض اللاكتيك معترف بها على أنها صحية ، من حالة "GRAS" (معترف بها عمومًا على أنها آمنة) وقادرة على لعب دور مهم في تخمير الطعام وحفظه.

**الكلمات المفتاحية:** بكتيريا حمض اللاكتيك ، البكتيريا المسببة للأمراض ، السلالات المختبرة ، القدرات المضادة ، المواد المضادة للميكروبات.



## *Liste des tableaux :*

<b>Numéro de tableau</b>	<b>Titre de tableau</b>	<b>page</b>
<b>Tableau 01</b>	Les souches indicatrices de Gram positif et leur ATCC.	<b>17</b>
<b>Tableau 02</b>	Les souches indicatrices de Gram négatif et leur origine.	<b>17</b>
<b>Tableau 03</b>	L'antibiogramme des souches indicatrices de Gram négatif.	<b>18</b>
<b>Tableau 04</b>	Les souches inhibitrices et leur origine.	<b>19</b>
<b>Tableau 05</b>	Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des surnageant des bactéries lactiques contre les souches indicatrices.	<b>22</b>
<b>Tableau 06</b>	Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des bactéries lactiques contre les souches indicatrices de Gram (+).	<b>26</b>
<b>Tableau 07</b>	Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des bactéries lactiques contre les souches indicatrices de Gram (-).	<b>26</b>

## *Liste des figures :*

<b>Numéro de figure</b>	<b>Titre de figure</b>	<b>page</b>
<b>Figure 01</b>	Mise en évidence de l'interaction entre les surnageant des souches lactiques envers la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	<b>21</b>
<b>Figure 02</b>	Mise en évidence de l'interaction entre les surnageant des souches lactiques envers la souche <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778.	<b>21</b>
<b>Figure 03</b>	Mise en évidence du pouvoir antagoniste des souches lactiques envers la souche <i>Aspergillus fumigatus</i> LB22.	<b>24</b>
<b>Figure 04</b>	Mise en évidence du pouvoir antagoniste des souches lactiques envers la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	<b>24</b>
<b>Figure 05</b>	Mise en évidence du pouvoir antagoniste des souches lactiques envers la souche <i>Raoultella terrigena</i> S15.E23.	<b>25</b>
<b>Figure 06</b>	Mise en évidence du pouvoir antagoniste des souches lactiques envers la souche <i>Serratia odorefira</i> S43.E9.AS.	<b>25</b>
<b>Figure 07</b>	Interactions antibactériens des souches lactiques et <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778.	<b>29</b>
<b>Figure 08</b>	Interactions antibactériens des souches lactiques et <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698.	<b>30</b>
<b>Figure 09</b>	Interaction antibactériens des souches lactiques et <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>ozanea</i> S19.E21e.	<b>30</b>
<b>Figure 10</b>	Interaction antibactériens des souches lactiques et <i>Escherichia coli</i> I S8.E14.	<b>31</b>
<b>Figure 11</b>	Préparation de milieu MRS gélosé.	<b>43</b>
<b>Figure 12</b>	Préparation de milieu GN.	<b>44</b>
<b>Figure 13</b>	Préparation de milieu MH.	<b>44</b>

## *Liste des abréviations :*

- + **GRAS:** Generally Recognized As Safe.
- + **BL :** Bactérie lactique.
- + **Ssp :** Sous espèce.
- + **MRS:** Man, Rogosaet Sharpe.
- + **GN:** Gélose nutritive.
- + **BN:** Bouillon nutritive.
- + **MH:** Miller Hinton.
- + **E.coli I:** Escherichia coli I.
- + **Lb :** Lactobacillus.
- + **LPS :** Lipopolysaccharide.
- + **MDR:** Multidrug-Resistant.
- + **ERV :** Entérocoques résistants a la vancomycines.

## Table des matières

<i>Dédicace</i> .....	I
<i>Dédicace</i> .....	II
<i>Dédicace</i> .....	II
<i>Remerciement</i> : .....	IV
<i>Résumé</i> .....	V
<i>Abstract</i> .....	VI
<i>ملخص</i> .....	VII
<i>Liste des tableaux</i> : .....	VIII
<i>Liste des figures</i> : .....	IX
<i>Liste des abréviations</i> : .....	X
Introduction.....	1
Synthèse bibliographique.....	2
Etude expérimentale.....	15
i. Matériel et méthode.....	16
Lieu de l'étude : .....	16
Objectives d'étude : .....	16
1. Matériel : .....	16
1.1. Appareillage : .....	16
1.2. Verreries et petit matériel: .....	16
1.3. Milieux de culture et les produits chimiques:.....	17
1.4. Matériel biologique : .....	17
2. Méthodes et protocoles utilisées : .....	19
2.1. Etude des interactions bactériennes :.....	19
<b>2.1.1. Méthode indirecte : test de puits</b> : .....	19
<b>2.1.2. Méthode directe (Spot agar test):</b> .....	20
ii. Résultats et discussions : .....	20
1. Résultats : .....	20
2. Discussions : .....	31
Conclusion.....	37
Bibliographie .....	39
Annexe.....	43



## Introduction:

Malgré la disponibilité de plusieurs techniques de conservation fiables et adéquates (e.g. réfrigération, congélation, stérilisation, séchage, préservation, etc), la contamination et la détérioration des produits alimentaires par les micro-organismes n'est pas encore sous contrôle. Par ailleurs, les consommateurs refusent de plus en plus les aliments préparés avec des agents conservateurs d'origine chimique. Ainsi, les industries agroalimentaires se tournent de plus en plus vers des techniques de préservation plus douces qui peuvent conduire à l'obtention d'aliments sécurisés mais présentant un aspect plus naturel et une qualité nutritive affectée au minimum c'est en utilisant des matériaux biologiques dans le processus de conservation, et c'est ce qu'on appelle la bioconservation (**BOUMEDIENE, 2012**).

Ces techniques sont notamment basées sur l'activité antimicrobienne naturelle associée à des souches bactériennes agissant comme des cultures protectrices. C'est le cas des bactériocines des bactéries lactiques qui montrent une activité contre les bactéries pathogènes ou bien qui cause les altérations au niveau des produits alimentaires (**BOUMEDIENE, 2012**).

# Synthèse

# bibliographique

Les bactéries lactiques ont toujours occupé une place importante parmi les auxiliaires de la technologie alimentaire, elles ont été reconnues depuis trois milliards d'années. La recherche des bactéries lactiques a commencé en 1873 lorsque L. Pasteur a étudié la fermentation lactique (**BOUABIBSA & DARANI, 2021**).

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, qui se trouvent partout dans la nature ainsi que dans le système digestif de l'homme (**DORTU & THONART, 2009**) et jouent un rôle important dans la fermentation et la conservation des aliments, que ce soit en tant que microflore naturelle ou comme cultures ajoutées sous des conditions contrôlées. Elles sont largement employées dans la préparation de nombreux aliments fermentés (yaourts, laits fermentés, fromages, etc.). En plus de leur rôle technologique, la contribution la plus importante de l'ajout de ces souches au produit est l'amélioration de sa qualité (saveur, texture) et son innocuité par l'intermédiaire de l'allongement de sa durée de vie et de l'inhibition de la flore compétitive d'altération et des bactéries pathogènes et ces derniers sont généralement reconnues comme étant saines, de statut "GRAS" (Generally Recognized As Safe) (**MECHAI, 2009**).

Les bactéries lactiques ont été trouvées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère, ce qui peut expliquer leur caractère anaérobie. Des études antérieures sur l'évolution bactérienne suggèrent qu'elles sont apparues avant l'émergence des cyanobactéries. D'autres études ont montré que certaines bactéries lactiques, telles que *Lb. lactis*, est en train d'obtenir une chaîne respiratoire (**MEKRI, 2016**), et cette bactérie a été isolée dans de nombreux milieux naturels végétaux, animaux et humains ; Certaines espèces semblent être adaptées à un environnement spécifique et ne semblent se trouver nulle part ailleurs que dans leur habitat naturel. Grâce à sa souplesse d'adaptation physiologique, elles peuvent coloniser des environnements très différents d'un point de vue physique, chimique et biologique (**ZOUARI & BENARFA, 2018**).

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, immobiles, asporulées, catalase et oxydase négative, nitrate réductase négative, anaérobies ou aérotolescentes, se présentant sous formes de coques ou de bacilles qui ont moins de 55 mol % du contenu G+ C dans leur ADN (à l'exception de *Bifidobacterium*). En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole, ni d'hydrogène sulfureux (**CAPLICE & FITZGERALD, 1999**).

Toutes les BL ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui en utilisant les glucides, elles peuvent produire soit de l'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes), soit de l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives), soit de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> (bactéries hétérolactiques strictes) (**VANDAMME & All, 1966**).

Les bactéries lactiques sont généralement mésophiles ; certaines sont psychrotoléscentes ou thermotoléscentes elles se développent majoritairement à pH 4,0-4,5 et certaines sont encore actives à pH 9,6 ou pH 3,2. Elles ont des tolérances très variables vis à vis du sel. Enfin, les bactéries lactiques possèdent de faibles activités protéolytiques et lipolytiques et ont une exigence marquée en acide aminés, dérivés de base puriques et pyrimidiques et vitamines B (**KHODJA, 2018**).

La plupart des études génétiques sur les bactéries lactiques concernent les streptocoques pathogènes (comme *Streptococcus pneumoniae*) et les souches utilisées dans l'industrie laitière. Depuis quelques années, des études se sont développées notamment sur *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. Cependant, parmi les souches alimentaires, *Lactococcus lactis* est la bactérie la plus étudiée ; elle est de ce fait considérée comme l'espèce modèle. *Lactococcus lactis* est divisé en deux sous espèces principales, *lactis* et *cremoris*, initialement séparées sur des bases phénotypiques, puis à l'aide de séquençage des gènes codant pour les ARN ribosomiques 16 S (**KHERRAZ, 2013**).



La classification phénotypique des bactéries lactiques dépend en grande partie de la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, de la capacité à se développer à des concentrations élevées de sel (6,5 %, 18 %), de la tolérance aux pH acides, alcalins et éthanoliques, la configuration de l'acide lactique produit à partir de glucose, l'hydrolyse de l'arginine, la formation d'acétoïne, etc. Les marqueurs chimio-taxonomiques comme la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire peuvent aussi être utiles dans la classification (**ZERGOUG, 2017**). En pratique de routine, ces caractéristiques sont parfois insuffisantes pour l'identification des isolats en espèce particulière. Actuellement, avec les technologies de la PCR et du séquençage automatique de l'ADN du gène de l'ARNr 16S, l'identification des espèces est devenue une pratique plus simple et rapide (**BENMOUNA, 2019**).

En fonction de tous ces critères et propriétés, elle a varié de nombreux genres sous le nom de bactéries lactiques, au début on a les lactobacilles qui sont des bactéries à Gram positif, se trouvant couramment dans une grande diversité environnementale, y compris les environnements laitiers riches en éléments nutritifs, les habitats microbiennes d'hôtes tels que les muqueuses humaines, ainsi que les niches écologiques naturels tels que les plantes et le sol (**KHODJA, 2018**). Ce genre principalement de la famille des *Lactobacillaceae* et sont des bacilles ou coccobacilles groupés en paires ou en chaînes, micro-aérophiles ou anaérobies. Ils ont un métabolisme fermentaire produisant de l'acide lactique. Certaines espèces sont homolactiques, d'autres hétérolactiques (produisant des acides volatils, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>, en plus de l'acide lactique). Ils sont acidophiles et sont généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques. Les *lactobacillus* se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques. Originellement, elles ont été classées par Orla-Jensen (1919) en trois groupes: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Bétabacterium*. Ce classement avait été fait suivant des critères de température optimale de croissance et de produits de fermentations des sucres (**KHERRAZ, 2013**).

Deuxièmement, le genre *Lactococcus*, ce sont des microorganismes mésophiles capables de fermenter les hexoses par voie homofermentaire, produisant de l'acide lactique L (+)(**KHODJA, 2018**), et ont des exigences complexes pour sa croissance, à Gram positif, sans activité catalase, non mobiles et se présentant sous forme de coques disposés en paires ou en chainettes, ce dernier comprend 6 espèces : *L. garviae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* et *L.lactis*, *L.chungangensces* espèces dont les contenus en G+C varient de 34 % à 43% (**BENREGUIEG, 2015**).

Le genre *Leuconostoc*, à l'heure actuelle se compose exclusivement des espèces coccoïdes, ce sont non thermophiles et la température optimale de croissance est comprise entre 20°C et 30°C; presque aucune croissance ne se produit au-dessous de 40 °C. Les espèces sont généralement non acidophiles et préfèrent un pH du milieu initial entre 6 et 7, elles sont obligatoirement hétérofermentaires. La production de bactériocine a été enregistrée pour les souches de *Ln. mésenteroides*, *Ln. carnosum*, *Ln. citreum*, *Ln. gelidum* et *Ln. Pseudome senteroides*. Ces bactériocines sont actives contre les agents pathogènes d'origine alimentaire ; y compris *Lesteria monocytogenese* et sont donc bénéfiques comme bio-conservateurs pour la protection des aliments (**MOKDAD & Ail, 2020**).

Enfin le genre *Pediococcus*; les pédiocoques sont des bactéries à Gram positif, oxydase-négatives et catalase négative (**KHODJA, 2018**), elles sont immobiles de forme sphérique parfois ovoïdes, isolées ou en paires qui se divisent en deux directions perpendiculaires formant ainsi les tétrades mais jamais les chaines. Les cellules sont acidophiles à pH : 5, la température optimale de croissance est comprise entre 25°C à 35°C (**ZERGOUG, 2017**), les espèces *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* sont importante pour la création de la bactériocine "pediocines"(**KHODJA, 2018**).

Les phénomènes de stimulation entre les espèces des bactéries lactiques sont divisés en plusieurs catégories. On distingue le commensalisme, lorsqu'une population est stimulée par la production d'une substance essentielle ou la destruction d'un

facteur inhibiteur par une autre population et le mutualisme ou la proto-coopération, lorsque l'interaction est positive. Dans le cas du mutualisme, l'interaction est nécessaire à la survie des populations contrairement à la proto-coopération où l'interaction présente un caractère facultatif. Au domaine de stimulation par exemple pour la fabrication des yaourts l'interaction entre les lactobacilles et les streptocoques thermophiles est particulièrement mise à profit; dans un premier temps, les lactobacilles se développent puis, leurs activités protéolytiques et aminopeptidasique permettent de stimuler la croissance des streptocoques (**ZOUARI & BENARFA, 2018**).

Quant à l'antagonisme ou bien inhibition, ces interactions négatives faisant intervenir la production des substances inhibitrices sont connues sous le nom d'amensalisme. C'est notamment le cas des acides organiques issus des mécanismes homofermentaire et hétérofermentaire des bactéries lactiques. L'inhibition peut aussi résulter de la production de peroxyde d'hydrogène car contrairement à d'autres genres bactériens, les bactéries lactiques sont dépourvues de catalase capable de dégrader ce composé toxique. Durant la fermentation du lait, différents agents antimicrobiens ayant la capacité d'inhiber le développement de bactéries pathogènes et/ou d'une flore de dégradation de l'aliment sont produits par les bactéries lactiques, comme les bactériocines produites par quelques souches des bactéries lactiques, sont également des agents inhibiteurs très puissants dont le spectre d'activité s'étendent des souches phylogénétiquement proches de la souche productrice à des espèces génétiquement plus éloignées (**ZOUARI & BENARFA, 2018**).

Les phénomènes de compétition constituent la deuxième catégorie des interactions négatives fréquemment rencontrées, par exemple lors de la fermentation du lait par une culture mixte. Certains nutriments, présents dans le lait en faibles quantités et indispensables à la croissance bactérienne, peuvent être consommés

préférentiellement par un groupe microbien aux dépens d'un autre (**ZOUARI & BENARFA, 2018**).

Actuellement, les scientifiques exploitent les interactions microbiennes des bactéries lactiques pour réduire d'une façon considérable la présence des microorganismes indésirables et nuisibles (**MAMI, 2013**) et elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou altérantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide (**BOUMEDIENE, 2012**), par ce que ces microorganismes produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl, les biosurfactants ou encore les bactériocines (**ZERGOUG, 2017**), qui ont la capacité d'inhiber la croissance de germe pathogène par plusieurs techniques comme la diminution de pH, l'oxydation des lipides membranaires des souches cibles et/ou par la destruction des structures protéiques cellulaires...ect (**HAMMI, 2016**).

L'idée de l'utilisation des bactéries lactiques pour le contrôle de la croissance des moisissures dans les aliments vient de la cohabitation entre bactéries et moisissures sur ces aliments, mais aussi de la résistance croissante des moisissures aux antibiotiques. Les bactéries lactiques recensées dans la littérature comme présentant des propriétés antifongiques appartiennent fréquemment au genre *Lactobacillus* et quelque rares fois aux genres *Lactococcus* et *Pediococcus* et parmi les *Lactobacillus*, l'espèce *Lactobacillus plantarum* revient souvent, suivie de *Lactobacillus lactis*, les spectres d'activité de ces bactéries sont très variés, regroupant des moisissures des genres comme *Aspergillus*, *Penicillium*, et des espèces de levures telles que *Saccharomyces* et *Candida albicans*. L'activité antifongique chez la bactérie lactique est grâce à les métabolites primaires produits au cours de la croissance du microorganisme qui sont les acides comme l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'acide propionique, de l'acide formique et du peroxyde d'hydrogène aussi la



bactériocine a donné un élan pour le développement d'aliment de qualité sanitaire meilleur et plusieurs types de protéine chez *Lactobacillus* et les *Pediococcus* (**HADEF A. , 2015**).

L'une des substances produites par les LB, qui a une activité antibactérienne et antifongique est également la bactériocine ; des différentes définitions ont été données au cours du temps. La définition qui reste la plus largement acceptée pour les bactériocines est des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (**BOUMEDIENE, 2012**).

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (**BOUMEDIENE, 2012**). La plupart sont des petites molécules, stable à la chaleur, cationique, amphiphile et perméables. Ils ont un spectre d'activité limité contre les espèces de même genre mais dans certain cas l'effet inhibiteur inclue les bactéries altérantes et pathogènes de l'aliment (**BOUMEDIENE, 2012**). Ces sont généralement classées en plusieurs classes selon des différentes études ; selon une classification basée sur ( **BESHKOVA & FRENGOVA, 2012** ) ; (**ALVAREZ-SIEIRO & All, 2016**) ; (**ABDULLA, 2020**) classée les bactériocines en quatre classes (**BOUABIBSA & DARANI, 2021**).

La première classe des bactériocines (classe I) ou les lantibiotiques sont peptides ribosomiquement synthétisés de taille moléculaire inférieure à 5 kDa (2-5KDa), stables à la chaleur qui post-traductionnellement modifiés contiennent des acides aminés inhabituels : lanthionines et  $\beta$ -méthyle lanthionine. Ils peuvent être divisés en deux types (**KHODJA, 2018**) : sous classe A (Ia) sont des molécules peptidiques amphipatiques allongées (linéaires), flexibles, et sous classe B (Ib) sont

des molécules peptidiques globulaires anioniques négativement ou neutres (**BOUABIBSA & DARANI, 2021**) et les plus importants producteurs de celui-ci les *Lactococcus*. Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques, ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II ou un précurseur de peptidoglycane, suite à cette liaison, des pores larges et non spécifiques se forment dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide de petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, c'est à dire le potentiel transmembranaire et le gradient de pH, ayant comme conséquence la cessation rapide des activités cellulaires et la mort de la cellule. Alors cette interaction avec le lipide II va permettre l'augmentation de la stabilité des pores formés et de réduire la concentration du lantibiotique nécessaire pour former un pore aussi peut également inhiber la synthèse de la paroi cellulaire. D'autre part, certains lantibiotiques peuvent bloquer la sporulation (**CHAALAL, 2015**).

Ensuite, classe II ou ce qu'on appelle non lantibiotique, ce sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, formés exclusivement avec des acides aminés non modifiés, synthétisés sous forme d'un pré peptide inactive clivé à la partie N-terminale pour donner la forme active. Cette dernière est subdivisée en trois sous-classes (**KHODJA, 2018**); sous-classe IIa formées par un peptide de type pediocine et ont une activité anti-*Listeria*. L'un des plus importants producteurs de celui-ci est les *Pediococcus*, sous-classe IIb formées par deux peptides dont l'activité dépend de l'action complémentaire de ces peptides et ce classe peuvent être distingués deux type E (Enhancing) et S (Synergy) se produisent par les *Lactobacilles* (**BOUABIBSA & DARANI, 2021**), et la dernière sous classe IIc: elles toutes les autres bactériocines de classe II ne pouvant pas être classées dans les sous-classes a et b, le genre le plus connu est l'*Enterococcus* (**KHODJA, 2018**). Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un

récepteur, le mannose perméase, pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule sa formation n'est pas connue même si l'hypothèse la plus courante est l'assemblage de différentes molécules de la bactériocine. Ce qui induit la perméabilisation de la membrane qui conduit à la perte d'ions potassium ainsi que d'acides aminés et d'autres molécules de faible poids moléculaire et par conséquent la mort de la cellule, et pour la classe IIb, en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram-positif, elles rendent la membrane perméable à différentes petites molécules (les cations monovalents ou les anions) (CHAALAL, 2015).

La classe III, ou bien les bactériolysines sont des grandes protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur (KHODJA, 2018), inhibant les bactéries sensibles par d'autres mécanismes que l'activité de rupture de la membrane (BOUABIBSA & DARANI, 2021). Cette classe contient quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus, helveticus* l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Spreptococcus zoo epidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (KHODJA, 2018). Le mode d'action de ce type diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'enterolysine A, la zoocine A et la millericine B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles. La zoocine A a un spectre d'action étroit alors que l'enterolysine A et la millericine B ont un spectre d'action large, alors que L'helveticine J a un mode d'action bactéricide (CHAALAL, 2015).

Le dernier classe de bactériocine selon cette étude est classe IV, sont à groupement non protéiques qui forment de grands complexes avec d'autres macromolécules parties lipidiques ou glucidiques (glycoprotéines et/ ou lipoprotéines)(BOUABIBSA & DARANI, 2021). Cependant, actuellement aucune bactériocine n'a été purifiée ou décrite et il y a bonne raison de croire que ce type de bactériocine est un objet façonné dû aux propriétés cationiques et hydrophobes des

bactériocines qui ont comme conséquence complexant avec d'autres macromolécules dans l'extrait brut (**KHODJA, 2018**) et les importants producteurs sont les *Lactobacillus*. Les bactériocines couplées à une partie non protéique, sucre ou lipide nécessaire à l'activité inhibitrice, cette classe fut ajoutée suite à l'observation de la perte de l'activité de certaines bactériocines après leur incubation en présence d'enzymes dégradant les sucres et les lipides, mais son existence reste controversée (**ZERGOUG, 2017**).

La bactériocine produit par les bactéries lactiques ont un grand intérêt dans ces dernières années grâce à leur potentiel d'application dans les industries alimentaires comme préservatives naturel (**BOUMEDIENE, 2012**) ou dans plusieurs autres utilisations dans divers autres domaines comme agricole et médicales.

L'utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire est avantageuse non seulement à cause de leur large spectre d'activité, mais aussi parce qu'elles sont non toxiques, facilement dégradables par les enzymes digestives et ne compromettent pas la prise des médicaments du fait qu'elles sont des substances naturelles, l'emploi des bactériocines permettrait d'avoir des produits plus sains et réduirait l'utilisation des agents chimiques de conservation(**KHODJA, 2018**), comme Produits laitiers où la bactériocine le type nisine est utilisée contre des bactéries pathogènes telles que *C. butulinum* et *L. monocytogenes* dans les fromages (le camembert) grâce à la nisine car il le seul reconnue jusqu'à maintenant comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe), et dans produits carnés, et aussi dans produits végétaux; l'utilisation des bactériocines dans les produits végétaux comprennent la nisine dans les légumes et jus de fruits en conserve, la pédiocine dans les salades et les jus de fruits et l'entérocin contre *B. cereus* dans le riz et les légumes et contre d'autres agents pathogènes tels que *S. aureus* et la bactérie d'altération. Aussi dans les dernières années, l'application des bactériocines dans la technologie a gagné une grande attention (**BOUABIBSA & DARANI, 2021**).

Quant à l'application de bactériocine dans le domaine médicale, au contrairement aux applications alimentaires des bactériocines, aucune bactériocine n'est à ce jour commercialisée comme médicament. Cependant, quelques-unes d'entre elles sont en cours d'essais cliniques pour le traitement d'infections cutanées, respiratoires, systémiques et/ ou urogénitales ainsi qu'en tant qu'agents contraceptifs. Parmi elles, il y a la rBPI21 en phase clinique III pour le traitement de la méningite (**CHAALAL, 2015**).

Au cours des deux dernières décennies, les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie, elles sont largement utilisées dans l'élaboration des produits alimentaires par des procédés de fermentations lactiques. Les bactéries lactiques assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sanitaire sécurité alimentaire, cette sécurité est favorisée grâce à la production d'acides organiques (acides lactiques et acétiques) qui font baisser le pH dans le milieu (**BOUMEDIENE, 2012**) c'est pour cette raison qu'elles sont considérées comme probiotique.

Les probiotiques sont des microorganismes vivants, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (**MEKRI, 2016**). Grâce à leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques utilisées par les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, les LB probiotiques sont parfois utilisés comme compléments dans des produits comme les yaourts ou bien dans des préparations pharmaceutiques sous forme de gélules. De nombreuses souches bactériennes ont montré leurs bénéfices sur la santé humaine et sont déjà commercialisées par Danone telles que *Bifidobacterium lactis* (**BOUMEDIENE, 2012**).

La bioconservation des aliments est une méthode biologique utilisée depuis 40 ans. Elle permettrait une conservation naturelle des aliments en préservant leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles, souvent perdues sous l'effet des agents

chimiques ou de la chaleur. On considère les bactéries lactiques sont les bactéries les plus intéressantes pour la bio préservation par ce que des nombreuses études ont montré leur potentiel dans toutes sortes de produits alimentaires (**MEKRI, 2016**); elles sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires grâce aux propriétés antimicrobiennes des métabolites qu'ils synthétisent tels que l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, les composés antifongiques, les acides phényllactiques, les antibiotiques comme la reutéricycline et les bactériocines (**CHAALAL, 2015**).

Les consommateurs exigent des aliments sains avec une longue durée de conservation, mais expriment également une préférence pour les produits peu transformés qui ne contiennent pas de conservateurs chimiques. Les bactériocines ont une option intéressante qui peut fournir au moins une partie de la solution, elles sont produites par des organismes GRAS, qui peuvent inhiber de nombreux organismes pathogènes (**BOUABIBSA & DARANI, 2021**). Ces molécules peuvent être appliquées sous une forme purifiée, semi-purifiée, aussi peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires, il sera alors produite in situ (**KHODJA, 2018**).

Dans cette optique, notre travail sera axé sur l'objectif suivant;

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne d'une collection de souches lactiques isolées à partir de produits laitiers Algériens fermentés traditionnellement vis-à-vis de certaines souches pathogènes.

# Etude expérimentale



## **i. Matériel et méthode**

### **Lieu de l'étude :**

Cette étude a été réalisée, au niveau de laboratoire de microbiologie appliquée, Département de Biologie, Université Echahid Cheikh Larbi Tebessi –Tebessa.

### **Objectives d'étude :**

Notre étude vise à évaluer par des méthodes conventionnelles le potentiel antimicrobien d'une collection de bactéries lactiques productrices de bactériocine.

Tester l'activité antimicrobienne et antifongique des bactéries lactiques productrices de bactériocine vis-à-vis des souches pathogènes et/ou d'altérations (de Gram - et Gram+).

### **1. Matériel :**

Pour effectuer les différentes étapes de notre travail expérimental, on utilise le matériel suivant :

#### **1.1. Appareillage :**

- Agitateur électrique.
- Centrifugeuse.
- Autoclave.
- Balance analytique.
- Étuves.
- Plaque chauffante.
- Réfrigérateur.
- PH mètre.
- Micropipette.
- Bec bunsen.

#### **1.2. Verreries et petit matériel:**

- Béchers.
- Boîtes pétri.
- Tubes à essai.
- Portoir des tubes.
- Tubes coniques.

- Les eppendorfs.
- Ance de platine.
- Spatule.
- Pince.

### 1.3. Milieux de culture et les produits chimiques:

- Mueller Hinton (MH).
- bouillon nutritif.
- gélose nutritive.
- MRS gélosé.
- MRS bouillon.
- NaOH.
- Eau physiologique.

### 1.4. Matériel biologique :

- Les souches des bactéries indicatrices :

#### a. Les souches de Gram positif (+) :

**Tableau01** : Les souches indicatrices de Gram positif et leur ATCC.

La souche indicatrice	ATCC
<i>Micrococcus luteus</i>	4698
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Bacillus cereus</i>	11778
<i>Aspergillus fumigatus</i>	LB22

#### b. Les souches de Gram négatif (-) :

**Tableau02** : Les souches indicatrices de Gram négatif et leur origine.

La souche indicatrice	Leur code	Origine
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>ozanaeae</i>	S19.E21	Merguez
<i>Escherichia coli</i> I	S8.E14	Merguez
<i>Raoultella terrigena</i>	S15.E23	Lait cru
<i>Serratia odorefira</i>	S43.E9.AS	Viande de poulet

**Tableau03** : L'antibiogramme des souches indicatrices de Gram négatif.

Souche	B-Lactamines													Aminosides		Quinolones			Divers				Phénotype de résistance
	AMX	PRL	TIC	TTC	CL	FOX	AMC	CAZ	CTX	FEP	ATM	IPM	ETP	GN	AK	NA	OFX	CIP	C	NIT	FOS	COT	
(S8.E14.Merguez) <i>Escherichia coli</i> 1	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	BLSE
(S19.E21.Merguez) <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>sppozaena</i>	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	BLSE
(S15.E23.Lait) <i>Raoultellaterrigena</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	BLSE
(S43.E9.AS.Viande de poulet) <i>Serratia odorifera</i> 1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	BLSE + carbapénèmes

**R** : Résistante, **S** : Sensible, **I** : Intermédiaire, **AMX** :Amoxicilline, **PRL** :Pipéracilline, **TIC** :Ticarcilline,**TTC** :Ticarcillin+Acide Clavulanique, **CL** :Cephalexine, **FOX**:Céfoxitine,**AMC** :Amoxicilline + Acide clavulanique, **CAZ** :Ceftazidime, **CTX** :Céfotaxime,**FEP** :Céfépime, **ATM** :Aztréonam, **IPM** :Imipénème, **ETP** :Ertapénème, **GN** :Gentamicine, **AK** :Amikacine, **NA** :Acide Nalidixique,**OFX** :Ofloxacine, **CIP** :Ciprofloxacine,**C** :Chloramphénicol,**NIT** :Nitrofurantoïne, **FOS** : Fosfomycine, **COT** :Cotrimoxazole

- Les souches des bactéries Lactiques "Inhibitrices":

**Tableau04** : Les souches inhibitrices et leur origine.

Souche lactique	Espèce	Origine
JMQ10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Klila
JMZ02	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Jben
ULZ15	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Jben
JMZ05	<i>Enterococcus faecium</i>	Klila
JMZ25	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Jben
KMQ31	<i>Enterococcus durans</i>	Klila
JMQ24	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Jben

Les bactéries isolées portent les numéros qui leur sont attribués dans la collection du laboratoire. Toutes les souches utilisées sont conservées dans un mélange glycérol (30%), bouillon cerveau-cœur (70%) à -20°C. Pour une conservation de courte durée, elles sont gardées sur une gélose de conservation de souches à 4°C. Avant leur utilisation, les bactéries sont revivifiées par une ou deux subcultures dans des bouillons choisies (suivant les souches) à 30°C pendant 18 à 24h.

## 2. Méthodes et protocoles utilisés :

### 2.1. Etude des interactions bactériennes :

La recherche d'éventuelle production de substance inhibitrice par les bactéries isolées est réalisée selon deux méthodes :

#### 2.1.1. Méthode indirecte : test de puits :

Décrite par **Barefoot et al, (1983)**, cette méthode permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique productrice de substance antimicrobienne avec la souche test. Les souches précédemment sélectionnées pour leur production de

substance antimicrobienne sont concernées par ce test. Les souches sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées pendant 18 heures. Après incubation, le milieu est centrifugé (4000tr/25min) et le surnageant est conservé. Dans une boîte de pétri contenant du MRS solide et ensemencé par les souches indicatrices (*Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Aspergillus fumigatus* LB22), des puits sont réalisées avec un emporte-pièce et celés par 10µl de gélose MRS. Les recevront 80µl du surnageant de la souche à tester et les boîtes sont incubées pendant 24 à 48 heures.

L'effet inhibiteur des surnageant de culture a été apprécié par l'apparition d'une zone claire autour des puits dont on mesure le diamètre.

### 2.1.2. Méthode directe (Spot agar test):

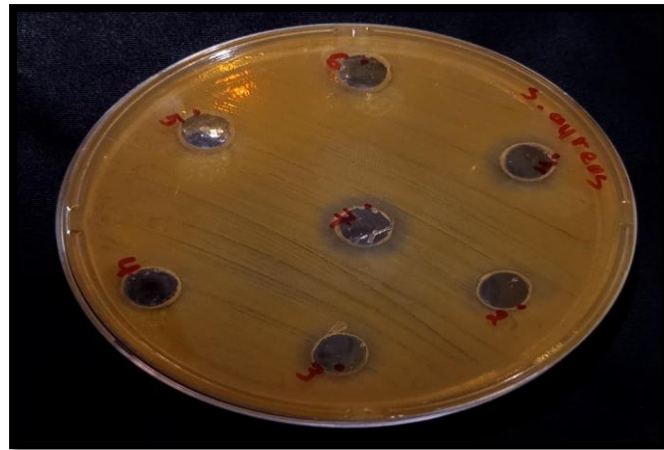
L'activité antimicrobienne de nos souches a été évaluée sur milieu solide selon la méthode (FLEMING, ETCHELLS, & COSTILOW, 1975). Le milieu MRS est ensemencé en touche par nos isolats (souches inhibitrices). Après 24 heures d'incubation une couche du milieu Mueller-Hinton (0.7%) est ensemencée par la souche indicatrice (**tableau 1,2**) est coulée à la surface puis ré incubée pour 24 à 48 heures supplémentaire. Les souches présentant une zone claire tout autour sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes.

## ii. Résultats et discussions :

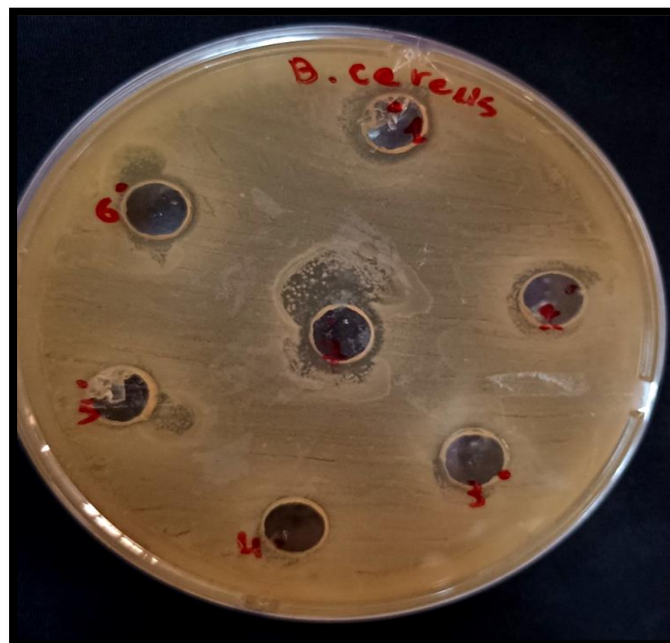
### 1. Résultats :

#### Test indirect "test des puits" :

Dans ce test les résultats s'observent sous forme de zones d'inhibition autour les puits. La mesure des diamètres des zones d'inhibition a été faite par un pied à coulisse, Les zones d'inhibition sont exprimées en (mm) et indiqué dans **Tableau 5**. La liste des photos suivante illustre les résultats d'antagonisme obtenus des surnageant des souches lactiques envers les souches tests. (**Figures 1 et 2**)



**Figure01** : Mise en évidence de l'interaction entre les surnageant des souches lactiques envers la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



**Figure02** : Mise en évidence de l'interaction entre les surnageant des souches lactiques envers la souche *Bacillus cereus* ATCC 11778

**Tableau05** : Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des surnageant des bactéries lactiques contre les souches indicatrices.

Les souches lactiques	Souches indicatrices / diamètre des zones d'inhibition (mm).			
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	<i>Aspergillus fumigatus</i> LB22
JMQ10	5	7	6	absence
JMZ02	absence	4	6	absence
ULZ15	1	7	4	absence
JMZ05	absence	5	4	absence
JMZ25	3	5	5	absence
KMQ31	absence	6	5	absence
JMQ24	4	9	6	absence

Le tableau 5 représente les résultats des interactions entre souches lactiques et les souches indicatrices à Gram positives.

La souche *Lactobacillus paracasei* **JMQ24**, présente une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée, sur toutes les bactéries pathogènes testées avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 4 mm à 9 mm, sauf sur *Aspergillus fumigatus* LB22 où aucune inhibition n'a été détectée. Cependant, cette souche s'est montrée très active sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec une zone d'inhibition de 9 mm. Le résultat est illustré dans la **figure 1**.

La souche *Lactobacillus plantarum* **JMQ10**, a montré un pouvoir antimicrobien dirigé contre toutes les bactéries pathogènes testées, cependant ce pouvoir est plus au moins inférieur à celui démontrée par la souche *Lactobacillus paracasei* **JMQ24**, avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 5 mm à 7 mm, sauf sur *Aspergillus fumigatus* LB22 où aucune inhibition n'a été détectée. Toutefois, cette souche a aussi révélée une bonne activité sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec une zone d'inhibition de 7 mm (figure 1) suivi par *Bacillus cereus* ATCC 11778 avec une zone d'inhibition de 6 mm (**figure 2 et 7**).



Nos résultats ont démontrés que les deux souches de *Enterococcus faecium* **JMZ05** et *Enterococcus durans* **KMQ31**, ne présentent aucune activité sur les deux souches testés *Aspergillus fumigatus* LB22 et *Micrococcus luteus* ATCC 4698. En revanche, les diamètres des zones d'inhibition sur les autres souches variés de 4 à 6 mm. Nous avons constaté que *Enterococcus faecium* **JMZ05** montre une activité modérée sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec une zone de 5 mm. la zone d'inhibition est estimée à 4 mm avec *Bacillus cereus* ATCC 11778. Quant à la souche *Enterococcus durans* **KMQ31**, cette dernière se montre active sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec une zone de 6 mm, et sur *Bacillus cereus* ATCC 11778 avec une zone d'inhibition de 5 mm (**Figures 1, 2 et 7**).

*Lactobacillus paracasei* **JMZ25** présente un spectre d'inhibition légèrement faible contre les souches ; *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus cereus* ATCC 11778 où les zones d'inhibitions ont été estimées entre 3 mm et 5 mm, avec une absence totale d'interaction avec l'*Aspergillus fumigatus* LB22.

La *Pediococcus pentosaceus* **ULZ15** a montré une activité presque négligeable sur toutes les souches testées surtout *Micrococcus luteus* ATCC 4698 avec une zone de 1 mm. Cette souche est également active sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (diamètres des zones d'inhibition 7 mm). Cependant elle ne montre aucune activité sur le champignon *Aspergillus fumigatus* LB22.

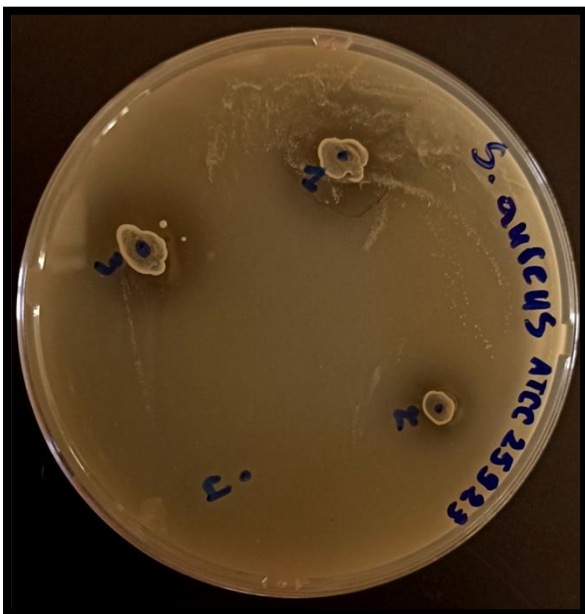
Quant à la bactérie *Pediococcus pentosaceus* **JMZ02**, elle n'a aucun effet sur les souches *Aspergillus fumigatus* LB22 et *Micrococcus luteus* ATCC 4698. En revanche, elle présente un effet remarquable sur la souche ; *Bacillus cereus* ATCC 11778 avec une zone d'inhibition de diamètre 6 mm (**figure 2 et 7**), et sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec une zone d'inhibition de 4mm (**figure 1**).

**Test direct "test des spots" :**

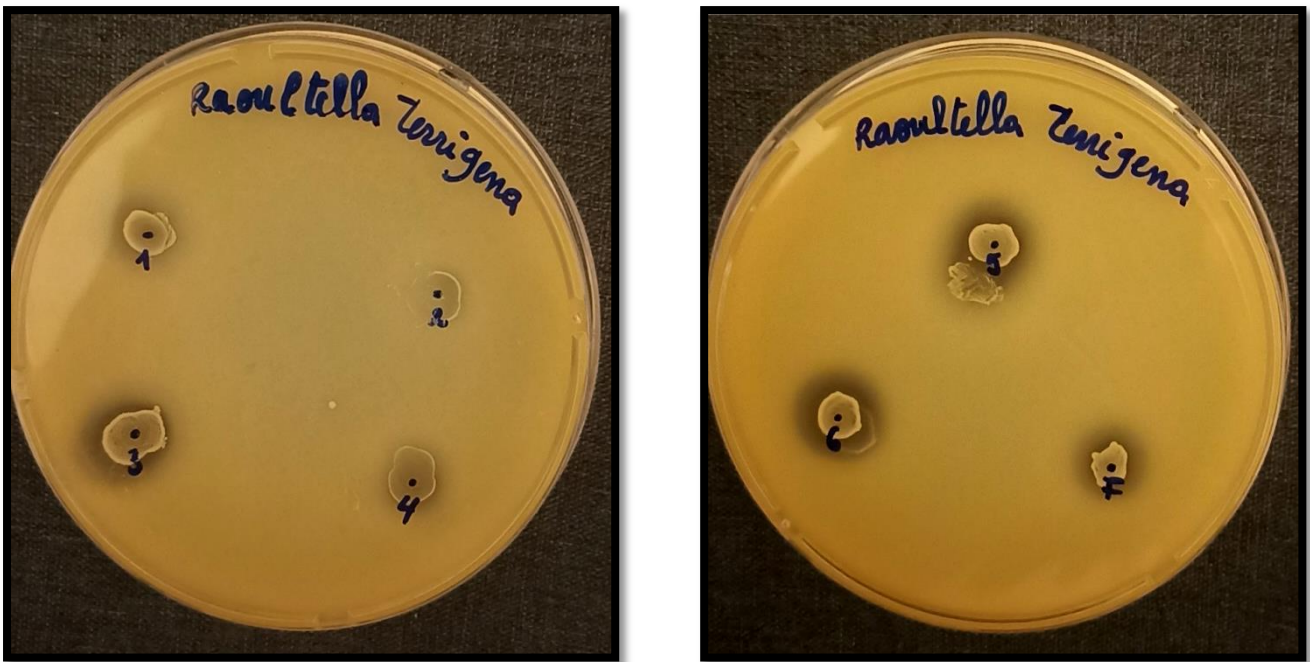
Dans ce test les résultats s'observent sous forme des zones d'inhibition autour les puits. La liste des photos suivante illustre les résultats d'antagonisme obtenus des surnageant des souches lactiques envers les souches tests. (Figures 3, 4, 5 et 6).



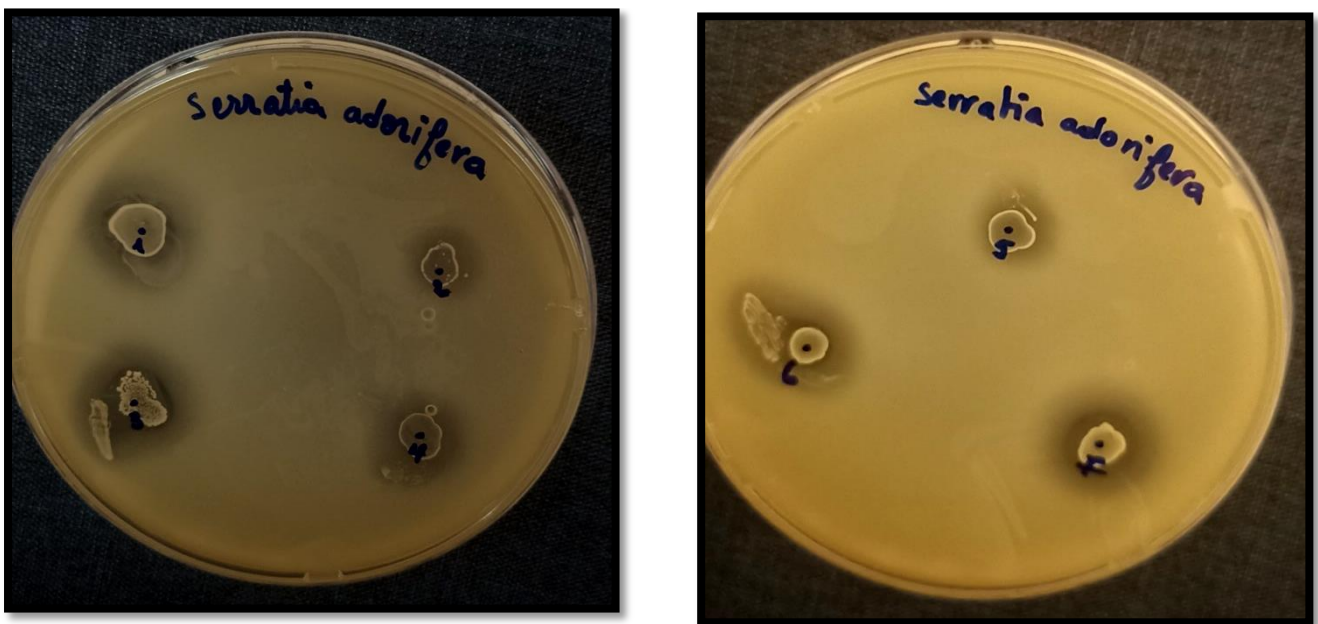
**Figure03** : Mise en évidence du pouvoir antagoniste des souches lactiques envers la souche *Aspergillus fumigatus* LB22.



**Figure 04** : Mise en évidence du pouvoir antagoniste des souches lactiques envers la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 4698.



**Figure05 :** Mise en évidence du pouvoir antagoniste des souches lactiques envers la souche *Raoultella terrigena* S15.E23.



**Figure06 :** Mise en évidence du pouvoir antagoniste des souches lactiques envers la souche *Serratia odorifera* S43.E9.AS.

La mesure des diamètres des zones d'inhibition a été faite par un pied à coulisse, Les zones d'inhibition sont exprimées en (mm) et indiqué dans **Tableau 6, 7.**

**Tableau06 :** Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des bactéries lactiques contre les souches indicatrices de Gram (+).

Les souches lactiques	Souches indicatrices / diamètre des zones d'inhibition (mm).			
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	<i>Aspergillus fumigatus</i> LB22
JMQ10	absence	16	13	Absence
JMZ02	15	11	10	Absence
ULZ15	25	18	13	19
JMZ05	17	Absence	8	Absence
JMZ25	26	18	14	15
KMQ31	32	18	22	22
JMQ24	28	15	16	16

**Tableau07 :** Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des bactéries lactiques contre les souches indicatrices de Gram (-).

Les souches lactiques	Souches indicatrices / diamètre des zones d'inhibition (mm).			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>ozaneae</i> S19.E21	<i>Escherichia coli</i> I S8.E14	<i>Raoultella terrigena</i> S15.E23	<i>Serratia odorefira</i> S43.E9.AS
JMQ10	22	22	10	19
JMZ02	8	18	7	11
ULZ15	17	19	16	18
JMZ05	15	14	11	14
JMZ25	19	21	13	11
KMQ31	18	18	15	15
JMQ24	18	21	12	20

Le tableau 6 et 7 représentent les résultats des interactions entre les souches lactiques utilisés ont une activité inhibitrice contre les souches indicatrices et souches



indicatrices à Gram positives et négatives a testées selon le test indirect par la méthode des spots.

*Lactobacillus plantarum* **JMQ10** montre une activité inhibitrice significative et bien prononcée sur toutes les bactéries pathogènes à Gram négatif testées avec des zones de diamètres d'inhibition allant de 10 mm à 22 mm où les deux souches *Klebsiella pneumoniae* ssp *ozanae* S19.E21 et *Escherichia coli* I S8.E14 étaient à égalité pour avoir la plus grande zone d'inhibition (**figure 9, 10**) et il est de 22 mm, puis *Serratia odorefira* S43.E9.AS avec un diamètre de 19 mm (**figure 6**), suivi de *Raoultella terrigena* S15.E23 avec 10 mm comme l'activité la plus faible de cette bactérie lactique sur les Gram négatifs (**figure 5**), viennent ensuite les souches Gram-positives où la souche *Lactobacillus plantarum* **JMQ10** avait une activité modérément efficace sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, qui atteignait un diamètre de surface de son inhibition était de 16 mm (**figure 4**), suivi de *Bacillus cereus* ATCC 11778 avec 13 mm, cependant, *Aspergillus fumigatus* LB22 et *Micrococcus luteus* ATCC 4698 n'ont démontré aucune inhibition. (**Figure 3, 8**).

*Pediococcus pentosaceus* **JMZ02** montre une activité fluctuante sur toutes les bactéries pathogènes Gram positives et Gram négatives testées, comme pour les souches Gram positives, des diamètres compris entre 10 mm et 15 mm ont été enregistrés, le plus grand diamètre étant pour *Micrococcus luteus* ATCC 4698 (**figure 8**). En revanche sur la souche *Aspergillus fumigatus* LB22, nous avons constaté une absence totale de toute interaction (**figure 3**). En ce qui concerne les souches Gram négatives, les zones d'inhibition variaient entre 7 et 18 mm, et la plus grande zone était enregistrée avec la souche *Escherichia coli* I S8.E14 (**figure 10**), suivie de *Serratia odorefira* S43.E9.AS avec 11 mm (**figure 6**), et enfin les deux souches *Klebsiella pneumoniae* ssp *ozanae* S19.E21 avec 8 mm (**figure 9**) et *Raoultella terrigena* S15.E23 avec 7 mm comme la plus petite zone d'inhibition pour cette souche lactique était enregistrée avec les souches pathogènes (**figure 5**).

La souche *Pediococcus pentosaceus* **ULZ15**, présente une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée, sur toutes les bactéries Gram positives testées avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 13 mm à 25 mm, et sur les Gram négatives avec des diamètres des zones d'inhibition proches allant de 16 mm à 19 mm. Tout de même, cette souche s'est montrée très active sur *Micrococcus luteus* ATCC 4698 avec une zone d'inhibition de 25 mm (**figure 8**), et sur *Escherichia coli* IS8.E14 avec une zone d'inhibition de 19 mm (**figure 10**).

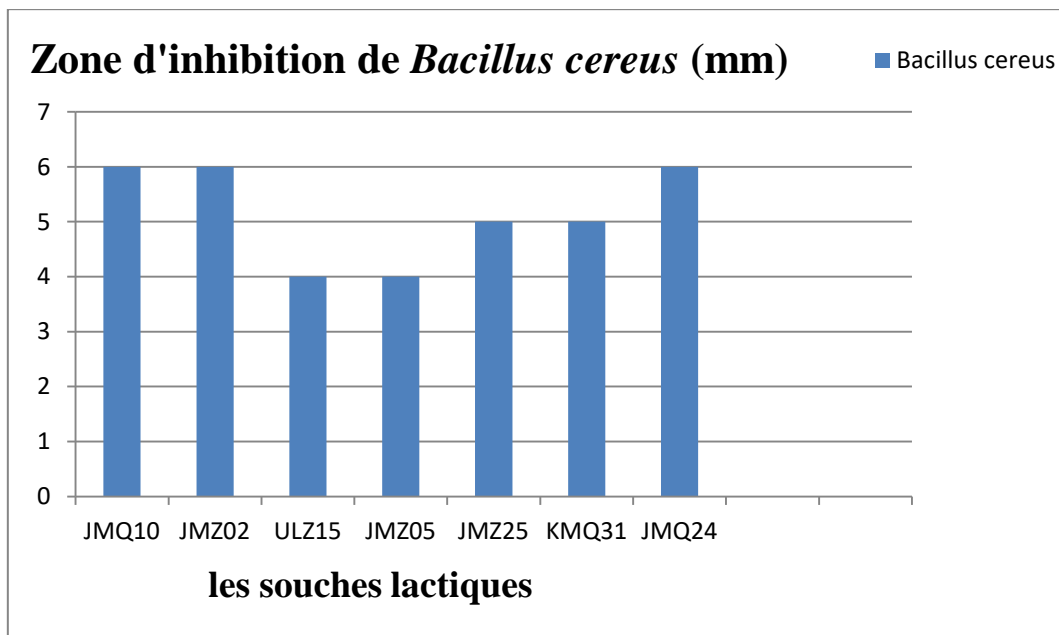
La souche inhibitrice *Enterococcus faecium* **JMZ05** présente un spectre d'activité très proche vis-à-vis des Gram négatifs et Gram positifs cibles testés. Les diamètres des zones d'inhibition variés de 8 à 17 mm. Parmi les souches indicatrices Gram positifs testées, nous n'avons constatés que notre souche n'exerce aucune inhibition vis-à-vis des souches *Staphylococcus aureus* ATCC 25923(**figure 4**) et *Aspergillus fumigatus* LB22 (**figure 3**). Pour *Micrococcus luteus* ATCC 4698 nous avons remarqué une grande zone d'inhibition avec un diamètre de 17 mm, avec la souche *Bacillus cereus* ATCC 11778 notre souche affait apparaitre une zone d'inhibition de 8 mm. Concernant les souches Gram-négatives testées, les diamètres de leurs zones d'inhibition variait entre 11 et 15 mm, et le plus grand diamètre était enregistré avec *Klebsiella pneumoniae* ssp *ozanae* S19.E21 (15mm) et le plus petit *Raoultella terrigena* S15.E23 (11 mm). En fin avec les deux souches *Escherichia coli* I S8.E14 et *Serratia odorefira* S43.E9.AS la zone d'inhibition est estimé à 14mm.

La *Pediococcus pentosaceus* **JMZ02** a montré une activité inhibitrice très importante sur toutes les souches testées soit de gram positif ou négatif. Dans les Gram + surtout *Micrococcus luteus* ATCC 4698 par une zone de 32 mm (**figure 8**), c'est la plus grande surface de ce test, suivie par les deux souches *Bacillus cereus* ATCC 11778 et *Aspergillus fumigatus* LB22(**figure 3**) égales avec 22 mm , puis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec un diamètre de 18 mm (**figure 4**), quant aux souches à Gram négatif, les deux souches *Klebsiella pneumoniae* ssp *ozanae* S19.E21(**figure 9**) et *Escherichia coli* I S8.E14(**figure 10**) avaient la plus grande surface d'inhibition, qui est de 18 mm, tandis que les deux souches *Raoultella*

*terrigena* S15.E23(**figure 5**) et *Serratia odorefira* S43.E9.AS avaient la plus faible zone d'inhibition, qui était de 15 mm (**figure 6**).

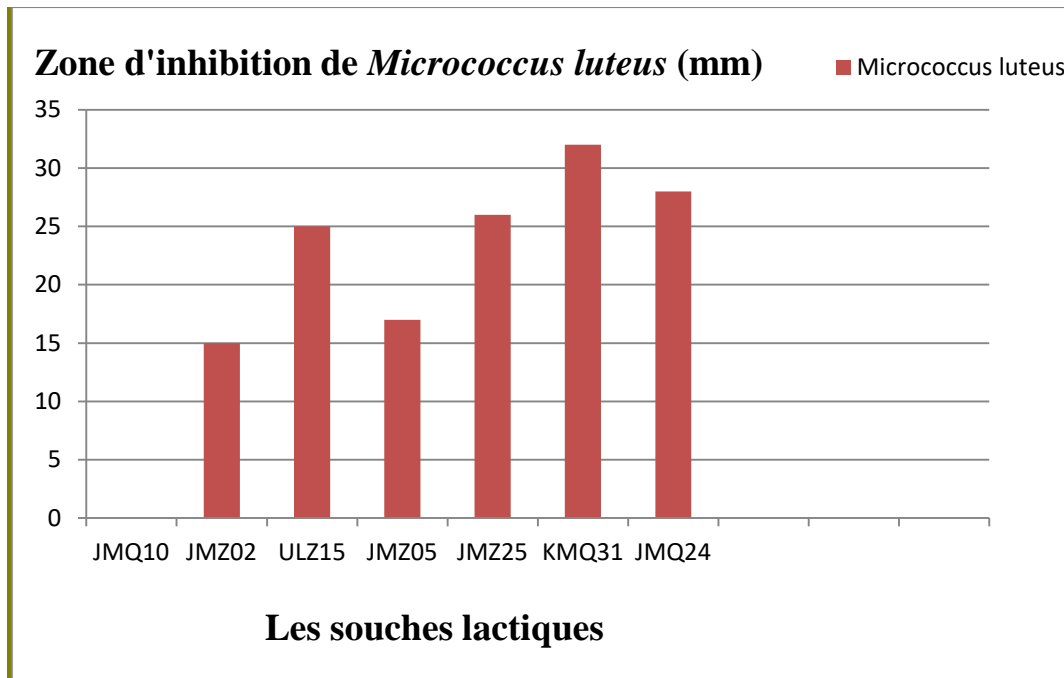
La souche *Lactobacillus paracasei* **JMQ24** présente un spectre d'inhibition très important contre les souches Gram + avec des zones de diamètres d'inhibition allant de 10 mm à 22 mm) et cette souche s'est montrée très active sur *Micrococcus luteus* ATCC 4698 avec une zone d'inhibition de 28 mm (**figure 8**) , aussi contre les souches Gram- présente un spectre d'inhibition très important dirigé contre *Escherichia coli* I S8.E14 (**figure 10**) et *Serratia odorefira* S43.E9.AS (**figure 6**) (les zones d'inhibition étaient de 21 mm et 20 mm de diamètre) par rapport aux souches Gram négatifs testées.

Les résultats obtenus sont reportés sur les graphiques suivantes :

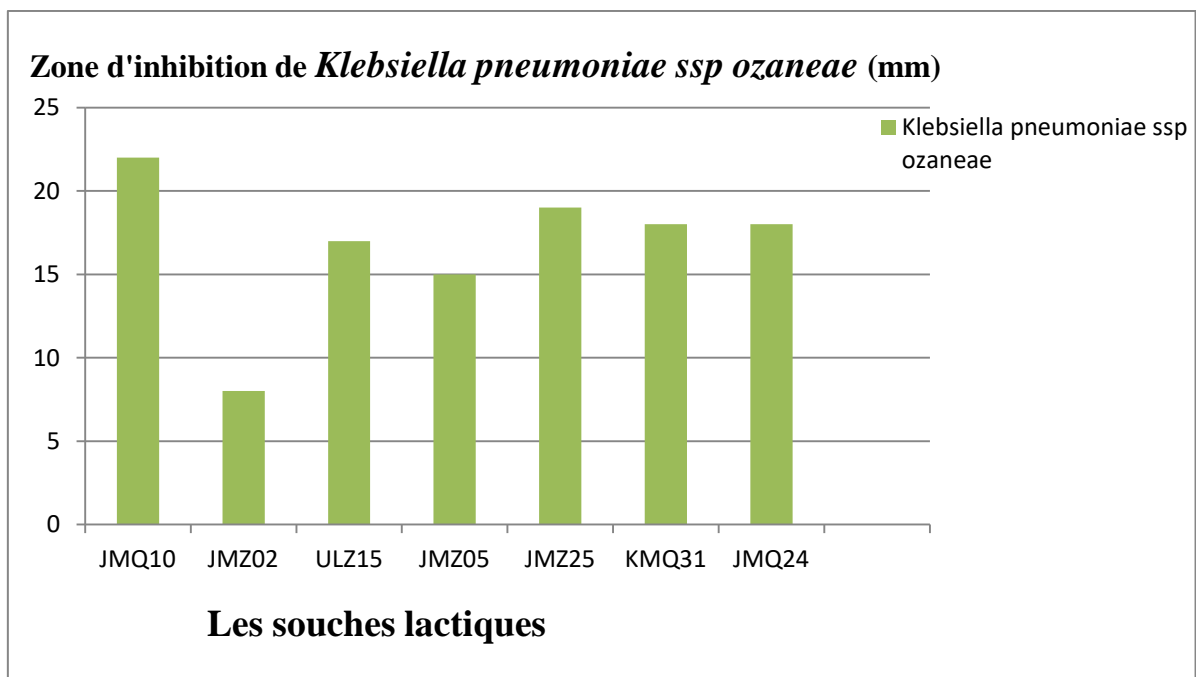


**Figure07** : Interactions antimicrobiens entre des souches lactiques et *Bacillus cereus* ATCC11778.

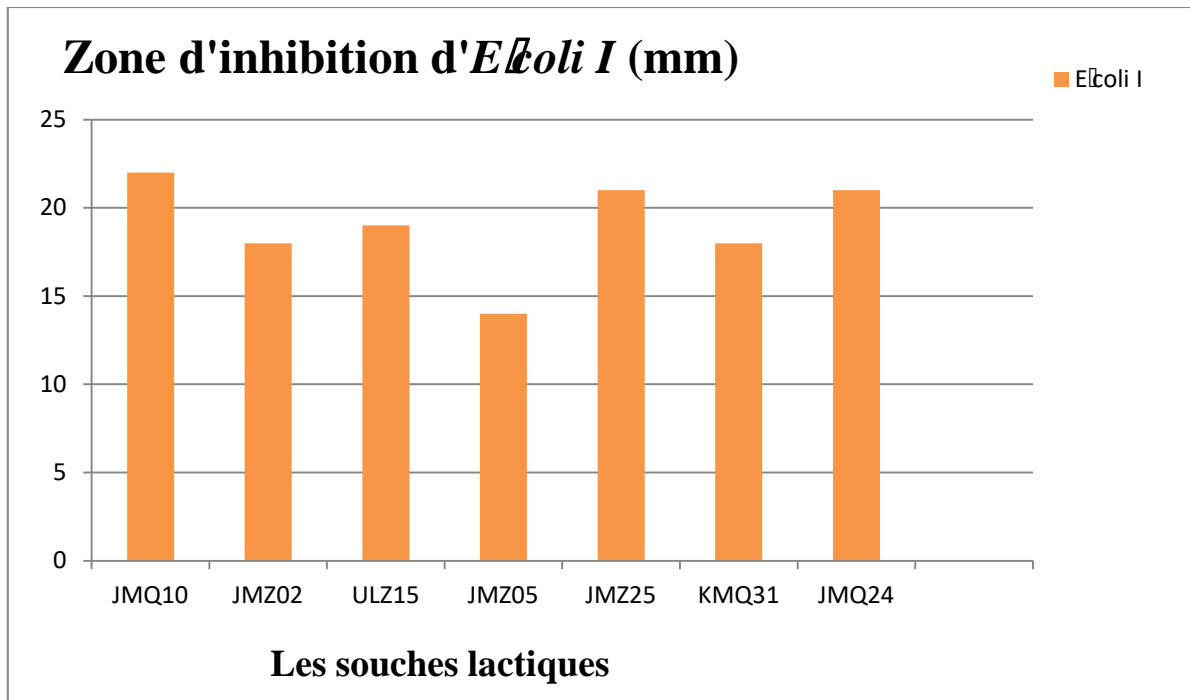




**Figure08 :** Interactions antimicrobiens des souches lactiques contre *Micrococcus luteus* ATCC 4698.



**Figure09 :** Interactions antimicrobiens des souches lactiques contre *Klebsiella pneumoniae ssp ozaneae* S19.E21.



**Figure10** : Interactions antimicrobiens des souches lactiques contre *Escherichia coli* I S8.E14.

## 2. Discussions :

La bio-préservation utilise des microorganismes antagonistes ainsi que leurs métabolites (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyle, bactériocines, etc.) pour inhiber ou détruire les microorganismes indésirables dans les aliments. Les bactéries lactiques sont les acteurs essentiels de cette bio-préservation (**ZOUARI & BENARFA, 2018**).

Les bactéries lactiques jouent un rôle technologique fondamental en transformation laitière et la recherche de nouvelles souches possédant des activités biologiques particulières sont en pleine expansion dans le secteur de l'industrie laitière (**MAMI, 2013**). Ces dernières années, l'intérêt de l'emploi de la bactériocine et ou tout autre BL productrice des substances inhibitrices pour des applications de bio-préservation a suscité beaucoup de recherches (**MERZOUG, 2017**).

L'activité antimicrobienne des souches lactiques productrices des bactériocines semi purifiées (fractions obtenues après centrifugation) a été testée sur une large gamme des bactéries indicatrices incluant certaines bactéries Gram positifs

pathogènes et des Gram négatifs multi-résistantes aux antibiotiques. Les deux méthodes de références utilisées à savoir ; la méthode de diffusion en puits et la méthode de spots nous ont permis de constater que les souches testées ont montré une activité vis-à-vis de la plupart des bactéries cibles.

Ces résultats indiquent que nos bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne et antifongique envers les 8 souches pathogènes indicatrices. Les activités antimicrobiennes des souches testées sont répartir selon les genres comme suit.

### ➤ Les lactobacilles:

Le spectre d'activité des substances inhibitrices produites par *Lb. plantarum* **JMQ10** et *Lb. paracasei* **JMQ24** et *Lb. paracasei* **JMZ25** englobe également la souche indicatrice Gram positives *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 résistante aux antibiotiques. D'autre part, les 4 espèces de bactéries à Gram négatif testées (*Klebsiella pneumoniae* ssp *ozanae* S19.E21, *Escherichia coli* I S8.E14, *Raoultella terrigena* S15.E23, *Serratia odorefira* S43.E9.AS) sont aussi affectées par les substances inhibitrices produites par les lactobacilles, ce qui est une caractéristique inhabituelle des bactériocines des bactéries Gram+ en général, et lactiques en particulier. Les bactéries à Gram négatif est le plus résistante parce qu'ils contiennent une enveloppe cellulaire, les bactériocines ont un mécanisme d'action spécial qui interfère avec l'absorption des molécules présentes dans les cellules sensibles. Selon (**BHUNIA & Ail, 1991**), la pédiocine AcH (produite par *P. acidilactici* H) interagit avec les acides lipotéchoïques, absents chez les bactéries Gram-. Ces molécules joueraient le rôle de site de réception non spécifique nécessaire pour produire l'effet bactéricide. Selon **Kalchayanand et al.,(1992)**attribuent la résistance des bactéries Gram- à la pédiocine AcH à la barrière que représenterait leur membrane externe (**ZOUARI & BENARFA, 2018**). L'incapacité des bactériocines à traverser cette barrière est due à leur poids moléculaire et/ou à leurs propriétés hydrophobes

(**TODOROV & DICKS, 2004**) dans le cas où la membrane externe est rendue perméable, soit par un traitement physique (**STEVENS & Ail, 1991**)

L'analyse de nos résultats nous ont permis de constater que les souches *Lb. plantarum* **JMQ10** et *Lb. Paracasei* **JMZ25** et *Lb. Paracasei* **JMQ24** ont présenté un pouvoir antibactériens dirigé contre les bactéries pathogènes gram positives (*Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778). Toute fois nous avons constaté que la souche *Lb. Plantarum* **JMQ10** n'y a aucun effet sur *Micrococcus luteus* ATCC 4698.

Plusieurs études récentes ont rapporté que la spécificité de l'action des bactériocines parmi les bactéries Gram+ est fonction des caractéristiques des souches : composition des protéines et des phospholipides membranaires et de la couche de peptidoglycane. Selon (**DIMITRI, 2017**), la séquence d'acides aminés d'une bactériocine donne lieu à un certain nombre de charges positives avec des positions relatives particulières, ce qui permet la reconnaissance d'un site récepteur par neutralisation des charges négatives se trouvant à la surface membranaire et le deuxième facteur de spécificité concernerait l'interaction entre la séquence hydrophobe de la bactériocine et les phospholipides de la membrane (**DIMITRI, 2017**).

Ce que nous avons remarqué lors de nos travaux, l'activité inhibitrice nettement exercée par les souches lactiques *Lb. plantarum* **JMQ10**, *Lb. paracasei* **JMQ24** et *Lb. paracasei* **JMZ25** contre des souches à Gram négatifs : *Klebsiella pneumoniae* ssp *ozanae* S19.E21, *Escherichia coli* I S8.E14, *Raoultella terrigena* S15.E23, *Serratia odorefira* S43.E9.AS. Selon **Karthikeyan et Santosh.,(2009)**, ont décrit des souches de *Lb. plantarum* qui ont montré un ouvoir inhibiteur contre les souches de *Klebsiella* sp. Plusieurs études selon **Dinev et al., (2017)** récentes ont rapportées que les souches de *Lb. Plantarum* produisent une large gamme de bactériocines comme ST28MS, ST26MS, bacST202Ch, bacST216Ch, ST71KS, plantaricine B, D, K, MG, JKZJ008, etc. *Lb. plantarum* est actif contre de nombreux agents pathogènes à Gram négatif, des microorganismes d'altération des aliments et divers MDR.

Concernant l'activité antifongique des souches lactique nous avons remarqué que les souches *Lactobacillus paracasei* **JMZ25** et *Lactobacillus paracasei* **JMQ24** possèdent un effet antifongique à l'égard d'*Aspergillus fumigatus* LB22.

### ➤ Les pediocoques :

Dans le présent travail nous avons remarqué, une activité inhibitrice nettement exercée par les souches lactiques *Pediococcus pentosaceus* **JMZ02** aussi *Pediococcus pentosaceus* **ULZ15** contre des souches à Gram négatifs : *Klebsiella pneumoniae* ssp *ozanae* S19.E21, *Escherichia coli* I S8.E14, *Raoultella terrigena* S15.E23, *Serratia odorefira* S43.E9.ASet a Gram positifs : *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778. Aussi la souche *Pediococcus pentosaceus* **ULZ15** possède un effet antifongique dirigé contre *Aspergillus fumigatus* LB22.

Des études récentes ont montré que parmi les pediocoques, l'espèce *Pediococcus pentosaceus* **JMZ02** et *Pediococcus pentosaceus* **ULZ15** est caractérisée par une activité dirigé contre les souches Gram négatifs testées : *E. coli* ATCC 25922 et *S. marcescens* LC 448 (**KHODJA, 2018**). En effet, l'activité inhibitrice contre des bactéries à Gram négatif est un phénomène inhabituel et n'a jusqu'à présent été signalé que pour peu de bactériocines, à titre d'exemple : la thermophylin 81, produite par *S. thermophylus* et la plantaricine 35D produite par *L. plantarum* (**ALBANO & All, 2007**). D'après ces auteurs, ce sont la structure et la composition de la membrane externe des bactéries à Gram négatif qui ne permet pas l'accès de certaines bactériocines, dont la pédiocine PA-1, à la membrane plasmique. En effet, il a été rapporté que cette résistance des bactéries à Gram négatif est probablement due à la richesse de leur membrane externe en LPS. Ces derniers empêcheraient les bactériocines d'accéder au lipide II site de fixation des bactériocines (**HAMMI, 2016**).

### ➤ Les entérocoques :

La souche *Enterococcus faecium* **JMZ05**, est caractérisée par une activité inhibitrice remarquable contre les deux souches à Gram positifs (*Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Bacillus cereus* ATCC11778) de même la souche *Enterococcus durans*

**KMQ31** a une activité antibactérien contre les Gram positifs (*Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778). Les 2 souches *Enterococcus faecium* **JMZ05**, *Enterococcus durans* **KMQ31** exercent une activité inhibitrice contre les souches à gram négatives (*Klebsiella pneumoniae* ssp *ozanae* S19.E21, *Escherichia coli* I S8.E14, *Raoultella terrigena* S15.E23, *Serracia odorefira* S43.E9.AS).

La souche *Enterococcus durans* **KMQ31** possède une activité antifongique contre *Aspergillus fumigatus* LB22.

Les entérocoques sont largement répandus dans la nature et elles sont fréquemment rencontrées dans le tractus gastro-intestinal humain et animal. C'est l'un des groupes de bactéries lactiques les plus controversé en raison de leur association à diverses infections humaines et de leur résistance à une large variété d'antibiotiques. Les entérocoques peuvent aussi être utilisés comme agents antimicrobiens grâce à la production des entérocoques.

Le genre *Enterococcus* produit une grande variété de bactériocines, dénommées entérocoques. Ces dernières sont des peptides de faible poids moléculaire constitués de 20 à 60 acides aminés cationiques et amphiphiles. Cependant, le spectre d'activité, le mode d'action, la structure, la thermostabilité et le pH d'activité varient d'un type de bactériocine à l'autre (**DORTU & THONART, 2009**).

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons constater nos bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne. L'ensemble des souches pures ne présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis des bactéries pathogènes. La majorité des souches sont actives sur les bactéries à gram positif mais pas tous sur les bactéries à gram négatif. Selon (**HADEF S. , 2012**) les bactéries Gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques.

Par ailleurs, les bactéries lactiques sont connues par la production d'une multitude de composés antimicrobiens : les acides organiques, les bactériocines, le diacétyle et le peroxyde d'hydrogène (**TITIEK & Ail, 1996**)(**ASLAM & QAZI,**

2010). Charlier et al., (2009) ont montré que *Lactococcus* sp et *Leuconostoc* sp présentent une inhibition à spectre élargie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* qui est induite par l'effet de l'acide lactique et des bactériocines.

La capacité inhibitrice in vitro des bactéries lactiques vis-à-vis des germes pathogènes semble être une bonne propriété probiotique, comme elle peut jouer un rôle dans la préservation de la qualité hygiénique des denrées alimentaires (AMMOR & All, 2006).

On a vu que les 2 souches *Enterococcus faecium* JMZ05, *Enterococcus durans* KMQ31 ont des effets évidents contre les bactéries indicatrices multi-résistantes à Gram négatives (*Klebsiella pneumoniae* ssp *ozanae* S19.E21, *Escherichia coli* I S8.E14, *Raoultella terrigena* S15.E23, *Serratia odorefira* S43.E9.AS). Où l'on trouve que les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) sont particulièrement inquiétants pour la communauté médicale, car la vancomycine est un antibiotique de dernier recours. *E. faecalis* et *E. faecium* présentent une résistance aux multiples classes d'antibiotiques telles que les B-lactamines, les clindamycines et de faibles doses d'aminoglycosides. Cependant, l'utilisation des bactériocines pour lutter contre les espèces multi-résistantes a fait ses preuves ces dernières années (MERZOUG, 2017).



## Conclusion

Les bactéries lactiques sont généralement reconnues comme étant saines, de statut "GRAS" (Generally Recognized As Safe) et jouent un rôle important dans la fermentation et la conservation des aliments.

L'objectif principal de notre travail était d'évaluer in vitro le potentiel des bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes dirigées contre des bactéries pathogènes.

Au cours des travaux pratiques, nous avons d'abord procédé à la revivification de nos bactéries conservées, à savoir les sept souches lactiques et les souches testées (quatre pour les Gram négatifs et quatre pour les Gram positifs), puis nous avons examiné leur pureté par des repiquages successifs sur milieux gélosés appropriés

Notre recherche est portée principalement sur l'étude de l'activité antagoniste des bactéries lactiques productrices contre des microorganismes pathogènes et/ou d'altérations de Gram - et Gram + (indicatrices) par deux méthodes à savoir la méthode de spot et la méthode des puits.

Nos résultats ont montré que les souches lactiques sélectionnées se sont montrées avoir un large éventail de capacités antagonistes contre les bactéries Gram-positives (*Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778), ainsi que les Gram-négatives entéro-pathogènes multi-résistantes aux antibiotiques (*Klebsiella pneumoniae ssp ozanae* S19.E21, *Raoultella terrigena* S15.E23, *Serratia odorefira* S43.E9.AS), notamment la souche *Escherichia coli I* S8.E14.

En guise de conclusion nous pouvons conclure que l'étude des bactériocines dirigées contre des souches pathogènes pourrait conduire à leur utilisation comme agents naturels pour améliorer la conservation des produits alimentaires fermentés.

Cette application, en cours avec la nisine, devrait être encore développée en apportant de nouvelles bactériocines.

## **Bibliographie**

ABDULLA, A. A. (2020). Classification, mechanism of action and applications of bacteriocins from lactic acid bacteria : A review. (U. o. Babylon, Ed.) Plant Archives , 20 (2), 7487-7492p.

ALBANO, H., TODOROV, S., VAN REENEN, C., HOGG, T., TEIXEIRA, P., & DICKS, L. (2007). Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *Int J Food Microbiol* (116), 239 –247p.

ALVAREZ-SIEIRO, P., MONTALBAN-LOPEZ, M., DONGDONG, M., & KUIPERS, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria : extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology. Applied Microbiol Biotechnol* , 100 (7), 2939-2951p.

AMMOR, S., TAUVERON, G., DUFOR, E., & CHEVALIER, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control* , (17), 454-461p.

ASLAM, S., & QAZI, J. (2010). Isolation of acidophilic lactic acid bacteria antagonistic to microbial contaminants. *Pakistan. J. Zool* , 42 (5), 567-573p.

BENMOUNA, Z. (2019). Etude de bactériocines de bactéries lactiques et leurs effets. thèse de doctorat, UNIVERSITE ORAN 1 AHMED BEN BELLA, Ecosystèmes Microbiens Complexes, Oran,219p.

BENREGUIEG, M. (2015). Propriétés Antibactériennes et Probiotiques de Bactéries Lactiques Isolées à Partir du Lait de Vache, de Chèvre et de Brebis dans la région de l’Ouest Algérien. thèse de doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis , Microbiologie, Mostaganem,181p.

BESHKOVA, D., & FRENGOVA, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences* , 12 (4),419-432p.

BHUNIA, A., JOHINSON, M., & KALCHAYAND, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *Appl. Bacteriol* (70), 25-33p.

- BOUABIBSA, R., & DARANI, N. (2021). Bactériocines des bactéries lactiques : Dernières nouveautés. mémoire de master, université mohammed seddik BENYAHIA, Microbiologie Appliquée et sciences alimentaires, jijel,57p
- BOUMEDIENE, K. (2012). Recherche des bactéries lactiques productrices bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes. Magister en Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd, Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien, Tlemcen,80p.
- CAPLICE, E., & FITZGERALD, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* , 50, 131-149p.
- CHAALAL, A. (2015). Les substances antagonistes (i.e Bactériocines) produites par une souche de *Lactobacillus rhamnosus* et une souche de *Lactobacillus plantarum*: caractérisation biochimique et effets in vitro attendus chez quelques germes responsables de toxi-infections. thèse de doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis, Biotechnologie et santé, Mostaganem,146p.
- DIMITRI, C. (2017). Caractérisation biochimique et structurale de bactériocines ciblant le métabolisme du peptidoglycane bactérien, alternative potentielle aux antibiotiques. Thèse de doctorat, Université Paris-Saclay , Biochimie et Biologie structurale, Paris-Sud,261p.
- DORTU, C., & THONART, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* , 13 (1), 143-154p.
- FLEMING, H., ETCHELLS, J., & COSTILOW, R. (1975). Microbiological inhibition of isolate of *Pediococcus* from cucumber brine. (T. N. Information, Ed.) *Applied microbiology* , 30 (6), 1040-1042p.
- HADEF, A. (2015). Recherche de bactéries lactiques à activité Antimycotoxinogène isolées à partir du lait caillé. mémoire de master, Université des Frères Mentouri , Biotechnologie Fongique, Constantine,65p.
- HADEF, S. (2012). Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de Magister, Université Kasdi Merbah, Microbiologie Appliquée, Ouargla,135p.

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 en cotutelle Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, Chimie Analytique et Microbiologie - biologie moléculaire, Strasbourg, Fes, 149p.

KHERRAZ, D. (2013). Isolement et identification phénotypique des bactéries lactiques isolées du Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) et mise en évidence de leur potentiel probiotique. thèse de doctorat, Université d'Oran, Sciences de l'Environnement, Oran, 217p.

KHODJA, B. (2018). Caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de bactéries lactiques productrices de bactériocine. thèse de doctorat, Université Djillali Liabes de SIDI Bel Abbès, Microbiologie Moléculaire Proteomics et Santé, SIDI Bel Abbès, 100p

MAMI, A. (2013). Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. thèse de doctorat, Université d'Oran, Microbiologie Appliquée, Oran, 176p

MECHAI, A. (2009). Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et biochimiques. thèse de doctorat, Université Badji-Mokhtar- Annaba, Biochimie, Annaba, 186p.

MEKRI, M. (2016). Effet de synergie des bactériocines issues des bactéries lactiques et pseudolactiques et des huiles essentielles d'*Inula viscosa* contre les germes pathogènes. thèse de doctorat, Université Djillali Liabes DE SIDI BEL ABBES, Microbiologie Moléculaire Proteomics et Santé, Sidi Bel Abbès, 205p.

MERZOUG, M. (2017). Etude de bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées à partir de produits alimentaires de terroir algérien. Thèse de doctorat, Université d'Oran, Ecosystème microbiens complexes, Oran, 177p.

MOKDAD, A., LALMI, A., & MESSAI, L. (2020). Evaluation des propriétés probiotiques des bactéries lactiques : isolées à partir d'un fromage artisanal produit localement « Jben ». Mémoire de Master, Université de Larbi Tebessi, Microbiologie appliquée, Tébessa, 112p.

STEVENS, K., SHELDON, B., KLAPES, N., & KLAENHAMMER, T. (1991). Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol* (57), 3613-3615p.

TITIEK, F., ENDANG, S., DJOKO, W., & SLAMET, S. (1996). Antimicrobial substance produced by lactobacillus sp. TGR-2 isolated from Growol. *Indonesian Food Nutr. Prog* , 3 (2), 29-34p.

TODOROV, S., & DICKS, L. (2004). Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. *World J Microbiol Biotechnol* (20), 643–650p.

VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DEVOS, P., KERSTRES, K., & SWINGS, J. (1966). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiology Reviews* , 60 (2), 407–438p.

ZERGOUG, A. (2017). Effet des probiotiques et bactériocines vis-à-vis des pathogènes responsables des infections urinaires. thèse de doctorat, Université ABDELHAMID BENBADIS, Microbiologie appliquée, Mostaganem, 166p.

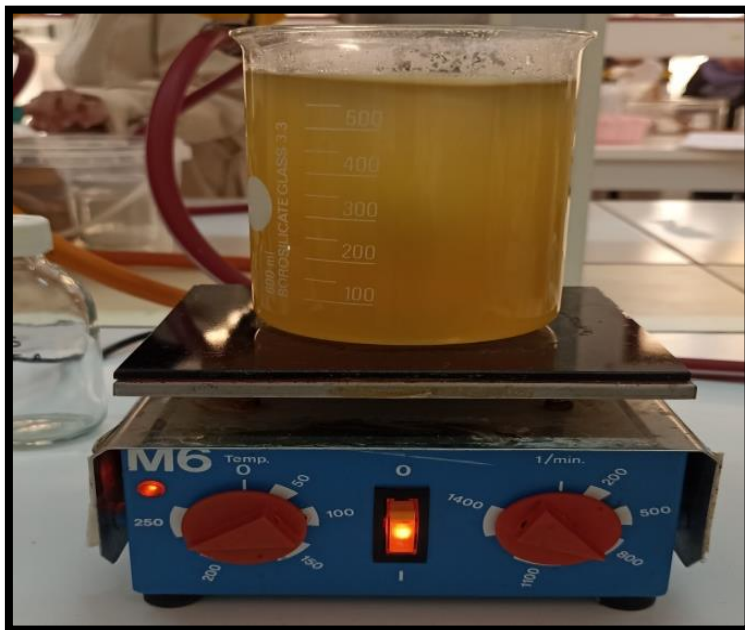
ZOUARI, S., & BENARFA, T. e. (2018). Inhibition des bactéries multi résistantes aux antibiotiques par des bactéries lactiques autochtones isolées de produits laitiers. mémoire de master, Université de Larbi Tébessi, Microbiologie appliquée, Tebessa, 117p.

# Annexe

## Annexe 01 : Préparation des milieux :

- **Milieu MRS gélosé :**

62g de MRS pour 1L d'eau distillé.



**Figure11** : Préparation de milieu MRS gélosé.

- **Milieu MRS bouillon :**

52.25g de MRS pour 1L d'eau distillé.

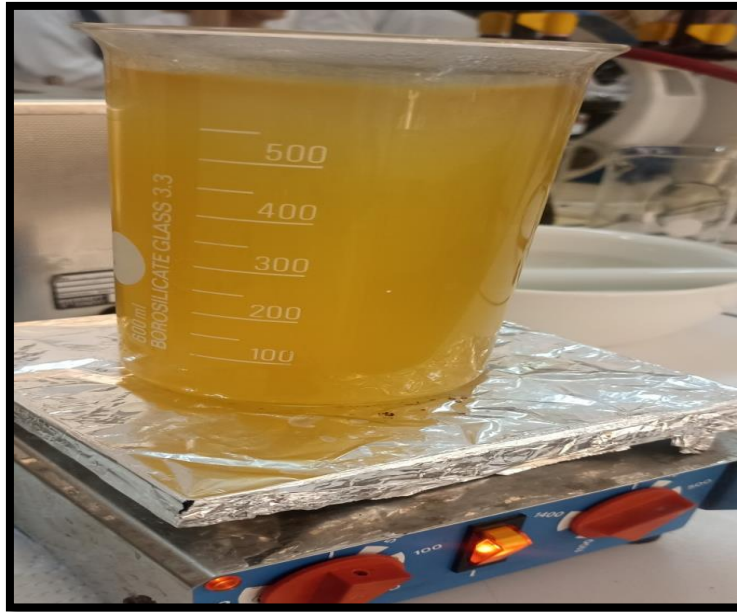
- **Milieu bouillon nutritive :**

13g de MH pour 1L d'eau distillé.



- **Milieu Gélose nutritive :**

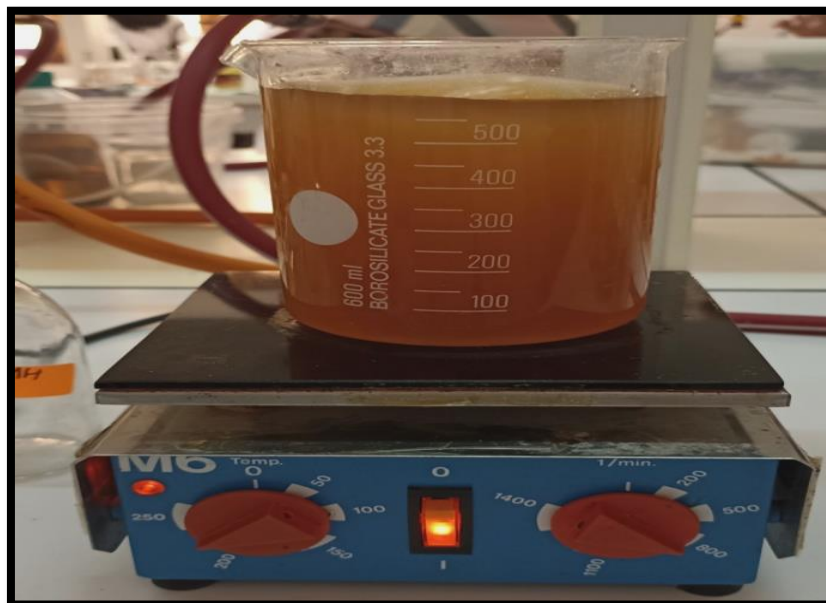
20g de GN pour 1L d'eau distillé.



**Figure12 :** Préparation de milieu GN.

- **Milieu Muller Hinton :**

38g de MH pour 1L d'eau distillé.



**Figure13 :** Préparation de milieu MH.