

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2023

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliqué

Présenté par :

Namane Amel & Guemraoui Mohammed Nabil

*Thème*

**Caractérisation des bactéries lactiques isoler à partir de  
tube digestif de poissons « LATCHA »**

Soutenu le: 25/06 /2024

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>Mr Remini</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>Mme BENBARA .T</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme MADBOUAA</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>

Année Universitaire : 2023/2024

# Remerciements

*Je remercie tout d'abord DIEU le tout puissant de nous avoir donné la volonté, le courage et la patience pour réaliser ce travail.*

*Mes chers parents pour leurs encouragements et leurs sacrifices durant toute notre vie.*

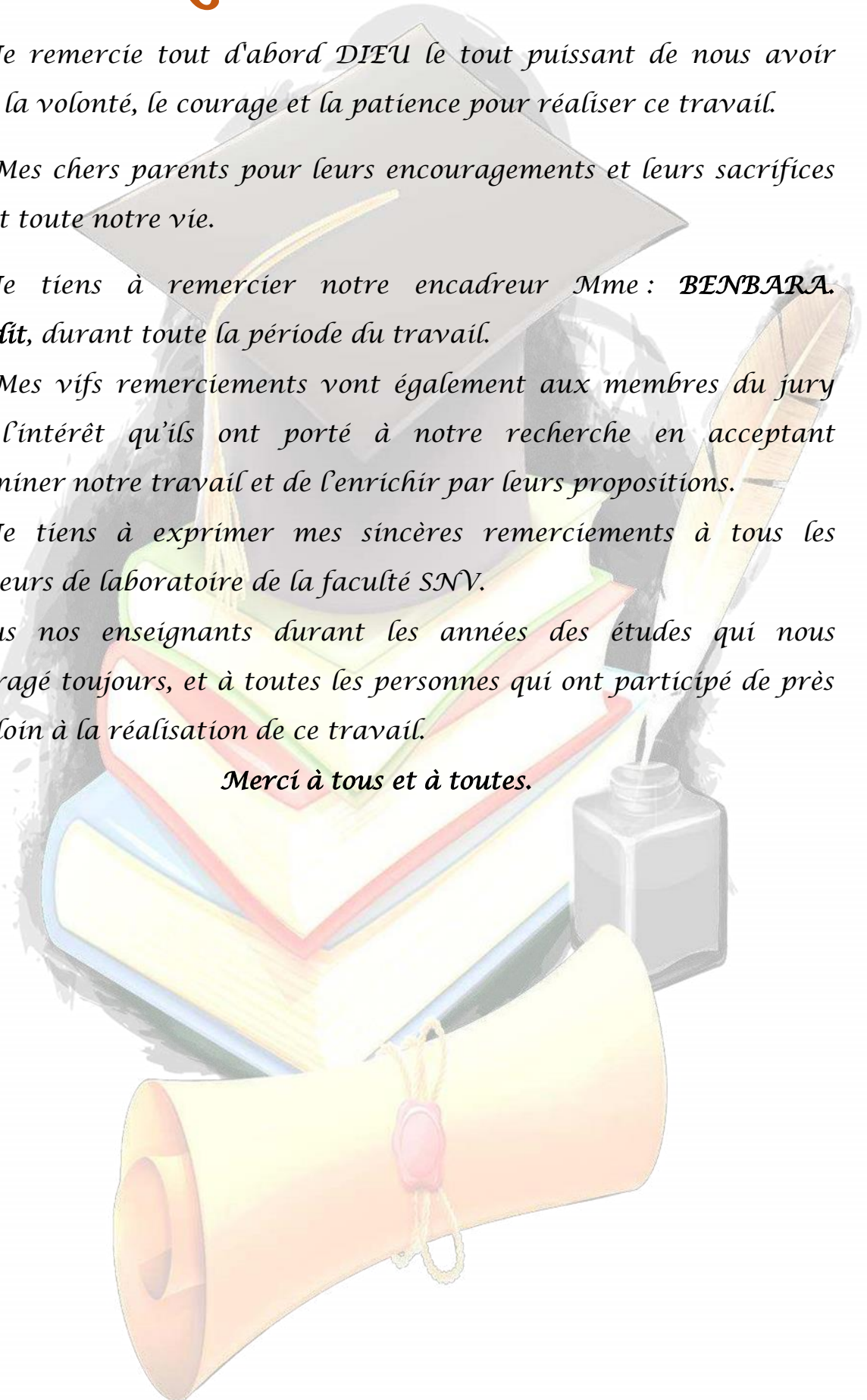
*Je tiens à remercier notre encadreur Mme : **BENBARA Tassadit**, durant toute la période du travail.*

*Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous les ingénieurs de laboratoire de la faculté SNV.*

*À tous nos enseignants durant les années des études qui nous encouragé toujours, et à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

**Merci à tous et à toutes.**



# 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 toutes leurs présences dans ma vie jusqu'au bout,*

*La source de la tendresse, de patience et de générosité, la flamme de mon cœur ma mère "Ouadah Rebeh", qui m'a appris que la patience est le secret du succès.*

*La lumière de mes jours, la source de mes efforts mon père "Moustafa",*

*À mes chers frères Abd el rahim, Ismail, Adam, Youcef pour leurs encouragements et pour leurs aides dans les moments difficiles,*

*Mes amis Lydia, Amina, Moussa, Wassim, qui m'ont soutenu durant toute la durée de réalisation de ce travail, toute ma grande famille surtout ma grand-mère Louiza pour ses prières qui m'ont renforcé, mes chères amies Assia, Lamia, Lydia, qui n'ont pas cessé de m'encourager.*

*Mon binôme Nabil pour le travail que nous avons fourni.*

*À tout ce qui m'aime,*

*A tout ce que j'aime*



# *Dédicaces*

*Merci mon Dieu de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir,  
la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le  
bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire « grâce à Dieu ».*

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de  
tendresse qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma  
mère, l'école de mon enfance qui a éclairé mon chemin et qui m'a  
encourager durant toutes les années d'étude.*

*A la personne la plus proche de mon cœur, mon père*

*A toutes mes adorables sœurs.*

*A mes très cher frères : BILLAL et KHALIL.*

*A tous les anges de la maison : HADIL, SIDALI, SAIF EL DINE,  
RITADJ HEITHEM, WISSAL, MOUETASSIM BI ALLAH, RACHA,  
AMIR, NADINE, ANIS.*

*A mes chères Amies: SAAD, SAMIR, ABD EL NOUR, KARIM,  
HAKIM, KHALED, FATEH, WASSIM, MOUSSA.*

*A toute ma famille et tous mes amis et leurs familles*

*A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer*

*A mon promotrice : Madame BENBARA.*

*Ma binôme Amel pour le travail que nous avons fourni.*

*À tout ce qui m'aime,*

*A tout ce que j'aime.*



## Liste des abréviations

**ADN** : Acide DésoxyriboNucleique

**ARN** : Acide RiboNucleique

**C°** : degré Celsius

**g** : gramme

**KDa** : kilo dalton

**MRS** : De Man Rogosa et Sharp

**NaCl** : Chlorure de sodium

**pH** : potentiel d'Hydrogène

**µl**: microlitre

**µm** : micromètre

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Principaux produit issus de la fermentation des bactéries lactiques. ....	8
<b>Tableau II :</b> Métabolites antimicrobiens de faible masse moléculaire secrétés par les bacteries lactiques.....	11
<b>Tableau III:</b> Matériels et produits .....	15
<b>Tableau IV:</b> Observation macroscopique des souches pathogène sur bouillon et gélose .....	24

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> <i>Streptococcus thermophilus</i> sous microscope électronique.....	3
<b>Figure 2 :</b> <i>Enterococcus sp</i> sous microscope électronique.....	3
<b>Figure 3 :</b> <i>Leuconostoc sp</i> sous microscope électronique.....	4
<b>Figure 4 :</b> <i>Pediococcus</i> sous microscope électronique.....	4
<b>Figure 5 :</b> <i>Bifidobacterium sp</i> sous microscope électronique.....	5
<b>Figure 6 :</b> <i>Lactococcus sp</i> au microscope électronique.....	5
<b>Figure 7 :</b> <i>Lactobacillus acidiphilus</i> sous microscope électronique.....	6
<b>Figure 8 :</b> Mode d'action des bactériocines.....	14
<b>Figure 9 :</b> Enrichissement des souches lactiques.....	16
<b>Figure 10 :</b> Isolement des bactéries lactiques sur gélose MRS.....	16
<b>Figure 11 :</b> Test de spot.....	20
<b>Figure 12:</b> Aspect macroscopique de quelques colonies de souches lactiques isolées sur gélose MRS.....	21
<b>Figure 13 :</b> Resultats de test de catalase.....	22
<b>Figure 14 :</b> Aspect et mode d'association de quelques souches lactiques après coloration de Gram.....	23
<b>Figure 15 :</b> <i>E. coli</i> observée sous microscope optique.....	25
<b>Figure 16 :</b> <i>S. aureus</i> observés sous microscope optique.....	25
<b>Figure 17 :</b> Diamètre de zones d'inhibition vis-à-vis de la souche pathogène <i>Escherichia coli</i> .....	26
<b>Figure 18 :</b> Les zones d'inhibition de quelques souches lactique vis-à-vis de <i>E.coli</i> .....	28
<b>Figure 19:</b> Diamètre de zones d'inhibition vis-à-vis la souche pathogène <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
<b>Figure 20 :</b> Les zones d'inhibition de quelques souches lactiques vis-à-vis de <i>S.aureus</i> .....	29

## Table des matières

INTRODUCTION.....	10
<b>CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES BACTERIES LACTIQUES</b>	
1. HISTORIQUE.....	2
2. DEFINITION .....	2
3. HABITAT .....	2
4. PRINCIPAUX GENRES DES BACTERIES LACTIQUES .....	2
4.1. Genre <i>Streptococcus</i> .....	2
4.2. Genre <i>Enterococcus</i> .....	3
4.3. Genre <i>Leuconostoc</i> .....	3
4.4. Genre <i>Pediococcus/ Tetragenococcus</i> .....	4
4.5. Genre <i>Bifidobacterium</i> .....	5
4.6. Genre <i>Lactococcus</i> .....	5
4.7. Genre <i>Lactobacillus</i> .....	6
5. UTILISATION DES BACTERIES LACTIQUES .....	6
5.1. Fabrication des produits alimentaires.....	6
5.2. Bio-conservation des produits alimentaires .....	7
<b>CHAPITRE II : ACTIVITES ANTIBACTERIENNES DES BACTERIES LACTIQUES</b>	
1. METABOLITES ANTIBACTERIENS NON PEPTIDIQUES .....	10
1.1. Acides organiques .....	10
1.2. Dioxyde de carbone.....	10
1.3. Diacétyl.....	10
1.4. Peroxyde d'hydrogène .....	10
1.5. Reutérine .....	11
2. METABOLITES ANTIMICROBIENS PEPTIDIQUES : LES BACTERIOCINES .....	11
2.1. Définition.....	11
2.2. Classification des bactériocines.....	12
2.3. Mode d'action.....	13
<b>CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODE</b>	
1. MATERIELS ET PRODUITS .....	15
2. METHODOLOGIE .....	16
2.1. REVIVIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES.....	19



2.1.1. Enrichissement des bactéries lactiques.....	16
2.1.2. Isolement des bactéries lactiques .....	16
2.1.3. Purification des souches lactiques .....	17
2.2. Revivification des bactéries pathogènes .....	19
2.2.1.Enrichissement dans bouillon.....	22
2.2.2. Isolement des bactéries pathogènes sur milieu sélectif (gélose) .....	19
2.3.ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE .....	19
2.3.1. Préparation des pré-cultures .....	19
2.3.2. Test de spot .....	20

## CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

1. RESULTATS D'ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES LACTIQUES .....	21
1.1.Résultats d'isolement des souches lactiques .....	21
1.2.RESULTATS DE L'IDENTIFICATION DES SOUCHES LACTIQUES .....	21
1.2.1. Etude macroscopique (la caractérisation visuelle des bactéries lactiques sur un milieu solide).....	21
1.2.3. ETUDE MICROSCOPIQUE DES SOUCHES LACTIQUES .....	22
2.RESULTATS D'IDENTIFICATION DES SOUCHES PATHOGENES .....	23
2.1. Etude macroscopique des bactéries pathogènes .....	24
2.2. Etudes microscopiques des souches pathogènes.....	24
3.MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE .....	25
3.1. L'activité des bactéries lactiques vis-à-vis de la souche <i>Escherichia coli</i> .....	26
3.2.L'ACTIVITE DES BACTERIES LACTIQUES VIS-A-VIS DE LA SOUCHE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> .....	28
CONCLUSION.....	38

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

An orange scroll graphic with a dark orange border and rounded corners. The scroll is unrolled in the center, with the word "INTRODUCTION" written in a black, serif font. The scroll has a slight 3D effect with a darker orange shadow on the right side.

# INTRODUCTION

## Introduction

---

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis plusieurs siècles comme des agents protecteurs, ils sont caractérisent par la synthèse des métabolites antimicrobiennes ; grâce aux ses propriétés les bactéries lactiques ayant des rôle 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* (Ajaó et al., 2021) .

Le poisson, qui constitue une source importante de protéines animales et de vitamines dans de nombreuses régions du monde, se caractérise par sa forte teneur en acides gras insaturés oméga3, connues pour leurs propriétés bénéfiques pour la santé. Il est une source exceptionnelle de diverses vitamines. Plus récemment, l'étude du tube digestif du poisson et de sa composition bactérienne a été développée. Les espèces bactériennes présentes dans ce tractus digestif en grand pourcentage sont les bactéries lactiques suivantes : *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Lactococcus* (Network, 2012).

Les bactéries lactiques jouent un rôle important dans la conservation des aliments, notamment en produisant de l'acide lactique qui diminue le pH. Elles peuvent également produire différents antimicrobiens tels que le peroxyde d'hydrogène, le CO<sub>2</sub>, le diacétyle, l'acétaldéhyde, des acides aminés et des bactériocines (Yang et al.,2012).

L'objectif de cette étude était d'analyser l'action antibactérienne de certaines souches de bactéries lactiques sur des souches pathogènes, telles qu'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Les souches lactiques, isolées à partir de poisson, notamment du poisson Latcha, purifiées et identifiées par des observations macroscopiques et microscopiques, puis l'étude de leur activité antimicrobienne a été réalisée par le test de spot contre deux bactéries pathogènes à savoir : un Gram positif (*S.aureus*) et un Gram négatif (*E.coli*).

Notre mémoire est divisée en deux parties : la première partie théorique présente une vision globale des bactéries lactiques, de leur capacité antibactérienne et de leur rôle dans le processus de conservation biologique. La deuxième partie concerne les expériences menées, les résultats obtenus, ainsi que les analyses et les discussions qui en résultent.



An orange scroll graphic with rounded corners and a slight shadow, containing the chapter title.

# **CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES BACTÉRIES LACTIQUES**

## 1. Historique

Les bactéries lactiques sont de très anciens micro-organismes dont les ancêtres ont peut-être été présents il y a environ 3 milliards d'années (avant l'émergence des cyanobactéries). Depuis plus de 4000 ans, ils ont été employés dans la fermentation des aliments sans avoir une compréhension approfondie de leur utilisation et en cherchant à produire des aliments mieux préservés et de meilleure qualité (Tailliez, 2001;Hogg, 2005).

Comme l'a souligné Elie Metchnikoff au début du XXe siècle, la longévité et la santé des agriculteurs bulgares étaient associées à leur consommation de produits laitiers fermentés (Dortu et Thonart, 2009).

## 2. Définition

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, sous forme de bâtonnet, coque ou coccobacille. elles sont généralement non sporulé, immobiles et microaérophiles ou anaérobies, et ne possèdent ni nitrate réductase, ni catalase (Peterbauer et al., 2011).

Ces bactéries montrent des exigences nutritionnelles complexes en glucides fermentescibles, leur classification est réalisée en fonction de leur morphologie, de leur type de fermentation et de leur température optimale de croissance (Yelnetty et al., 2014).

## 3. Habitat

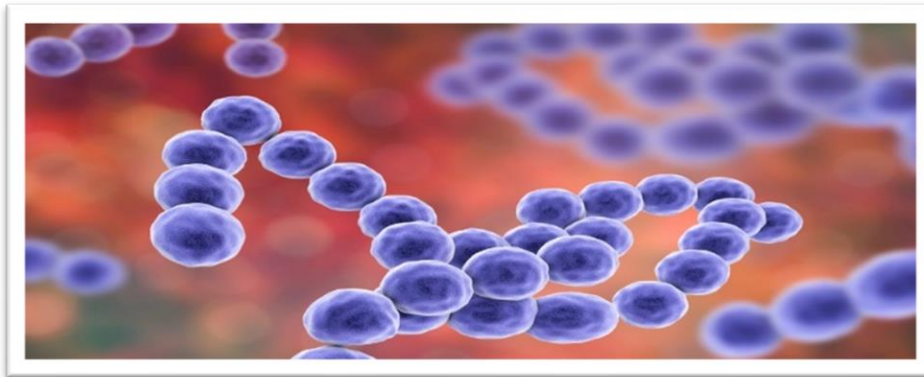
Les bactéries lactiques sont ubiquistes,ellesse retrouvent dans différentes niches écologiques. Elles sont présente sur les plantes (fruits, légumes céréales,...), associées aux surfaces muqueuses de tractus gastro-intestinal, le vagin et la cavité buccale des humains et des animaux, D'autre part, les bactéries lactiques ont été utilisée comme ferment dans les produit laitiers (yaourt, fromage ), les légumes fermentés, la viande fermentée et les produits de poissons fermentés (Zhang et al., 2015 ; Sowmya et al., 2016 ; Duar et al., 2017).

## 4. Principaux genres des bactéries lactiques

### 4.1. Genre *Streptococcus*

Les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont diamètre inférieur à 2 µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique. Leur température optimale de croissance est 37°C, elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH =9.6 , beaucoup d'espèces sont commensales ou des parasites de l'Homme et des animaux et certaines sont

hautement pathogènes, *Streptococcus thermophilus* est la seule espèce utilisée en technologie alimentaire (Patel et Gupta, 2018; Park et al., 2019).

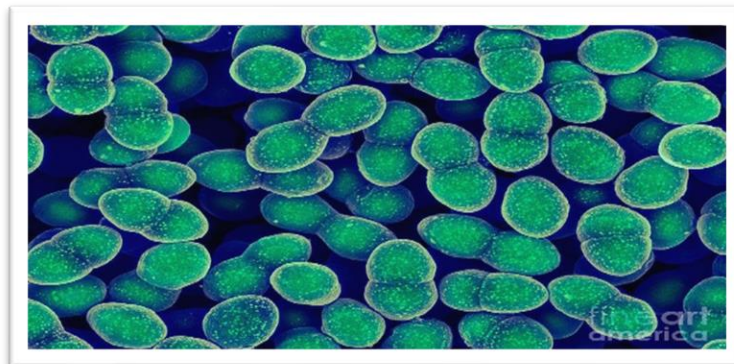


**Figure 1:** *Streptococcus thermophilus* sous microscope électronique (Furet et al., 2004)

#### 4.2. Genre *Enterococcus*

Les espèces de genres *Enterococcus* sont des Cocci à Gram positif, oxydase positif, catalase négatifs, ils sont des anaérobies facultatifs et non mobiles, les cellules sont ovoïdes et se présentent sous forme de cellules isolées, en paire ou en chaînette (Aguilar-Galvez et al., 2012).

Les entérocoques sont des microorganismes mésophiles qui se développent dans une gamme de température allant de 10 à 45°C, avec une température optimale de 35°C (Flahaut et al., 1997).



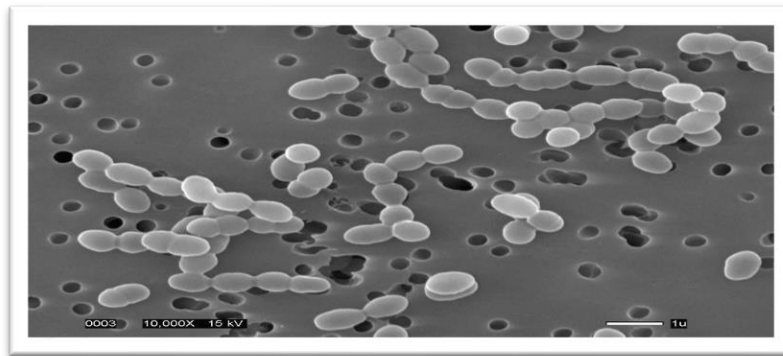
**Figure 2 :** *Enterococcus sp* sous microscope électronique (Wallace et al., 2003).

#### 4.3. Genre *Leuconostoc*

Ce sont des bactéries lactiques qui prennent la forme cocci, hétérofermentaire qui produisent de l'acide lactique, de l'éthanol, et du CO<sub>2</sub>, se trouvent en paire ou en chaînette (Björkroth et al., 2014).

Les espèces de *Leuconostoc* sont des Gram positif, sporulé, aéroanaérobies facultatives, immobiles, chémoorganotrophes qui ne se multiplient pas que dans un milieu additionné à des facteurs de croissance et des acides aminés avec la présence d'un sucre fermentescible.

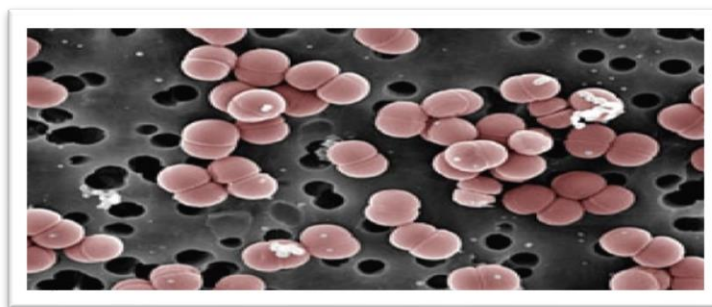
Ce genre de bactérie ne peuvent pas se développés que sous une température entre 25 et 30°C (Jeon et al., 2017).



**Figure 3 :** *Leuconostoc sp* sous microscope électronique (Corrieu et al., 2008).

#### 4.4. Genre *Pediococcus*/ *Tetragenococcus*

Sont des bactéries lactiques à Gram positif, catalase négatif, elles se développent dans des conditions aérobies à microaérophiles, elles sont homofermentaires et produisent de l'acide lactique mais pas de CO<sub>2</sub> à partir de glucose et ne sont pas capable de réduire les nitrates. Les cellules de *Pediococcus* et *tetragenococcus* sont sphériques, immobiles, se présenter séparément ou par paires. Les tetragenocoques se distinguent des pédiocoques principalement par leur haute tolérance au sel (croissance à > 18% Na Cl), et leur capacité à se développer à des pH élevés pH=9 (Dworkin et al., 2006).



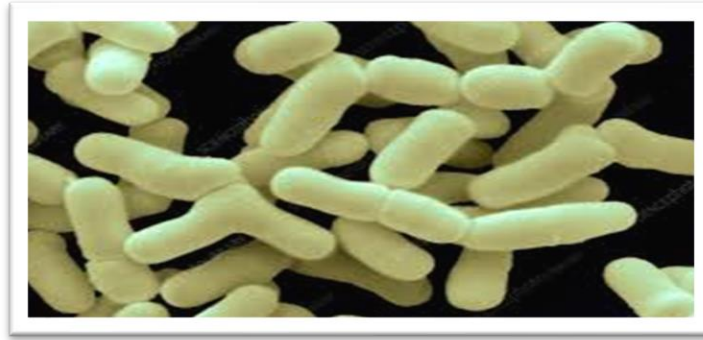
**Figure 4 :** *Pediococcus* sous microscope électronique (Wallace et al., 2003)



#### 4.5. Genre *Bifidobacterium*

Les espèces de *Bifidobacterium* sont des procaryotes à Gram positif, qui vivent naturellement dans le tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux à sang chaud.

Se développent dans des conditions aérobies, à une température optimale de 36 à 38°C et un pH optimal de croissance se situe entre 5 et 6 (Leahy et al., 2005).



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

#### 4.6. Genre *Lactococcus*

*Lactococcus* est une bactérie lactique présente sous forme ovoïde associé en paire ou en chaînettes de longueur variable. Elle est mésophile et a une croissance optimale à 30°C. Elle possède un métabolisme anaérobie facultatif et peut se multiplier en aérobiose. La paroi cellulaire de *Lactococcus* est recouverte d'une couche de polysaccharide lié de manière covalente au peptidoglycane. La structure de ce polysaccharide de paroi diffère selon les souches. Les espèces de *Lactococcus* se trouvent dans la sphère uro-génitale de la femme, ainsi que dans les plantes telles que les céréales, les pommes de terre, les pois, les haricots, etc., est principalement observée dans le lait cru des bovins, qui est largement utilisé comme levain dans les fermentations lactières (Teuber, 2015; Yu et al., 2017).



**Figure 6:** *Lactococcus* sp observée sous microscope électronique (Corrieu et Luquet, 2008).

#### 4.7. Genre *Lactobacillus*

*Lactobacillus* est un genre du phylum des Firmicutes, de la classe des Bacilli et de l'ordre Lactobacillales. Il est le plus grand et le plus varié genre, très répandu dans les milieux végétaux, animaux et humains (dans la flore buccale, l'iléon et le côlon, et dominant dans la flore vaginale). Les bacilles sont regroupés en chaînettes, avec un métabolisme anaérobie facultatif, à Gram positif, non sporulés, avec la catalase, la gélatinase, la nitrate réductase négative (Salveti et al., 2012; Sherid et al., 2016).



**Figure 7 :** *Lactobacillus acidophilus* sous microscope électronique (Corrieu et Luquet, 2008).

### 5. Utilisation des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe des bactéries bénéfiques qui produisent de l'acide lactique comme produit final, elles sont traditionnellement utilisées dans la bio conservation de nombreux aliments et jouent un rôle important dans la fabrication des produits fermentés telle que les produits laitiers, saumurage des légumes et la boulangerie (Diop et al., 2010).

#### 5.1. Fabrication des produits alimentaires

Les bactéries lactiques utilisées dans la fabrication des produits alimentaires sont nombreuses et appartiennent essentiellement au genre *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*.

L'action des bactéries lactiques au cours de la fermentation a été associée tout d'abord à l'élaboration de la texture et de l'arôme du produit final, c'est une fermentation qui est impliquée dans la fabrication des boissons (vin, bières, cidres), des pains, dans la transformation du soja, du chou en choucroute ou de différents végétaux ou fruits (Streit et al., 2007).

### 5.2. Bio-conservation des produits alimentaires

La diversité des bactéries lactiques offre une multitude de souches dotées d'activités inhibitrices envers les bactéries pathogènes ou les processus d'altération, utilisant divers mécanismes tels que la production d'acides organiques, production de peroxyde d'hydrogène, la synthèse de bactériocines et la compétition nutritionnelle (**Makhloufi, 2011**). L'utilisation de bactéries lactiques inhibitrices dans la technologie de bio préservation représente une importance pour les industriels, contribuant à améliorer la qualité et la sécurité microbiologique des produits. Cette approche se présente comme une alternative pour la conservation des produits réfrigérés ayant une durée de vie allant de plusieurs jours à plusieurs semaines (**Hughenoltz et al., 2002; Dortu et Thonart, 2009a**).

**Tableau I :** Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (Stiles et Holzapfel, 1997).

Famille	Genre	Substrat	Exemples
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	Lait	Laits fermentés, yaourts, kéfirs, la plupart des fromages
		Viande	Saucissons secs, jambons secs
		Poissons	Nuoc mam
		Végétaux	Choucroute, olives, yaourts au lait de soja
	Céréales	Pain au levain, bières, huangju	
	<i>Pediococcus</i>	Végétaux	Choucroute, ensilage
		Viande	Saucisses semi-séchées, saucissons secs
		Poissons	Nuoc mam
Céréales		Pain au levain, riz fermenté	
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	Lait	Fromage blancs, a pate molle ou pressée non cuite, kéfirs
	<i>Streptococcus</i>	Lait	Yaourts, laits fermentés, fromage appâte pressée cuite
Enterococcaceae	<i>Tetragenococcus</i>	Végétaux	Sauce de soja, miso
		Poissons	Saumure d'anchois, sauce de poisson, nuoc mam
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	Végétaux	Choucroute, olives, vin, cidre
		Lait	Fromage, kéfirs
	<i>Oenococcus</i>	Végétaux	Vin
Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>	Lait	Laits fermentés

An orange scroll graphic with a white background, featuring a dark orange border and rounded corners. The text is centered on the scroll.

**CHAPITRE II : ACTIVITÉ  
ANTIBACTÉRIENNE DES  
BACTÉRIES LACTIQUES**

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricides et bactériostatiques comme le peroxyde d'hydrogène, les acides organiques, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines (**Bouzaid et al., 2016**).

La production de ces métabolites créer un environnement stressant et inhibe la croissance d'autres microorganismes contaminant et pathogènes (**Bellil et al., 2022**).

### **1. Métabolites antibactériens non peptidiques**

#### **1.1. Acides organiques**

Les bactéries lactiques produisent des acides organiques pendant le processus de fermentation. Les acides produits comprennent: l'acide lactique, l'acide acétique et propionique. Ces derniers aident à empêcher la prolifération des levures et d'autres microorganismes (**Kobilinsky et al., 2007**).

Les acides organiques ont un effet inhibiteur en raison de molécules non dissociées qui se propagent à travers les couches lipidiques des membranes des microorganismes, ce qui entraîne une diminution du pH dans le cytoplasme, ainsi la déstabilisation des cellules (**Zhitnitsky et al., 2017**).

#### **1.2. Dioxyde de carbone**

Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est un métabolite secondaire produit par les bactéries lactiques hétérofermentaires. La présence de cette substance dans l'environnement extérieur entraîne une anaérobiose qui peut être néfaste pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment (**Ammor et al., 2006; Singh, 2018**).

#### **1.3. Diacétyl**

Le diacétyl (C<sub>4</sub> H<sub>6</sub> O<sub>2</sub>) est une substance libérée par le métabolisme du citrate qui donne l'odeur de beurre aux produits laitiers. Le diacétyl empêche probablement la prolifération bactérienne en perturbant les mécanismes régissant l'utilisation de l'arginine (**Léonard, 2013**).

#### **1.4. Peroxyde d'hydrogène**

Les bactéries lactiques sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène. Cette molécule neutre diffuse librement à travers la membrane cellulaire. C'est une molécule très délétère pour la cellule réagissant sur de nombreux composants cellulaires essentiels tels que l'ADN, les protéines et les lipides ce qui entraîne la mort de la cellule (**Van De Guchte et al., 2001; Zalán et al., 2005; Reis et al., 2012**).

Le peroxyde d'hydrogène possède un effet inhibiteur sur la croissance de microorganismes ne possédant aucun système de défense adéquat comme les catalases (Touati, 2000).

### 1.5. Reutéline

*Lactobacillus reuteri*, une espèce hétérofermentaire, responsable de la production de la reutéline dans l'appareil gastrointestinal humain et animal. Il s'agit d'un intermédiaire métabolite qui a un effet antimicrobien contre les champignons, les spores et les virus en inhibant la réplication de l'ADN (Kalam, 2019).

**Tableau II:** Métabolites antimicrobiens de faible masse moléculaire secrétés par les bactéries lactiques (Léonard, 2013).

Composés antimicrobiens	Souches productrices	Spectre microbien
<b>Acide lactique</b>	Toutes les bactéries lactiques	Levures bactéries Gram+/-
<b>Acide acétique</b>	Bactéries lactique hétéro fermentaires	Levures bactéries Gram+/-
<b>Diacétyle</b>	<i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Pedicoccus</i>	Levures bactéries Gram+/-
<b>Peroxyde d'hydrogéné</b>	Toutes les bactéries lactiques	Levures bactéries Gram+/-
<b>Dioxyde de carbone</b>	Les bactéries lactiques Hétéro fermentaires	La plus part des groupes Taxonomiques de micro Organismes
<b>Reutéline</b>	<i>Lactobaccillus reuteri</i>	Les champignons Les virus Les spores

## 2. Métabolites antimicrobiens peptidiques : les bactériocines

### 2.1. Définition

Depuis une dizaine d'années, les bactériocines des bactéries lactiques suscitent un intérêt particulière en raison de son activité antimicrobienne (Cenatiempo et al., 1996).

Les bactériocines sont des protéines et des peptides de petite taille qui ont des propriétés biologiques bactériostatiques ou bactéricides contre des espèces proches de la souche productrice. Il s'agit de peptides antimicrobiens composés de 20 à 60 acides aminés, fabriqués par la voie ribosomique à partir de groupes de gènes ou de clusters contenant une ou plusieurs unités de transcription, déterminées génotypiquement, par les bactéries à Gram positif, négatif et les archées (Zhang *et al.*, 2015; Sidhu et Nehra, 2019).

Les bactériocines sont généralement cationiques, amphiphiles, thermostables, modifiés ou non post-traductionnellement, de masses moléculaires comprises entre 2 et 6 KDa. Elles sont représentées par 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).

## 2.2. Classification des bactériocines

### ➤ Classe I : lantibiotique

Les lantibiotiques sont des peptides de taille inférieure à 5 KDa, qui sont stables à la chaleur et qui renferment des acides aminés soufrés inhabituels formés post-traductionnellement, tels que la lanthionine, la  $\beta$ -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. On peut les classer en deux catégories : la classe qui regroupe des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés, et la classe Ib qui regroupe les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (Téllez Ma, 2018).

### ➤ Classe II : Les peptides non modifiés

Peptides de moins de 10 KDa, qui sont stables à la chaleur et ne renferment pas d'acides aminés altérés. Ils ont des points isolélectriques allant de 8 à 10. Il y a trois sous-classes dans cette classe. La sous-classe IIa des bactériocines renferme entre 27 et 48 acides aminés. Toutes les bactériocines possèdent une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV, ainsi qu'un pont disulfure. De plus, une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile, détermine la spécificité d'action. Toutes ont une capacité à lutter contre *Listeria monocytogenes* (Dridger *et al.*, 2006; Richard *et al.*, 2006).

En outre, il semblerait qu'elle a un pont disulfure qu'il leur donnerait une activité antimicrobienne améliorée, une résistance accrue à l'exposition à des températures élevées et un spectre d'action plus vaste (Eijsink *et al.*, 1998; Fimland *et al.*, 2000).



➤ **Classe III : Les peptides modifié**

Les bactériocines de cette catégorie contiennent une ou plusieurs molécules non protéiques, mais lipidiques et/ou glucidiques, qui sont indispensables à leur activité. (**Dortuet Thonart, 2009**).

**2.3. Mode d'action**

Les bactéries lactiques ont une activité antimicrobienne différente, qu'elle soit bactéricide, ce qui entraîne la mort de la bactérie cible, ou bactériostatique, ce qui inhibe la croissance bactérienne (**Taale et al., 2016**).

La membrane cytoplasmique de la cellule hôte est touchée par les bactériocines en deux étapes : la bactériocine adsorbe à la surface de la cellule, puis forme des pores sur la membrane plasmique de la cellule cible, ce qui entraîne une perméabilité de celle-ci et donc la mort cellulaire (**Bauer et Dicks, 2005; Da Silva Sabo et al., 2014**).

De nombreux antimicrobiens et certaines bactériocines de classe II ont une double action (**Wiedemann et al., 2001**).

- Elles se fixent soit au lipide II, un intermédiaire dans la biosynthèse du peptidoglycane de la cellule bactérienne, ce qui empêche la formation adéquate de la paroi, et entraîne la mort cellulaire (**Breukink et De Kruijff, 2006; Gillor et al., 2008**).

- Elles peuvent utiliser le lipide II comme un moyen d'ancrage afin de favoriser la création de pores. En conséquence, la force motrice du proton est dissipée et des composés intracellulaires sont évacués en dehors des bactéries sensibles, et enfin la disparition des cellules. En outre, la catégorie III, qui englobe les bactériocines à poids moléculaire élevé, présente un mécanisme d'action qui est complètement différent des autres bactériocines. Certaines actions se manifestent par la dégradation des liaisons peptidiques de la membrane cellulaire (**Sun et al., 2018; Nilsen et al., 2003**).

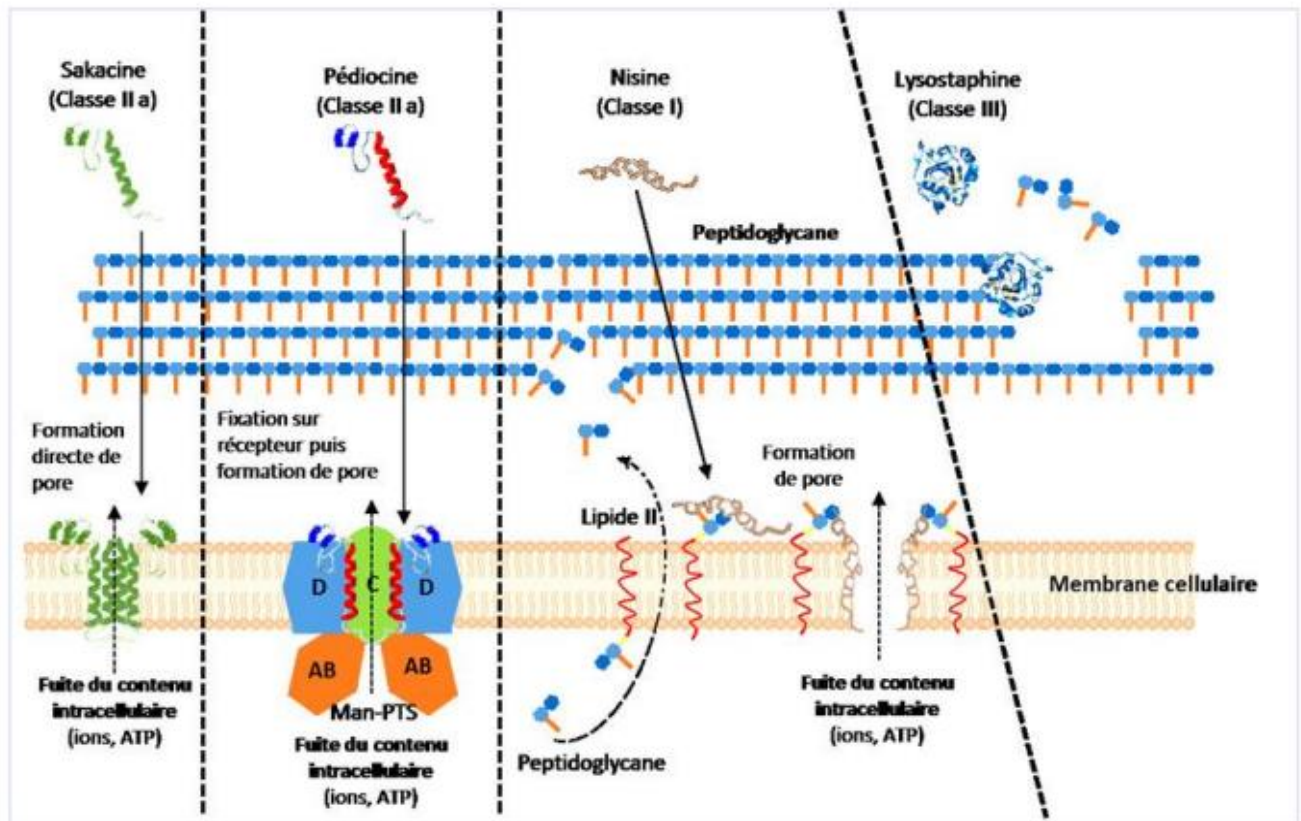


Figure 8 : Mode d'action des bactériocines (Fernandez et al., 2014).

An orange scroll graphic with rounded corners and a slight shadow, containing the chapter title.

## CHAPITRE III : MATÉRIEL ET MÉTHODE

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie générale de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Akli Mohand Oulhadj, à Bouira. Il a été supervisé par Mme BENBARA.T et s'est déroulé de février à Mai 2024. L'objectif principal de ce travail est l'étude de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques d'origine du tube digestif de poisson vis-à-vis des souches pathogènes.

### 1. Matériels et produits

Le matériel de traitement des échantillons utilisé dans les laboratoires microbiologique comprend divers utiles qui sont mentionné dans le tableau III

**Tableau III** : Matériels et produits

Le matériel	Les appareilles et leurs marques	Les produits	Milieu de culture
-La verrerie : tubes à essai, erlenmeyer, flacon de 500ml, boites de Petrie, béchers, pipettes Pasteur -Bec Bunsen -L'eau distillée -Lame de microscope électronique -Les tubes de conservation -Les embouts -Micropipette	-Agitateurs (LabTech (LMS003). -Autoclave (wiseclave (WAC80). -Bain marin (Nuve (210.NB20). -Balance OHAUS (SE402F). -Incubateur (Binder). -Microscope optique (OPTIKA) •Réfrigérateur (IRIS) La plaque chauffante (Stuart) -Centrifugeuse	-Violet de gentiane -Lugol -Rose de fuchsine -Eau physiologique -Eau distillé -éthanol (70 %)	-Bouillon MRS -Gélose MRS -Gélose EMB -Gélose Chapman - Bouillon nutritif -Gélose nutritif

## 2. Méthodologie

### 2.1. Revivification des bactéries lactiques

#### 2.1. Enrichissement des bactéries lactiques

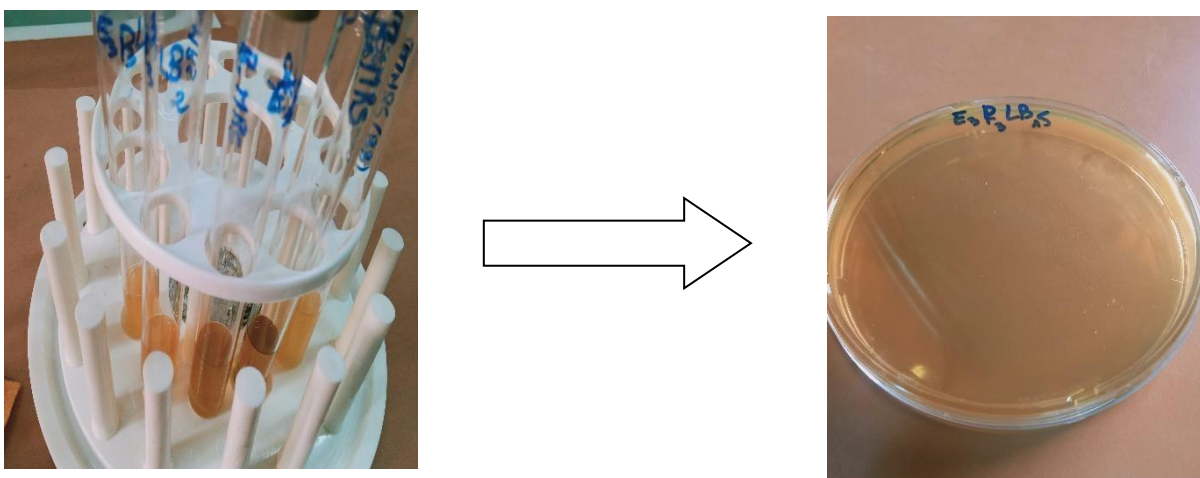
En total, 39 souches non-identifiées appartenant au groupe des bactéries lactiques isolées à partir du tube digestif de poisson « LATCHA » ont été apportées au laboratoire dans un bouillon MRS afin de les repiquer dans des tubes contenant le bouillon MRS, puis les incubés à 37°C pendant 24h pour obtenir des souches jeunes.



**Figure 9:** Enrichissement des souches lactiques

#### 2.2. Isolement des bactéries lactiques

Suite à l'enrichissement, un isolement de ces souches lactiques a été réalisé sur gélose MRS en prélevant une goutte à partir des tubes de bouillon d'enrichissement et en le repiquant par des stries éloignées, en utilisant une pipette Pasteur, sur gélose MRS dans le but d'avoir des colonies séparées. Ces boîtes sont incubées pendant 48h à 37°C.



**Figure 10 :** Isolement des bactéries lactiques sur gélose MRS

### 2.3. Purification des souches lactiques

Le but de la purification des souches microbiennes est d'obtenir des colonies pures, c'est-à-dire des colonies qui présentent une seule souche de micro-organismes, sans contamination d'autres souches. Pour cela, des repiquages successifs sont effectués sur des milieux spécifiques tels que les bouillons et gélose MRS (Milieu de Rogosa-Sharpe). Les milieux liquides offrent des conditions nutritives propices à la multiplication des micro-organismes. Le processus de purification commence en ensemençant les colonies dans des boîtes de Petri contenant un milieu solide, dans ce cas la gélose MRS. Les souches sontensemencées en stries, c'est-à-dire qu'elles sontensemencées à la surface du milieu gélosé à l'aide d'une anse de platine. Les boîtes de Petri sont ensuite incubées à 37°C, pendant une période de 48 heures.

Ce processus de repiquage et d'incubation est répété plusieurs fois, en prélevant et en transférant sélectivement les colonies qui semblent pures, jusqu'à ce que des colonies totalement pures soient obtenus. Cela permet d'éliminer les contaminations éventuelles ou les mélanges de souches, assurant ainsi l'obtention de colonies microbiennes pures et représentatives d'une seule souche.

### 2.4. L'identification phénotypiques des souches lactiques

Cette identification repose sur l'examen des caractéristiques morphologiques (observation à l'œil nu) ainsi que sur le test de la catalase et la coloration de Gram.

#### Etude macroscopique

Les isolats ont été cultivés sur gélose MRS pour permettre l'observation à l'œil nu des caractères morphologiques des colonies, en vue de caractériser leur apparence macroscopique (pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies).

#### Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme de haut poids moléculaire existant chez toutes les bactéries aérobies, elle leur permet de vivre en présence d'oxygène. En plus de la chaîne respiratoire des cytochromes, il existe en effet chez les bactéries aérobies une chaîne accessoire courte, fixant l'hydrogène sur l'oxygène aboutissant à l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) connu pour sa haute toxicité pour les bactéries. La catalase permet la décomposition de l'eau oxygénée selon la réaction : **(Souhila et Ahmed, 2012)**



Il suffit de mettre en contact une colonie avec une goutte d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à 10V pour chercher cette enzyme. Un grand dégagement de gaz indique la présence d'une catalase. La catalase des bactéries lactiques est négative.

### Etude microscopique

#### ➤ Coloration de Gram

Elle repose sur la coloration de Gram qui a été utilisée pour révéler l'aspect microscopique des souches, permettant de distinguer les bactéries Gram-positives, des bactéries Gram-négatives et aussi connaître la forme et le regroupement des cellules. La coloration de Gram a été réalisée selon le protocole décrit par **Joffin et leyrat (2006)**.

1. Placer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame propre et soigneusement préparée.
2. Utiliser une pipette Pasteur pour prélever une petite quantité d'une colonie bactérienne, puis mélanger doucement avec la goutte d'eau physiologique sur la lame.
3. Réaliser des stries en faisant glisser la pipette Pasteur sur la lame pour répartir uniformément les cellules bactériennes.
4. Passer rapidement la lame à la flamme d'un bec Bunsen pour fixer les bactéries à la chaleur.
5. Ajouter le colorant Violet de Gentiane sur les bactéries et laisser agir pendant 1 minute. Ensuite, retirer le colorant en rinçant la lame avec de l'eau.
6. Ajouter le Lugol (solution d'iode) sur les bactéries pendant 1 minute pour réaliser une coloration iodée.
7. Décolorer les bactéries avec l'alcool 30 secondes. Ensuite laver la lame à l'eau pour l'élimination de l'alcool.
8. Ajouter le deuxième colorant, la Fuchsine, sur les bactéries et laisser agir pendant 1 min et laver la lame à l'eau de robinet pour l'élimination de l'excès de colorant.
9. Sécher délicatement la lame à l'aide d'un papier absorbant et appliquer une goutte d'huile à immersion sur la zone où se trouvent les bactéries.

10. Observer la lame microscopique au grossissement x100, pour une visualisation claire et précise des cellules bactériennes.

## 2.2. Revivification des bactéries pathogènes

### 2.2.1. Enrichissement dans de bouillon

Des souches pures de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* ont été repiqué dans le but de les utilisées dans des études ultérieures. La revivification de ces souches a été réalisée dans 5 ml de bouillon nutritif dans des tubes à essai puis nous avons laissé incubé pendant 24h à 37°C.

### 2.2.2. Isolement des bactéries pathogènes sur milieu sélectif (gélose)

A l'aide d'une anse de platine, nous avons ensemencé à partir des tubes les souches pathogènes dans des boîtes de Petri contenant le milieu EMB pour *E.coli* et Chapman pour *Staphylococcus aureus* car ce sont des milieux sélectifs et permettent d'obtenir des colonies pures.

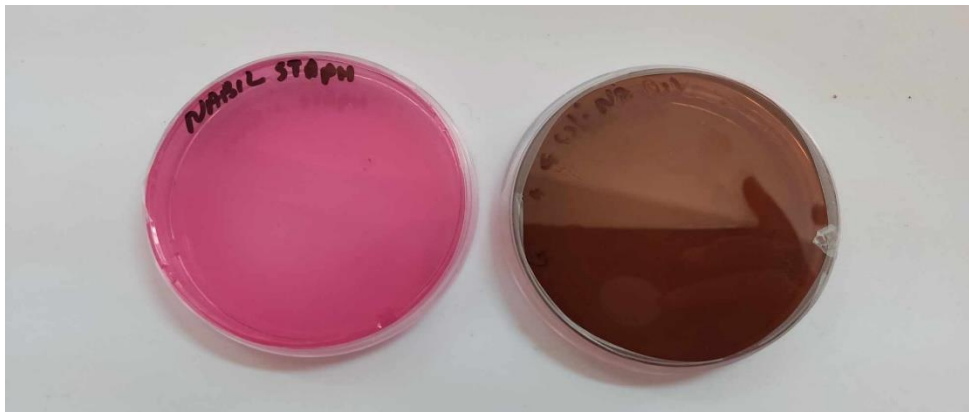


Figure 10 : Isolement des bactéries pathogènes

## 2.3. Etude de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des isolats lactiques a été réalisée pour détecter et sélectionner les souches qui présentent un effet antagoniste contre des souches pathogènes. Cette activité nécessite des cultures de 18 heures de souches lactiques et de souches pathogènes.

### 2.3.1. Préparation des pré-cultures

#### ✚ La culture de 18 heures des souches lactiques

A partir des boîtes de gélose MRS contenant des colonies de souches lactiques en phase de croissance, quelques colonies ont été prélevées (3 à 4 colonies).



Les échantillons de colonies recueillies ont été met dans des tubes à essai qui renfermaient 5 ml de bouillon MRS. Les tubes ont été ensuite incubés à une température de 37°C pendant 18 heures.

#### ✚ La culture de 18 heures des souches pathogènes

A partir des boîtes de différentes géloses spécifiques pour chaque type des souches pathogènes en phase de croissance, deux colonies ont été prélevées de chaque boîte à l'aide d'une anse de platine. Les colonies ainsi collectées ont été introduites dans des tubes à essai renfermant 5 ml de bouillon nutritif à un pH de 7. Les tubes contiennent les colonies pathogènes dans le bouillon nutritif sont incubés à une température de 37°C pendant 18 heures.

#### 2.3.2. Test de spot

Le test de spot consiste à prélevé 5 µl des cultures des bactéries lactiques qui sont posé sous forme de spot sur une gélose MRS sèche. Cinq spots sont réalisés par boîte. Les boîtes contenant les spots sont laissées sécher à moitié ouvertes près d'un bec Bunsen pendant 30 minutes. Ensuite, les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37°C.

Après l'incubation, 10 ml de gélose nutritive molle (0,75% d'agar), contenant la souche pathogène, sont versés sur les boîtes (9 ml de gélose nutritive molle estensemencée avec 1 ml de pré-cultures de 18 heures de chaque agent pathogène (*E. coli*, *S. aureus*) (Fernandez et al., 2007).

Après une période d'incubation de 24 heures à 37°C, les boîtes sont inspectées en vue de repérer les zones d'inhibition autour des points d'application. On mesure le diamètre des zones d'inhibition pour évaluer l'efficacité inhibitrice des souches lactiques sur les souches pathogènes (Schellinger, 1989).

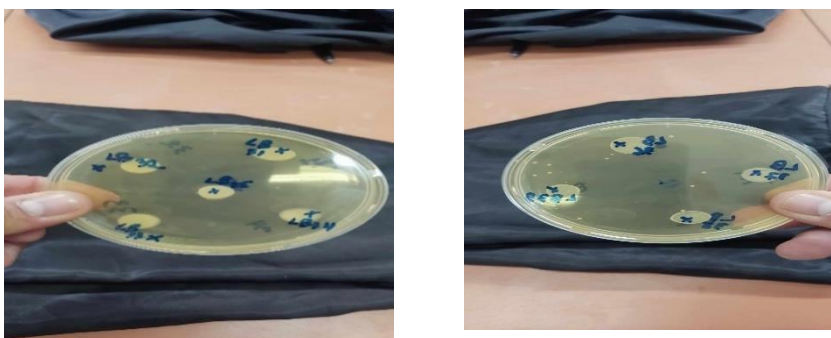


Figure 11 : Test de spot



**CHAPITRE IV**  
**RÉSULTATS ET DISCUSSION**

## 1. Résultats d'isolement et identification des souches lactiques

### 1.1. Isolement des souches lactiques

Un total de 39 souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir du tube digestif des poissons. Ces cultures ont été obtenues en les incubant à 37 °C pendant 48 heures sur gélose MRS. D'après nos résultats, 34 des souches lactiques présentaient des caractéristiques de petites tailles et une couleur blanchâtre (**Annexe 06**), et la présence des résultats de cinq boîtes aucun croissance.

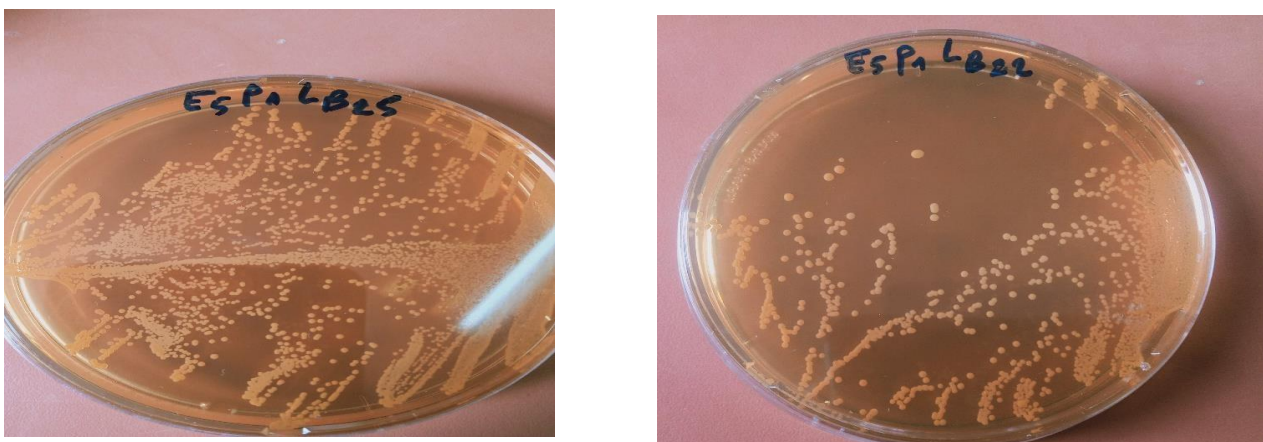
Les colonies de bactéries lactiques isolées présentent une forme circulaire, une élévation convexe et un bord entier. Elles se caractérisent par deux couleurs, à savoir blanc et crémeuse.

### 1.2. Résultats de l'identification des souches lactiques

#### 1.2.1. Etude macroscopique (la caractérisation visuelle des bactéries lactiques sur un milieu solide)

Les colonies obtenus sur gélose MRS sont examinées à l'œil nu pour déterminer la forme, la taille, l'aspect et la couleur des colonies. Dans notre cas, les colonies ont montré les caractéristiques suivantes : elles étaient de petite taille, de forme circulaire ou lenticulaire, avec une couleur blanchâtre. De plus, le contour des colonies pouvait être régulier (**Annexe 06**)

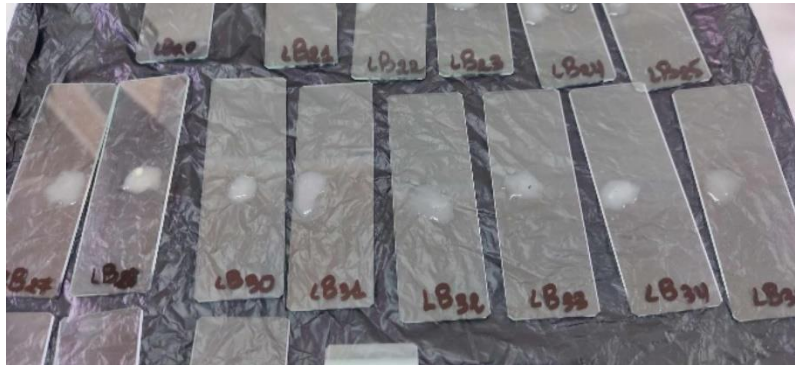
La figure 12 montre l'aspect macroscopique des colonies de bactéries lactiques cultivées sur gélose MRS



**Figure 12:** Aspect macroscopique de quelques colonies de souches lactiques isolées sur gélose MRS

### 1.2.2. Résultats de test de catalase

D'après les résultats, présentés dans la figure 14, ont révélé l'absence de dégagement de gaz ( $O_2$ ), confirmant ainsi que les isolats lactiques étaient catalase négative (**Annexe 08**).

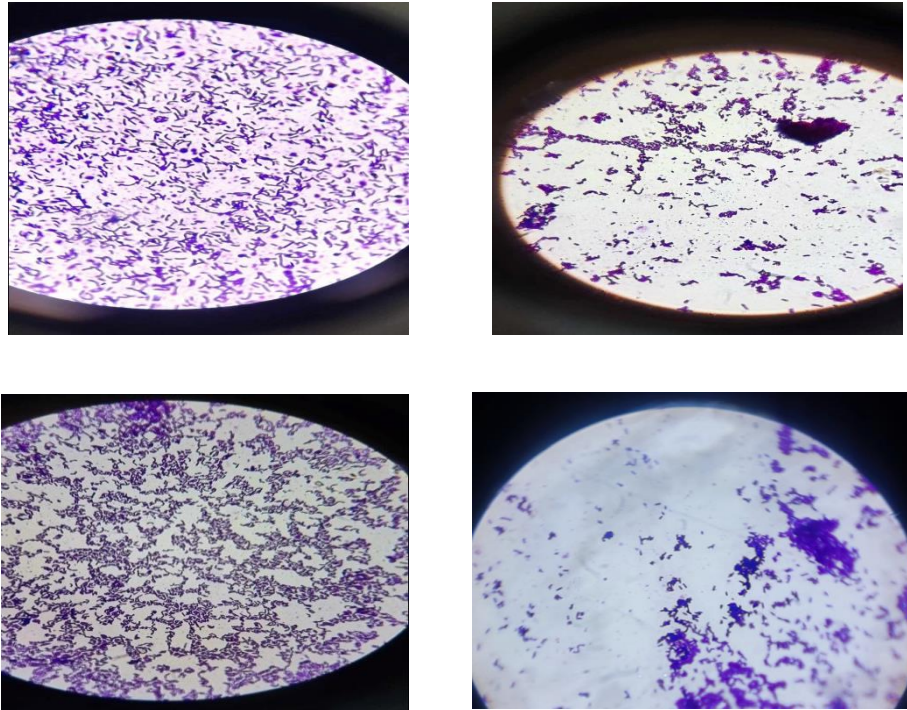


**Figure 13** : Résultats de test de catalase

### 1.2.3. Etude microscopique des souches lactiques

Les 34 isolats ont subi une coloration de Gram. À la suite de l'observation microscopique, il a été remarqué que les colonies isolées et purifiées, présentaient une coloration Gram positive(+) et présentant la forme de bacilles avec diverses associations (tétrades, diplocoques, chaînes etc...)(**Annexe 07**).

Toutes les bactéries isolées ont été identifiées comme étant Gram positives car leur paroi cellulaire est restée violette après la coloration de Gram. Cela indique qu'elles appartiennent aux bactéries lactiques. De plus, la forme prédominante des cellules était celle de coccobacilles et elles étaient négatives pour la catalase, ce qui correspond aux caractéristiques typiques des bactéries lactiques (**Fothergill, 2012**).



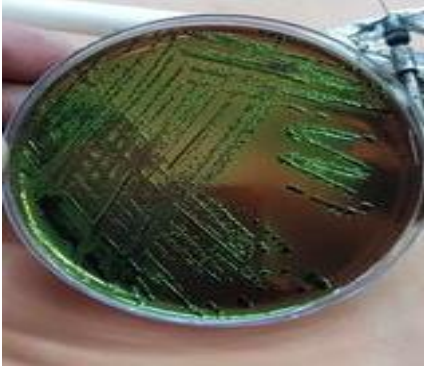
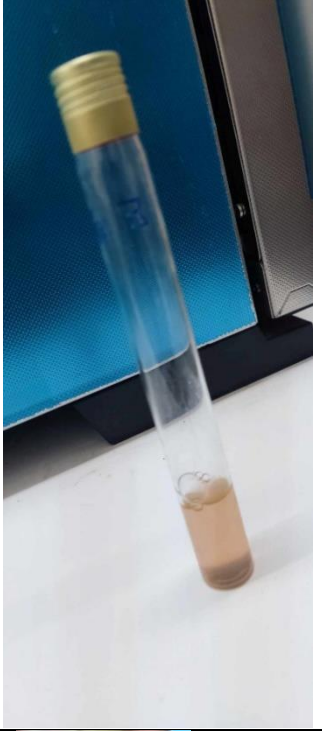


**Figure 14** : Aspect et mode d'association de quelques souches lactiques après coloration de Gram.

## 2. Résultats d'identification des souches pathogènes

D'après nos résultats, les bactéries pathogènes que nous avons identifiées sont des souches qui appartiennent aux deux espèces suivant : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

2.1. Etude macroscopique des bactéries pathogènes

Tableau IV : Observation macroscopique des souches pathogène sur bouillon et gélose

Souches Pathogènes	Gélose	Observation macroscopique sur Gélose	Bouillon	L'observation macroscopique sur bouillon
<i>E.coli</i>	<p><b>EMB :</b> Des colonies Vertes à éclat métallique.</p>		<p><b>Bouillon Nutritif :</b> Présence de trouble.</p>	
<i>S.aureus</i>	<p><b>Chapman :</b> Des colonies De couleur jaune et une coloration Jaune du Milieu.</p>		<p><b>Bouillon Nutritif :</b> Présence de trouble.</p>	

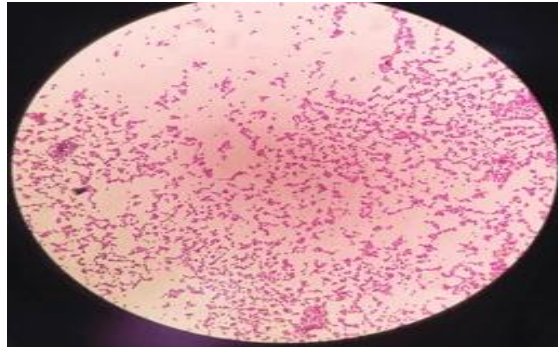
2.2. Etudes microscopiques des souches pathogènes

Lors de la réalisation de la coloration de Gram, certaines souches purifiées ont montré une apparence de bacilles roses. Lorsque les cellules colorées ont été exposées à l'alcool, ce dernier a dissous les lipides de leur paroi cellulaire, rendant celle-ci perméable. En

conséquence, la fuchsine a pénétré à l'intérieur des cellules, remplaçant les phospholipides solubilisés. Ainsi, les cellules ont pris une teinte rose. Ces résultats indiquent que ces bactéries sont de type Gram négatif.

#### ❖ *Escherichia coli*

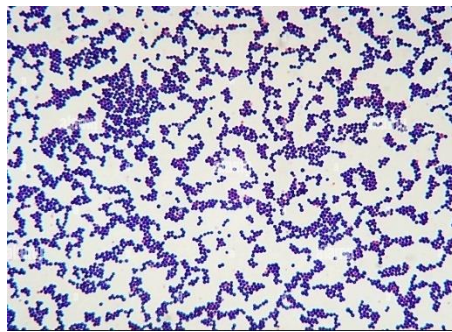
L'observation microscopique et la coloration de Gram d'*E. coli* révèlent la présence de cellules roses, prenant la forme de bâtonnets et étant dispersées à Gram négatif.



**Figure 15:** *E. coli* observée sous microscope optique (grossissement 100).

#### ❖ *Staphylococcus aureus*

L'observation microscopique et la coloration de Gram de *Staphylococcus aureus* révèlent qu'ils apparaissent sous la forme de cocci à Gram positif, regroupés en amas



**Figure 16 :** *S. aureus* observés sous microscope optique (grossissement 100)

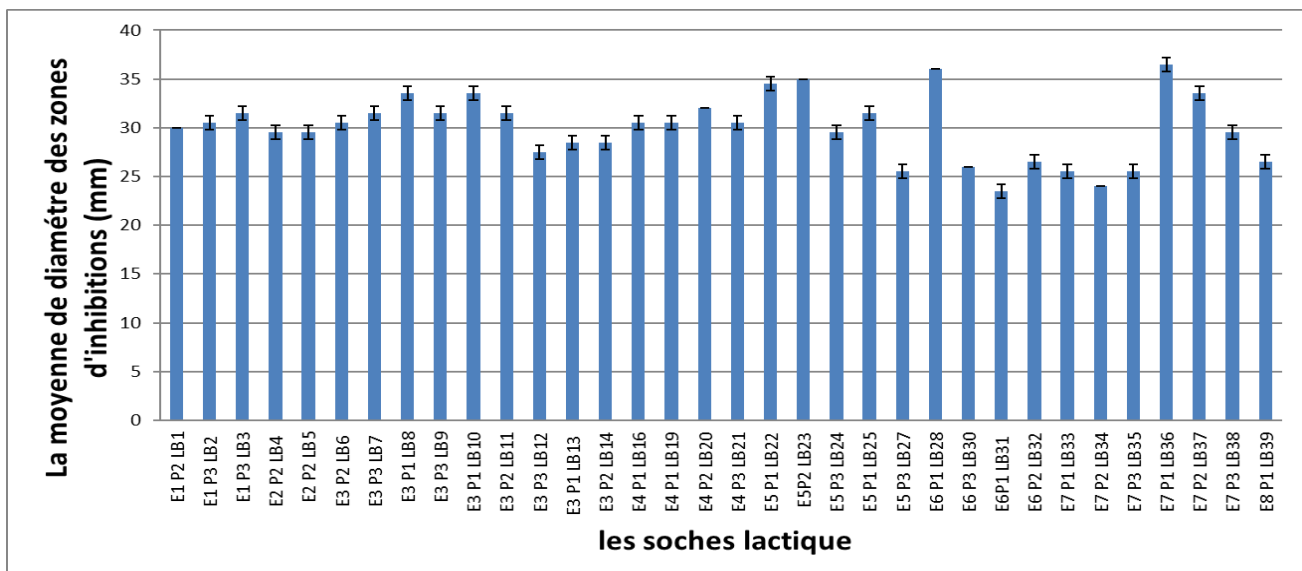
### 2.3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

Les bactéries lactiques jouent un rôle crucial dans la bio-conservation des aliments et la biothérapie en inhibant les bactéries pathogènes et altérantes (Dortu et al., 2009). Cette inhibition résulte soit de la diminution du pH due à la production d'acides organiques, ou à la production de divers métabolites tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, le dioxyde de carbone, la reutérine et les bactériocines (Albano et al., 2007).

Dans notre étude nous avons procédé à l'évaluation de l'effet antagoniste de 34 isolats de bactéries lactiques en employant la méthode directe (connue sous le nom de méthode du spot) contre deux souches cibles : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Cette activité s'est révélée par l'apparition de zones transparentes dotée de frontières nettement délimitées autour des souches lactiques appliquées.

Les résultats indiquent que tous les isolats lactiques étudiés ont un effet inhibiteur sur les deux souches pathogènes utilisées, bien que l'intensité de l'effet puisse varier selon la souche. Nous avons procédé à la mesure des diamètres des zones d'inhibition entourant les points d'application (spots) et calculé leurs moyennes et leurs écarts-types. Toutefois, certaines souches lactiques ont démontré une activité antibactérienne plus prononcée que d'autres souches. Nous avons identifié une activité antibactérienne contre *E. coli*, *S. aureus*. On considère qu'une activité inhibitrice est positive lorsqu'elle répond aux critères établis par **Schillinger et al., (1989)**, supérieur à 1 mm. Les résultats de nos expériences ont donc montré que les diamètres des zones d'activité inhibitrice varient de 30 mm à 50 mm pour *E. coli*, de 16 mm à 72 mm pour *S. aureus*.

#### 1.4.1. Résultats de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis de la souche *Escherichia coli* ATCC 8739



**Figure 17** : L'activité antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis de la souche pathogène *Escherichia coli*



Selon les résultats de test de spot, il est notable que toutes les souches de bactéries lactiques manifestent la capacité d'inhiber la croissance d'*E. coli*, tandis que d'autres peuvent afficher un diamètre de zone d'activité inhibitrice atteignant **38mm**.

Plus spécifiquement, il a été remarqué que les souches lactiques **E5P1LB23**, **E5P1LB30** et **E5P1LB36** démontrent une activité antibactérienne particulièrement significative, avec des diamètres de zones d'inhibition de **32.5mm** et **37.5mm** respectivement. En contraire, les souches **E7P1LB14**, **E5P3LB27**, **E7P2LB31** et **E7P2LB34** présentent une activité moins marquée, avec des diamètres de zones d'inhibition mesurant entre **23.5mm** et **26mm**. L'étude réalisée par **Liasi et al., (2009)**, sur l'inhibition de la croissance d'*E. coli* a montré que cette dernière a été inhibée avec un diamètre de zone d'inhibition entre **10 mm** et **18 mm**. De même, les travaux de **Ilyanie et al., (2022)** évoquent une inhibition de la croissance d'*E. coli* avec des zones d'inhibition allant de 7 mm à 14 mm de diamètre. Par conséquent, ces constatations sont également inférieures à nos observations actuelles.

Nos résultats sont similaires à celle trouvé par **Hadef et al., (2012)** qui ont montré que les souches lactiques ont montré une activité inhibitrice, la plus remarquable vis-à-vis à des espèces de *Ln. mesenteroides ssp. cremoris* C20, *Lc. lactis ssp. cremoris* C24 et *Lc. lactis ssp. lactis* C26, *S.aureus*, *E.coli*

De même, **Mami et al., (2008)** ont remarqué que les souches lactiques *Lactobacillus spp* et *Lactococcus spp* inhibent les souches pathogènes avec des diamètres qui varient entre 10 mm et 35 mm.

**Kumaret et al., (2015)** ont observé que l'activité inhibitrice la plus élevée a été observée contre *E. coli* (14-17 mm). Malgré la présence de zones d'inhibition moyenne (10-15 mm) contre *s. aureus* chez tous les isolants par rapport à d'autres agents pathogènes.

Les résultats d'inhibition d'*E. coli* sont illustrés dans la figure ci-dessous :

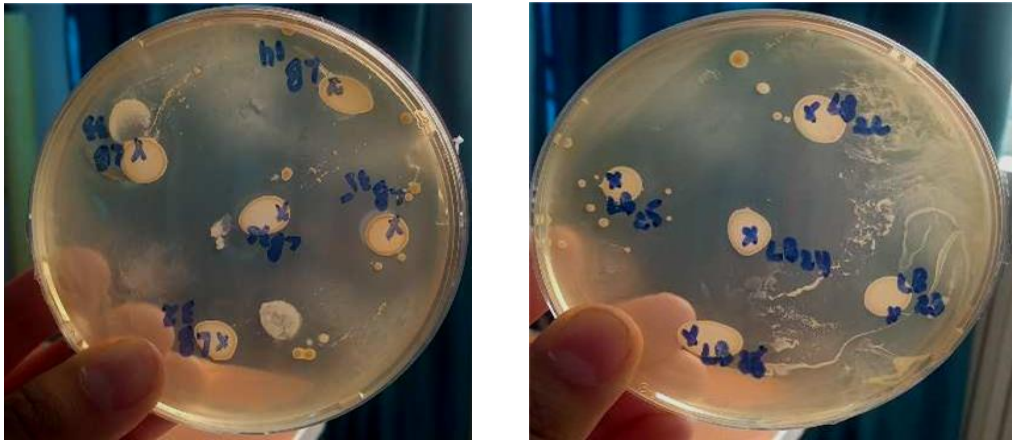
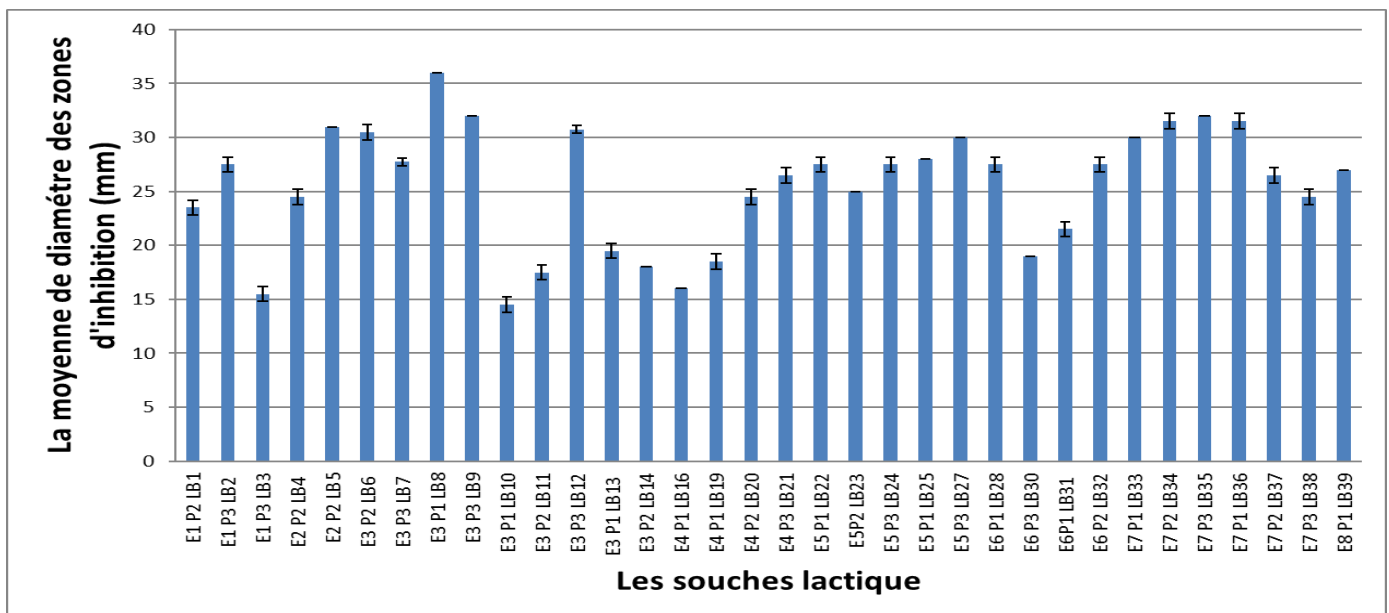


Figure 18 : Les zones d’inhibition de quelques souches lactiques vis-à-vis d’*E.coli*



2.3.2. Résultats de l’activité antibactérienne des bactéries lactiques vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Figure 19: diamètres de zones d’inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis la souche pathogène *Staphylococcus aureus*

Les bactéries lactiques présentent une activité antibactérienne significative contre *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres de zones d’inhibition variant de **13.5mm à 34mm**

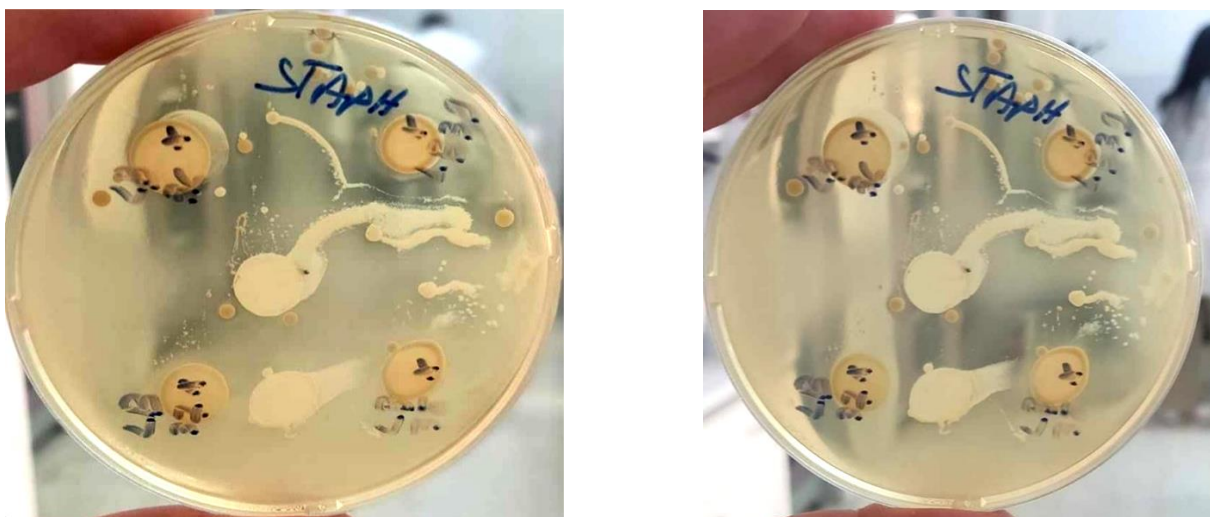
Quatre souches lactiques en particulier **E3P2LB6**, **E7P3LB35**, **E3P2LB8**, et **E7P1LB36** présentent l'activité la plus marquée, affichant des diamètres de zones d'inhibition se situant entre **34 mm et 34.5 mm**.

Selon l'étude réalisée par **Liasi et al., (2009)**, la croissance de *S. aureus* est freinée avec une zone d'inhibition variant entre 15mm et 18 mm de diamètre. Nos résultats, en comparaison, dépassent largement les valeurs indiquées dans cette étude. Une autre recherche menée par **Ilyanie et al., (2022)** a démontré que la croissance de *S. aureus* est inhibée avec des zones d'inhibition se situant entre 8 et 12 mm de diamètre. Par conséquent, ces conclusions sont également inférieures à nos propres constatations.

Les souches lactiques E7P1LB36, E7P3LB35, E7P1LB6, ont un pouvoir d'inhibition important sur les souches indicatrices, La souche *S.aureus* a un pouvoir d'inhibition entre 34 mm et 34.5mm et la souche *E.coli* a un pouvoir d'inhibition entre 32.5mm et 37.5mm.

Nos résultats sont similaires a ceux de **Belarbi et al., (2011)** qui ont trouvé que la majorité des souches lactiques présentent un potentiel à inhiber la croissance des bactéries ciblées.

Les résultats d'inhibition de *S. aureus* sont illustrés dans la figure ci-dessous :



**Figure 20** : Les zones d'inhibition de quelques souches lactique vis-à-vis de *S.aureus*

Il est observé que toutes les souches lactiques utilisées ont inhibé les bactéries pathogènes cibles testées. En ce qui concerne les zones d'inhibition, ces zones d'inhibition sont plus grandes que celles qui ont été découvertes auparavant. Il est observé que certaines souches lactiques présentent un spectre d'inhibition plus étendu. En ce qui concerne les

souches lactiques, il est évident que les souches *Pediococcus* et *Lactococcus* sont les plus efficaces, avec les meilleures zones d'inhibition contre les souches indicatrices utilisées telles que *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* E, *E.coli*, *Salmonella typhimurium* et *Klebsiella pneumoniae*.

D'après l'étude menée par **Balarbi et al., (2011)**, les souches *Lactococcus lactis*, *Pediococcus* L1 et L2 présentent un large spectre d'activité par rapport aux autres souches de lactocoques isolées. Elles ont un diamètre d'inhibition de 8 mm et 18 mm contre *E. coli*, tandis que leur diamètre d'inhibition est de 6 mm et 10 mm contre *S. aureus*. Selon **Gyu et Hyung, (2006)**, il a été constaté que parmi les souches isolées à partir de viandes, les souches *L. mesenteroides* ont des zones d'inhibition contre *S. aureus* mesurant 22 mm de diamètre.

Selon **Guessas et al., (2007)**, 125 souches de *Lactococcus* ont été identifiées, dont 13 étaient capables d'inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*. De plus, ils ont démontré que les souches de *Leuconostoc* isolées à partir de « Genestoso », un fromage fabriqué à partir d'un mélange de lait de chèvre, de vache et de brebis en Espagne, avaient une activité inhibitrice contre *S. aureus* et *L. monocytogenes*. En ce qui concerne *St. thermophilus*, il a la capacité d'inhiber toutes les souches pathogènes avec un diamètre d'inhibition compris entre 10 et 16 mm. Selon **Loumani et al. (2010)**, il a été démontré que *St. thermophilus* produit des substances inhibitrices contre *E.coli* avec un diamètre de 18 mm.

On peut expliquer l'activité antibactérienne observée par la synthèse de différentes substances antimicrobiennes, telles que des métabolites et des bactériocines. L'efficacité antibactérienne des souches lactiques est probablement due à la production de différents agents antibactériens par les souches lactiques. L'acide lactique agit comme un inhibiteur en acidifiant l'environnement, ce qui permet de limiter la prolifération de diverses bactéries. En même temps, le diacétyl, connu pour sa capacité d'inhibition, participe aussi à cette action. (**Armas et al., 2017 ; Reuben et al., 2020**).

La libération de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par les souches lactiques a un effet inhibiteur sur les bactéries qui ne possèdent pas de mécanismes de protection contre le stress oxydatif. De nombreuses études ont en effet démontré que les bactéries lactiques ont une activité inhibitrice envers les bactéries pathogènes par la libération de substances protéiques appelées bactériocines. Ces bactériocines sont essentielles pour la capacité des bactéries

lactiques à se protéger contre les souches pathogènes et à leur capacité de se protéger biologiquement dans différents milieux alimentaires et intestinaux (**souhila et al., 2012**).

L'action bactéricide des souches lactiques peut être attribuée à différents facteurs, tels que la concurrence pour les ressources nutritionnelles et l'espace, ainsi qu'à la synthèse d'un ensemble de métabolites antimicrobiens (**Leonard, 2013**). Les acides organiques (notamment l'acide lactique), le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle, la reutérine et les bactériocines sont parmi ces métabolites.

Les bactéries lactiques produisent principalement de l'acide lactique, un métabolite antibactérien qui agit en altérant le pH du milieu, ce qui peut avoir un impact sur les bactéries pathogènes comme *Staphylococcus aureus*. D'après les résultats de **Suskovic et al., (2010)**, l'acide lactique entraîne une transformation par acidification. Elle a principalement une action inhibitrice en pénétrant la membrane cellulaire et en se diffusant dans le cytosol, ce qui le rend plus acide et perturbe les fonctions métaboliques essentielles. L'acide lactique a des effets toxiques tels que la diminution du pH intracellulaire et la modification du potentiel membranaire.

# Conclusion



## Conclusion

---

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 .

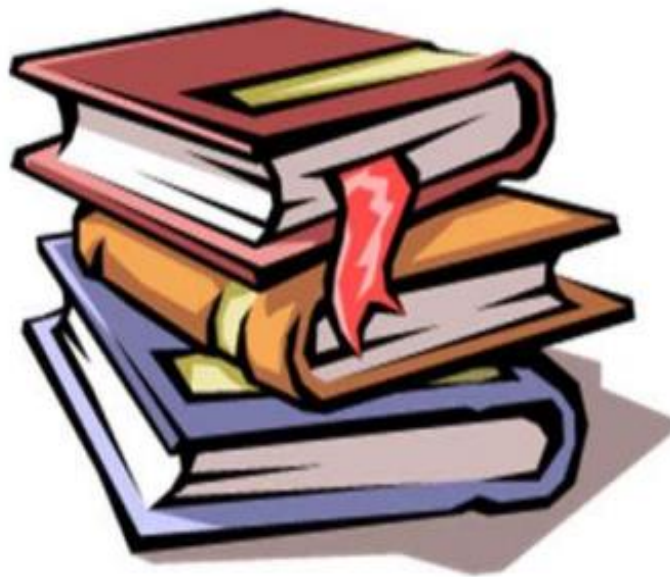
Au cours de cette recherche, des souches de bactéries lactiques ont été extraites à partir du tractus digestif de poisson. En utilisant des méthodes de culture sur milieu liquide et solide. Par la suite, nous avons soumis ces isolats à des tests biochimiques et microbiologiques. Nous avons également évalué leur capacité antagoniste envers divers microorganismes pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, en utilisant la méthode de spot.

L'étude de l'activité antibactérienne par la méthode du spot des 34 souches lactiques contre deux souches pathogènes a été réalisée a montré des diamètres d'inhibition contre *E. coli* avec **24mm-38mm** et le meilleur diamètre est obtenus avec les trois souches **E5P1LB23, E5P1LB30 et E5P1LB36**. Concernant *S.aureus* les diamètres sont entre **14mm- 34mm** et le meilleur diamètre est obtenu avec la souche **E3P2LB6, E7P3LB35, E3P2LB8 et E7P1LB36**.

### **Les perspectives de cette étude sont les suivants :**

- . Identification biochimique et moléculaire des souches lactiques.
- . Tester l'activité contre d'autres souches pathogènes,
- . Identification et connaître la nature exacte de la substance inhibitrice.

*Références  
bibliographiques*





## Références bibliographiques

### -A-

- **Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1- Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17: 454-461.
- **Armas F, Camperio C, 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.
- **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.
- **Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silver, J., Carneiro, L., Magalhães, R. (2009).** Evaluation of bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilacticias* a biopreservative for « Alheira », a fermented meat sausage. *Food Control*, 20: 764-770.
- **Aguilar-Galvez, A., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., Campos, D., Thonart, P., (2012).** Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnol Agron Soc Env*, p 16.
- **Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I., (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control* 17, 454–461.
- **Agustina, A., Saptiani, G., Hardi, E. H. (2022).** Isolation and identification of potential lactic acid bacteria as probiotics from the intestines of repang fish (*Puntiplites waandersi*). *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 15(1), 24-33.

### -B-

- **Belarbi, F., (2011).** Isolement et sélection de bactéries lactiques productrice des métabolites antimicrobienne. Mémoire de magister Université d'Oran Es-Senia.
- **Bouabellou H et Bouzzenir M, (2018).** Etude du pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques du lait et du yaourt vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes. Université des Frères Mentouri, Constantine. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 40p

- **Bellil, Y., Bellil, W.C., Benabbou, T.A., Benmechernene, Z., Kihal, M., (2022).** Valorisation des bactéries lactiques bioactives naturellement présentes dans les légumes fermentés 3, p 23-28.
- **Björkroth, J., Dicks, L.M.T., Endo, A., H.Holzapfel, W., (2014).** The genus *Leuconostoc*, in: Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B. (Eds.), Lactic Acid Bacteria. Wiley, pp. 391–404.
- **Bouzaid, M., Chatoui, R., Latrache, H., Hasib, A., (2016).** Activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées de viande hachée de dromadaire et du lait cru de vache (maroc) 10, p 1-12.
- **Breukink, E., De Kruijff, B., (2006).** Lipid II as a target for antibiotics. Nat. Rev. Drug Discov. 5, 321–323. <https://doi.org/10.1038/nrd2004>

-C-

- **Cenatiempo, Y., Berjeaud, J.M., Biet, F., Fremaux, C., Hechard, Y., Robichon, D., (1996).** Bactériocines de bactéries lactiques : données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques. Le Lait 76, 169–177.
- **Corrieu G., Luquet F. M. 2008.** Bactéries lactiques : de la génétique au ferment. Paris. Édition Tec et Doc p. 849.

-D-

- **Da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J.M.D., Oliveira, R.P.D.S., (2014).** Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. Food Res. Int. 64, 527–536.
- **Diop, M.B., Destain, J., Tine, E., Thonart, P., (2010).** Les produits de la mer au Sénégal et le potentiel des bactéries lactiques et des bactériocines pour la conservation. Biotechnol Agron Soc Env.
- **Dortu, C., Thonart, P., (2009a).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol Agron Soc Env, p 13
- **Dortu, C., Thonart, P., (2009b).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol Agron Soc Env,p 13
- **Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M., Prévost, H., (2006).** The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70, 564–582.

- **Duar, R.M., Lin, X.B., Zheng, J., Martino, M.E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M.E., Leulier, F., Gänzle, M., Walter, J., (2017).** Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, S27–S48.
- **Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), (2006).** The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Springer US, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3>

-E-

- **Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B., Nes, I.F., (1998).** Comparative Studies of Class IIa Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3275–3281.

-F-

- **Fleming H.P., Etchells J. L., Costilow R. N., (1975).** Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber Brines. *Appl Microbiol.*, 30(6): 1040-1042.
- **Fernandez, B., Hammami, R., Savard, P., Jean, J., Fliss, I., (2014).** *Pediococcus acidilactici* UL5 and *Lactococcus lactis* ATCC 11454 are able to survive and express their bacteriocin genes under simulated gastrointestinal conditions. *J. Appl. Microbiol.* 116, 677–688.
- **Fernández, M., Martínez-Bueno, M., Martín, M. C., Valdivia, E., Maqueda, M. (2007).** Heterologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), 1350–1361.
- **Fothergill, A. W. (2011).** Antifungal susceptibility testing: clinical laboratory and standards institute (CLSI) methods. In *Interactions of yeasts, moulds, and antifungal agents: How to detect resistance* (pp. 65-74). Totowa, NJ: Humana Press.
- **Fimland, G., Johnsen, L., Axelsson, L., Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G.H., Nissen-Meyer, J., (2000).** A C-Terminal Disulfide Bridge in Pediocin-Like Bacteriocins Renders Bacteriocin Activity Less Temperature Dependent and Is a Major Determinant of the Antimicrobial Spectrum. *J. Bacteriol.* 182, 2643–2648.
- **Flahaut, S., Auffray, Y., Boutibonnes, P., (1997).** Les entérocoques dans l'environnement proche de l'homme. *Can. J. Microbiol.* 43, 699–708.

- **Furet, J.-P., Quénéée, P., Tailliez, P., (2004).** Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 197–207.

-G-

- **Guessas B., (2007).** Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le biocontrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat en microbiologie appliquée. Université d'Oran Es-Senia
- **Gyu Sung Cho, Hyung Ki Do, (2006).** Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Traditional Jeotgal Product in Korea. *Ocean Science Journal.*, Vol. 41(2): 113-119.
- **Gillor, O., Etzion, A., Riley, M.A., (2008).** The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 591–606.

-H-

- **Hogg, S., (2005).** Essential microbiology. John Wiley and Sons, West Sussex ; Hoboken, NJ.
- **Hugenholtz, J., Sybesma, W., Groot, M.N., Wisselink, W., Ladero, V., Burgess, K., Van Sinderen, D., Piard, J.-C., Eggink, G., Smid, E.J., Savoy, G., Sesma, F., Jansen, T., Hols, P., Kleerebezem, M., (2002).** Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals, in: Siezen, R.J., Kok, J., Abee, T., Schasfsma, G. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 217–235.
- **Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A., Maneerat, S. (2011).** Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control*, 22(3-4), 401–407.

-I-

- **Ilyanie, H. Y., Huda-Faujan, N., Muryany, M. I., Zuraida, J. (2022).** Isolation and characterisation of probiotic lactic acid bacteria from Malaysian fermented fish products budu and bosou. *International Food Research Journal*, 29(2), 338-348.

-J-

- **Jeon, H.H., Kim, K.H., Chun, B.H., Ryu, B.H., Han, N.S., Jeon, C.O., (2017).** A proposal of *Leuconostoc mesenteroides subsp. jonggajib kimchii subsp. nov.* and reclassification of *Leuconostoc mesenteroides subsp. suionicum* (Gu et al., 2012) as *Leuconostoc suionicum sp. nov.* based on complete genome sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 2225–2230.
- **Joffin et Leyarl , (2006).** Caractérisation microbiologique de l'argile à opalinus du mont terri et de l'argilite du callovo-oxfordien de meuse/haute-marne,p 86 (thèse de doctorat)

#### -K-

- **Kobilinsky, A., Nazer, A.I., Dubois-Brissonnet, F., (2007).** Modeling the inhibition of *Salmonella typhimurium* growth by combination of food antimicrobials. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 95–109.
- **Kalalou, I., Faid, M., Touhami Ahami, A. (2004).** Extending shelf life of fresh minced camel meat at ambient temperature by *Lactobacillus dlbrueckii subsp. delbrueckii*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(3), 05-06.
- **Kumar, A., Kumar, D. (2015).** Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. *Anaerobe*, 33, 117-123.

#### -L-

- **Leahy, S.C., Higgins, D.G., Fitzgerald, G.F., Sinderen, D., (2005).** Getting better with *Bifidobacteria*. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1303–1315.
- **Léonard, L., (2013).** Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique, (thèse de doctorat).
- **Liasi, S. A., Azmi, T. I., Hassan, M. D., Shuhaimi, M., Rosfarizan, M., Ariff, A. B. (2009).** Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budu. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(1), 33-37.

#### -M-

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

- **Mami A et Kihal M, (2019).** Activité anti-bactérienne de *Lactobacillus plantarum*: le bio-contrôle des bactéries d'altération alimentaire par les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*. Éditions universitaires européennes (28 août 2019). ISBN : 6139515815
- **Makhloufi, K.M.,** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza, p 8-10,( thèse de doctorat).

-N-

- **Network, E. M. (2012).** Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of marine fish in the Oran Algeria coast. *African Journal of Microbiology Research*, 6(13), 3125-3133.

-P-

- **Park, S.-N., Lim, Y.K., Shin, J.H., Chang, Y.-H., Shin, Y., Paek, J., Kim, H., Kook, J.-K., (2019).** *Streptococcus gwangjuense* sp. nov., Isolated from Human Pericoronitis. *Curr. Microbiol.* 76, 799–803.
- **Patel, S., Gupta, R.S., (2018).** Robust demarcation of fourteen different species groups within the genus *Streptococcus* based on genome-based phylogenies and molecular signatures. *Infect. Genet. Evol.* 66, 130–151.
- **Peterbauer, C., Maischberger, T., Haltrich, D., (2011).** Food grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnol. J.* 6, 1147–1161.

-R-

- **Reuben R. C., Roy P. C., Sarkar S. L., Alam A. R. U., Jahid I. K. (2020).** Characterisation and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *Journal of dairy science*, 103(2), 1223-123
- **Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N., Penna, A.L.B., (2012).** Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Eng. Rev.* 4, 124–140.
- **Richard, C., Cañon, R., Naghmouchi, K., Bertrand, D., Prévost, H., Drider, D., 2006.** Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.* 23, 175–183.
- **Reiner, K. (2010).** Catalase test protocol. *American society for microbiology*, 1(1), 1-9.

-S-

- **Salveti, E., Torriani, S., Felis, G.E., (2012).** The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 4, 217–226.
- **Sherid, M., Samo, S., Sulaiman, S., Husein, H., Sifuentes, H., Sridhar, S., (2016).** Liver abscess and bacteremia caused by *Lactobacillus*: role of probiotics? Case report and review of the literature. *BMC Gastroenterol.* 16, 138.
- **Sidhu, P.K., Nehra, K., (2019).** Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing antimicrobial activity of bacteriocins. *J. King Saud Univ. - Sci.* 31, 758–767.
- **Singh, V.P., (2018).** Recent approaches in food bio-preservation - a review. *Open Vet. J.* 8, 104.
- **Sowmya, N.S., Nandini, K., Earanna, N., Sajeevan, R.S., Nataraja, K., (2016).** Molecular Identification and Genetic Diversity of *Lactobacillus* Species Isolated from Different Edible Sources. *J. Pure Appl. Microbiol.* 10, 3155–3162.
- **Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1–29.
- **Streit, F., Corrieu, G., Béal, C., (2007).** Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CFL1. *J. Biotechnol.* 128, 659–667.
- **Schillinger, U., L cke, F. K. (1989).** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and environmental microbiology*, 55(8), 1901-1906.
- **Souhila, T., Ahmed, B. (2012).** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature & Technology*, (6), 71.
- **Schillinger, U., & L cke, F. K. (1989).** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and environmental microbiology*, 55(8), 1901-1906.
- **Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., & Matošić, S. (2010).** Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296-307.

-T-

- **Taale, E., Savadogo, A., Zongo, C., Tapsoba, F., Karou, S.D., Traore, A.S., (2016).** Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne: cas des bactériocines. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 10, 384, p 384-399.
- **Tailliez, P., (2001).** Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Le Lait* 81, 1–11.
- **Télez Ma, M., (2018).** Induction of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria; a Strategy to Improve the Safety of Fresh Fruits and Vegetables. *Agric. Res. Technol. Open Access J.* 14.
- **Teuber, M., 2015.** *Lactococcus*, in: Whitman, W.B. (Ed.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, pp. 1–21.
- **Touati, D., (2000).** Iron and Oxidative Stress in Bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 1–6.

-V-

- **Van De Guchte, M., Ehrlich, S.D., Maguin, E., (2001).** Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *J. Appl. Microbiol.* 91, 147–153.

-W-

- **Wiedemann, I., Breukink, E., Van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., De Kruijff, B., Sahl, H.-G., (2001).** Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity. *J. Biol. Chem.* 276, 1772–1779.
- **Wallace, T. D., Bradley, S., Buckley, N. D., Green-Johnson, J. M. (2003).** Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. *Journal of Food Protection*,

-Y-

- **Yelnetty, A., Purnomo, H., Mirah, A., (2014).** Biochemical Characteristics of Lactic Acid Bacteria with Proteolytic Activity and Capability as Starter Culture Isolated From Spontaneous Fermented Local Goat Milk.
- **Yu, J., Song, Y., Ren, Y., Qing, Y., Liu, W., Sun, Z., (2017).** Genome-level comparisons provide insight into the phylogeny and metabolic diversity of species within the genus *Lactococcus*. *BMC Microbiol.* 17, 213.



- **Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., & Fillmore, S. (2012).** Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, 2(1), 48.

-Z-

- **Zalán, Z., Németh, E., Baráth, Á., Halász, A.,** Influence of Growth Medium on Hydrogen Peroxide and Bacteriocin Production of *Lactobacillus* Strains.
- **Zhang, Y.-J., Li, S., Gan, R.-Y., Zhou, T., Xu, D.-P., Li, H.-B., (2015).** Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 7493–7519.
- **Zhitnitsky, D., Rose, J., Lewinson, O., (2017).** The highly synergistic, broad spectrum, antibacterial activity of organic acids and transition metals. *Sci. Rep.* 7, 44554.

# ANNEXES

---

## ➤ ANNEXE I: Milieux de culture

Plusieurs milieux de cultures ont été utilisés au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants.

### A. Milieux de cultures solides

- Milieu MRS (de Man-Rogosa et Sharp)
- Milieu Chapman
- Milieu EMB (Eosine Bleu de Méthylène)
- Gélose nutritive
- Gélose nutritive molle

### B. Milieux de cultures liquides

- MRS : de Man-Rogosa et Sharp
- Bouillon nutritif

### C. Produits chimiques et réactifs

- Colorants : Violet de Gentiane, fuschine,
- Alcool et autres : Ethanol, Lugol, eau oxygénée

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

### 1. Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe)

<input type="checkbox"/> Peptone .....	10g
<input type="checkbox"/> Extrait de viande .....	10g
<input type="checkbox"/> Extrait de levure .....	5g
<input type="checkbox"/> Glucose .....	20g
<input type="checkbox"/> Tween 80 .....	1mL
<input type="checkbox"/> Phosphate dipotassique .....	2g
<input type="checkbox"/> Acétate de sodium .....	5g
<input type="checkbox"/> Citrate de sodium .....	2g

## ANNEXES

---

- Sulfate de magnésium .....0,2g
- Sulfate de manganèse .....0,05g
- Agar (gélose) .....15g
- Eau distillée .....1000 mL
- pH 6,5.

Autoclaver à 121 °C/10mn

### 2. Milieu nutritif

- Extrait de viande .....1g
- Peptone .....15g
- Chlorure de sodium .....5g
- Agar (gélose) .....15g
- pH=7,2

Autoclaver à 121 °C/10mn

### 3. Milieu de Chapman

- Extrait de viande (bovin ou porcin)..... 1g
- Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin) ..10g
- Chlorure de sodium.....75g
- Mannitol .....10g
- Agar.....15g
- Rouge de phénol.....0,025g
- pH=7,6

### 4- Gélose nutritive molle

Agar .....7-12 g

Bouillon nutritif.....8 g

## ANNEXES

---

### 5- Gélose EMB

Digeste peptique de tissu animal.....	1g
Phosphate dipotassique.....	2g
Lactose.....	5g
Sucrose.....	5g
Éosine – Y.....	0,4g
Bleu de méthylène.....	0.065g
Gélose.....	13.5g

### Annexe III : Colorants de la coloration de Gram

#### - Fushine

Fushine basique .....	1g
Alcool éthylique a 90% .....	10ml
Phénol.....	5g
Eau distillée.....	100ml

#### - Lugol

Iode.....	1g
Iodure de potassium.....	2g
Eau distillée.....	300ml

#### - Violet de gentiane

Violet de gentiane.....	1g
Ethanol a 90%.....	10ml
Phénol.....	2g
Eau distillée.....	100ml

## ANNEXES

**ANNEXE IV:** Activité antimicrobienne des bactéries lactiques étudiées évaluée vis-à-vis de souches pathogènes *E.coli*.

les souches	la moyenne	Ecart type
E1 P2 LB1	30	0
E1 P3 LB2	30,5	0,707106781
E1 P3 LB3	31,5	0,707106781
E2 P2 LB4	29,5	0,707106781
E2 P2 LB5	29,5	0,707106781
E3 P2 LB6	30,5	0,707106781
E3 P3 LB7	31,5	0,707106781
E3 P1 LB8	33,5	0,707106781
E3 P3 LB9	31,5	0,707106781
E3 P1 LB10	33,5	0,707106781
E3 P2 LB11	31,5	0,707106781
E3 P3 LB12	27,5	0,707106781
E3 P1 LB13	28,5	0,707106781
E3 P2 LB14	28,5	0,707106781
E4 P1 LB16	30,5	0,707106781
E4 P1 LB19	30,5	0,707106781
E4 P2 LB20	32	0
E4 P3 LB21	30,5	0,707106781
E5 P1 LB22	34,5	0,707106781
E5P2 LB23	35	0
E5 P3 LB24	29,5	0,707106781
E5 P1 LB25	31,5	0,707106781
E5 P3 LB27	25,5	0,707106781
E6 P1 LB28	36	0
E6 P3 LB30	26	0
E6P1 LB31	23,5	0,707106781
E6 P2 LB32	26,5	0,707106781

## ANNEXES

E7 P1 LB33	25,5	0,707106781
E7 P2 LB34	24	0
E7 P3 LB35	25,5	0,707106781
E7 P1 LB36	36,5	0,707106781
E7 P2 LB37	33,5	0,707106781
E7 P3 LB38	29,5	0,707106781
E8 P1 LB39	26,5	0,707106781

**ANNEXE 04** : Activité antimicrobienne des bactéries lactiques étudiées évaluée vis-à-vis de souches pathogènes *S. aureus*

les souches	la moyenne	Ecart type
E1 P2 LB1	23,5	0,707106781
E1 P3 LB2	27,5	0,707106781
E1 P3 LB3	15,5	0,707106781
E2 P2 LB4	24,5	0,707106781
E2 P2 LB5	31	0
E3 P2 LB6	30,5	0,707106781
E3 P3 LB7	27,75	0,353553391
E3 P1 LB8	36	0
E3 P3 LB9	32	0
E3 P1 LB10	14,5	0,707106781
E3 P2 LB11	17,5	0,707106781
E3 P3 LB12	30,75	0,353553391
E3 P1 LB13	19,5	0,707106781
E3 P2 LB14	18	0
E4 P1 LB16	16	0
E4 P1 LB19	18,5	0,707106781
E4 P2 LB20	24,5	0,707106781
E4 P3 LB21	26,5	0,707106781
E5 P1 LB22	27,5	0,707106781

## ANNEXES

E5P2 LB23	25	0
E5 P3 LB24	27,5	0,707106781
E5 P1 LB25	28	0
E5 P3 LB27	30	0
E6 P1 LB28	27,5	0,707106781
E6 P3 LB30	19	0
E6P1 LB31	21,5	0,707106781
E6 P2 LB32	27,5	0,707106781
E7 P1 LB33	30	0
E7 P2 LB34	31,5	0,707106781
E7 P3 LB35	32	0
E7 P1 LB36	31,5	0,707106781
E7 P2 LB37	26,5	0,707106781
E7 P3 LB38	24,5	0,707106781
E8 P1 LB39	27	0

### ANNEXE V : Résultat de l'identification des bactéries lactiques

Les souches	Colonies	Gram	Forme	Catalase
E1 P2 LB1	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E1 P3 LB2	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E1 P3 LB3	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E2 P2 LB5	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E3 P2 LB6	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E3 P3 LB7	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E3 P1 LB8	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-

## ANNEXES

E3 P3 LB9	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E3 P1 LB10	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E3 P2 LB11	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E3 P2 LB12	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E3 P2 LB13	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E3 P2 LB14	Colonies grandes et blanchâtres	+	Bacille	-
E3 P2 LB15	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E3 P2 LB16	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E3 P2 LB19	Colonies grandes et blanchâtres	+	Bacille	-

### ANNEXE V : Résultat de l'identification des bactéries lactiques

Les souches	Colonies	Gram	Forme	Catalase
E4 P2 LB20	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E4 P3 LB21	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E5 P1 LB22	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E5P2 LB23	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E5 P3 LB24	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E5 P1 LB25	Colonies grandes et blanchâtres	+	Bacille	-
E5 P3 LB27	Colonies grandes et blanchâtres	+	Bacille	-
E6 P1 LB28	Colonies grandes et blanchâtres	+	Bacille	-



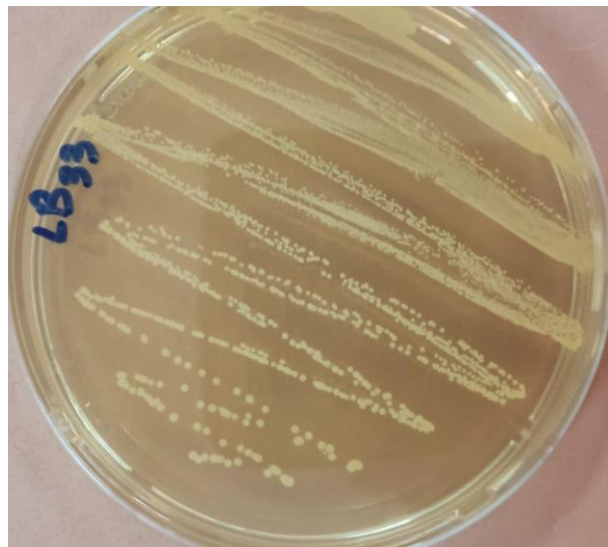
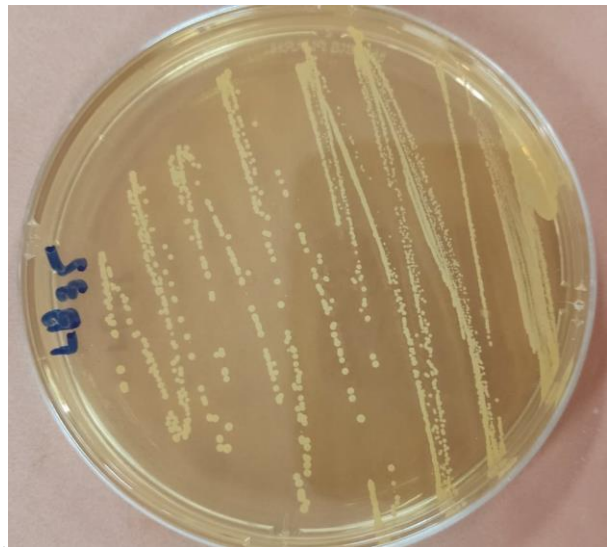
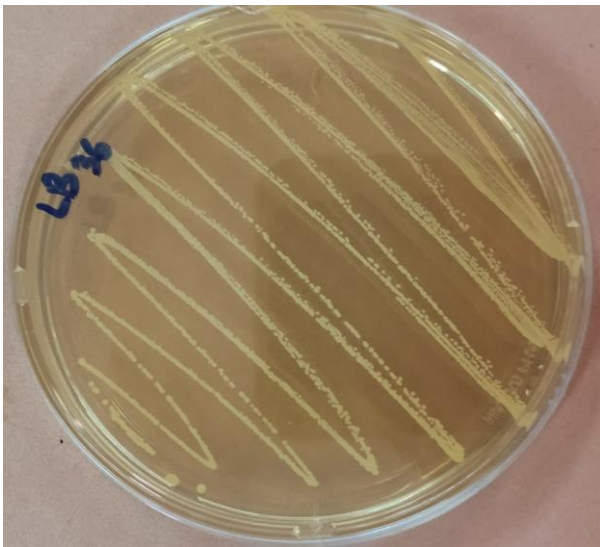
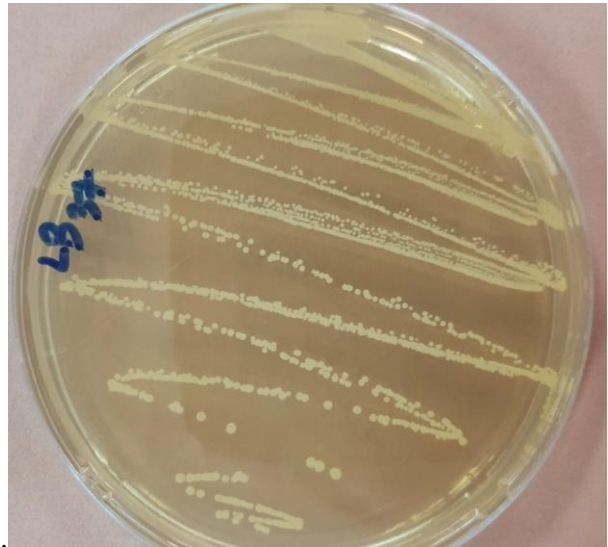
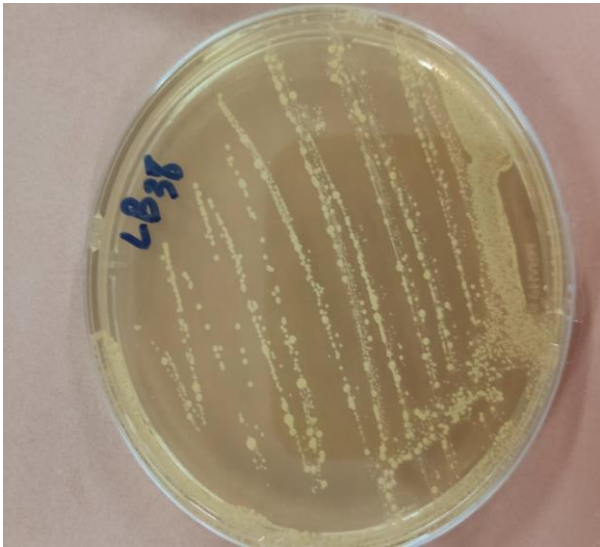
## ANNEXES

---

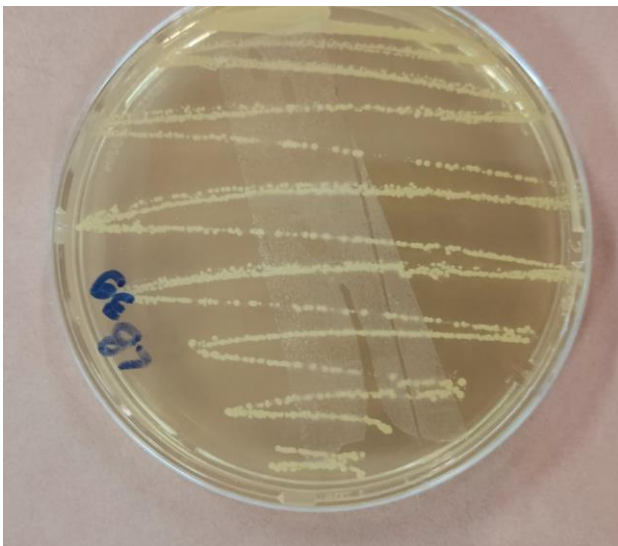
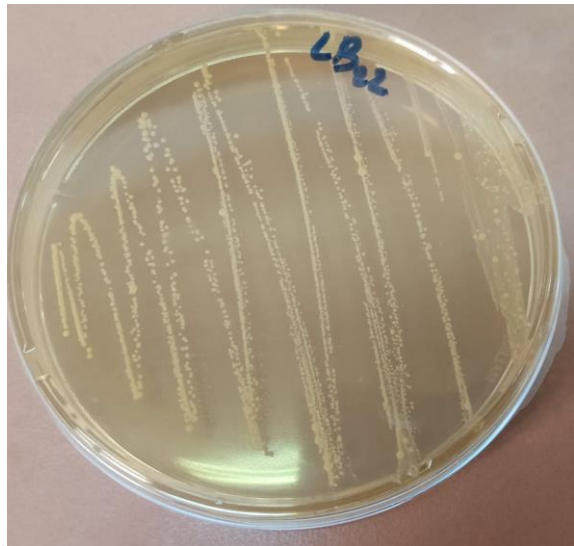
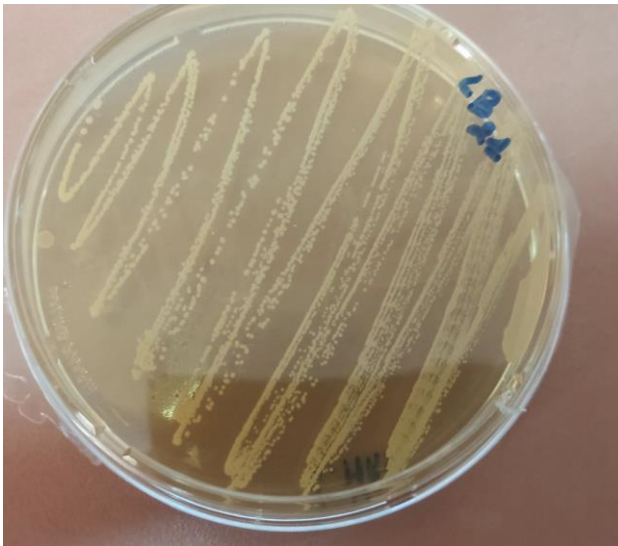
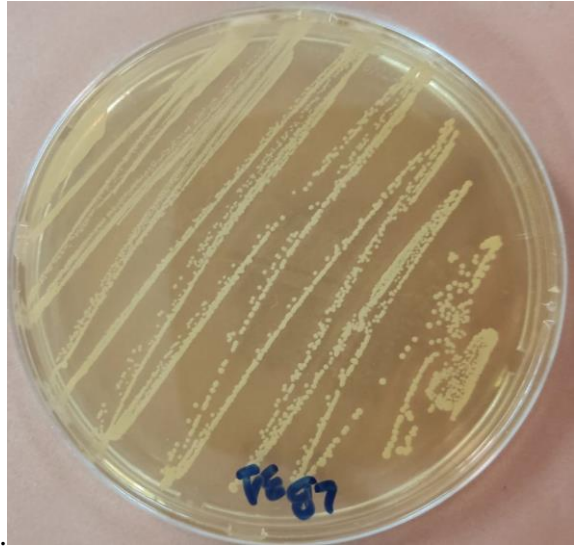
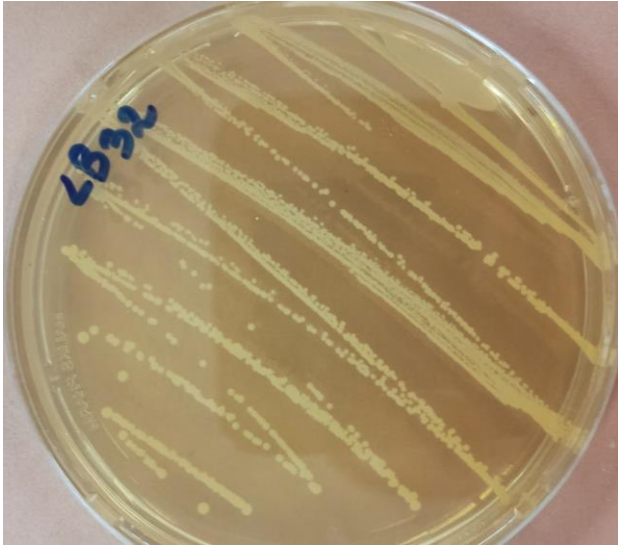
E6 P3 LB30	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E6P1 LB31	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E6 P2 LB32	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E7 P1 LB33	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E7 P2 LB34	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E7 P3 LB35	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E7 P1 LB36	Colonies grandes et blanchâtres	+	Bacille	-
E7 P2 LB37	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-
E7 P3 LB38	Colonies grandes et blanchâtres	+	Bacille	-
E8 P1 LB39	Colonies petits et blanchâtres	+	Bacille	-

# ANNEXES

## ANNEXE VI : Les souches des bactéries lactiques



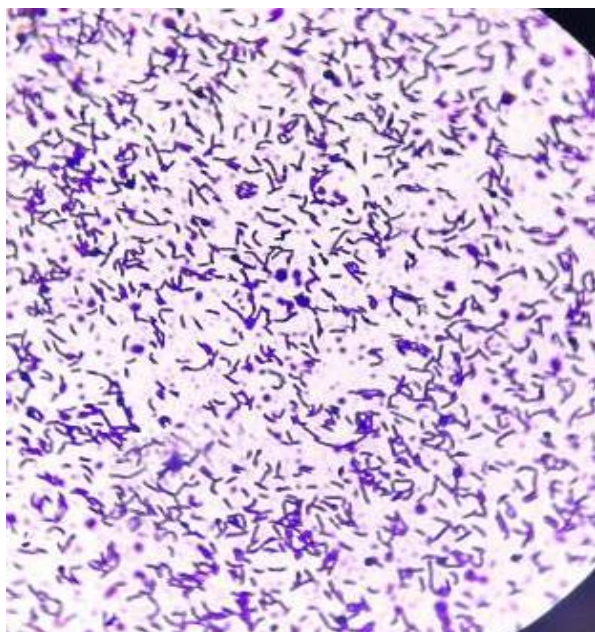
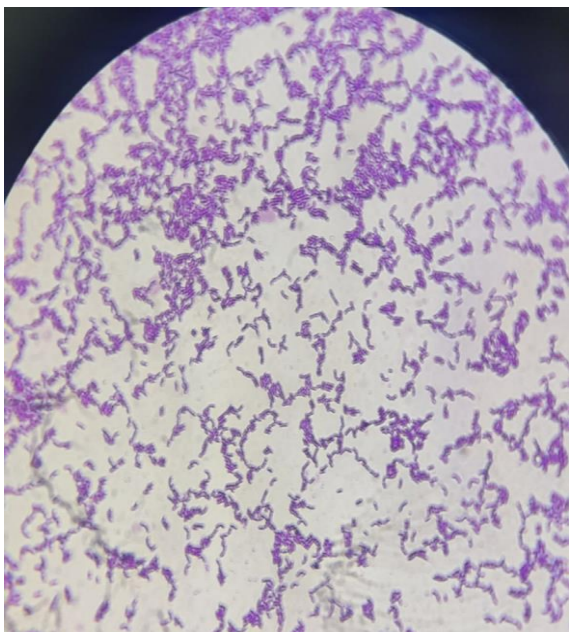
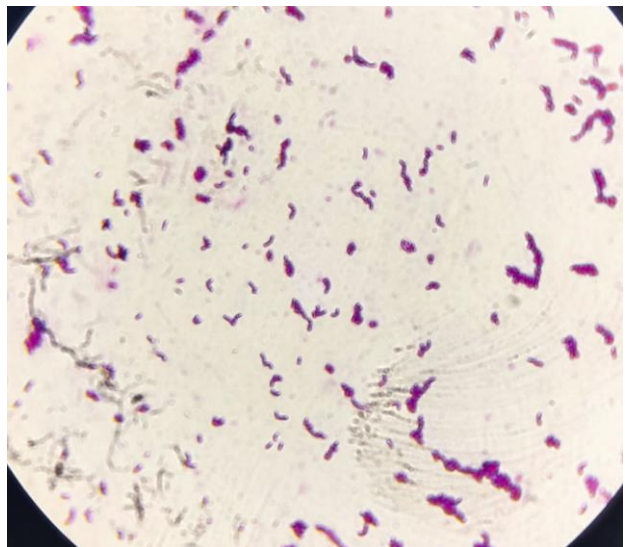
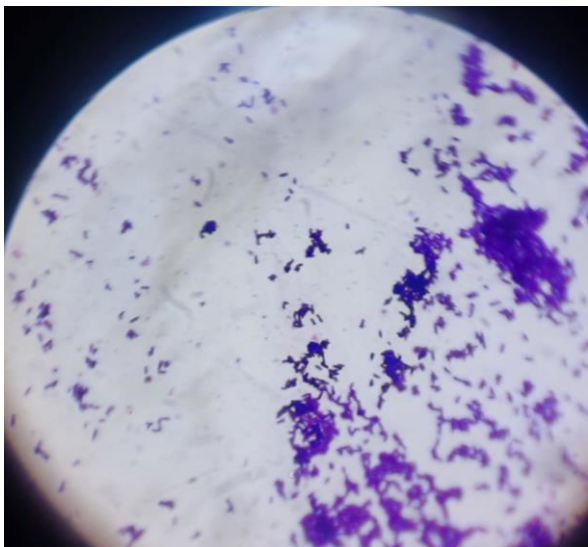
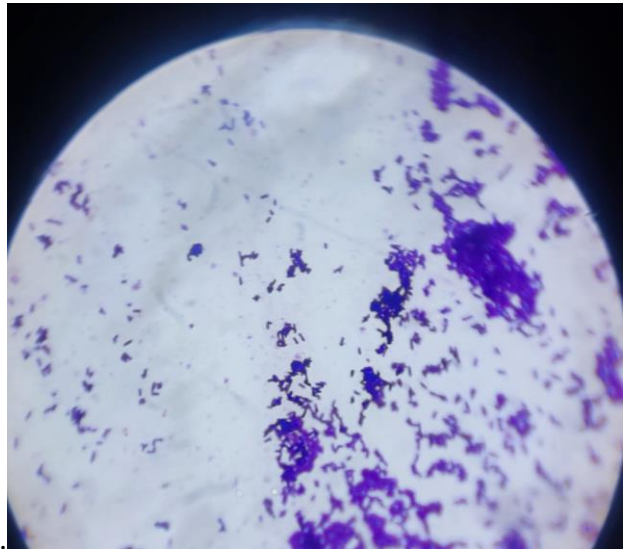
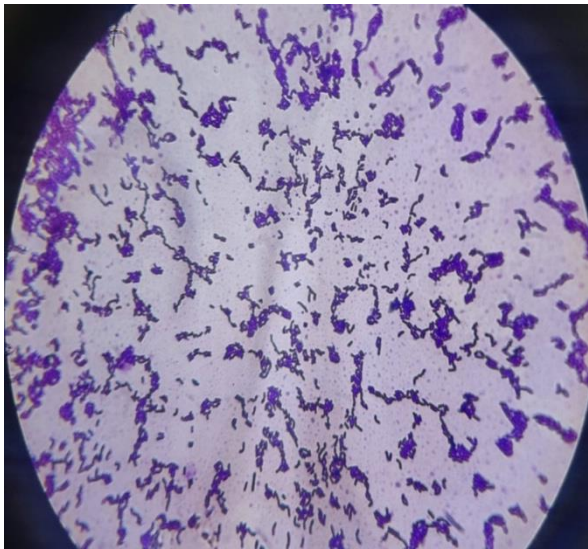
# ANNEXES



# ANNEXES

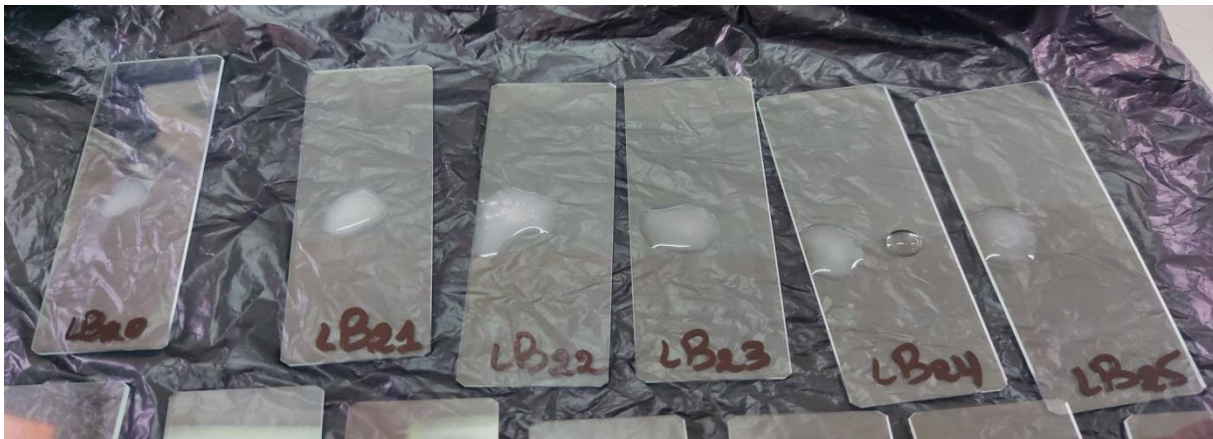
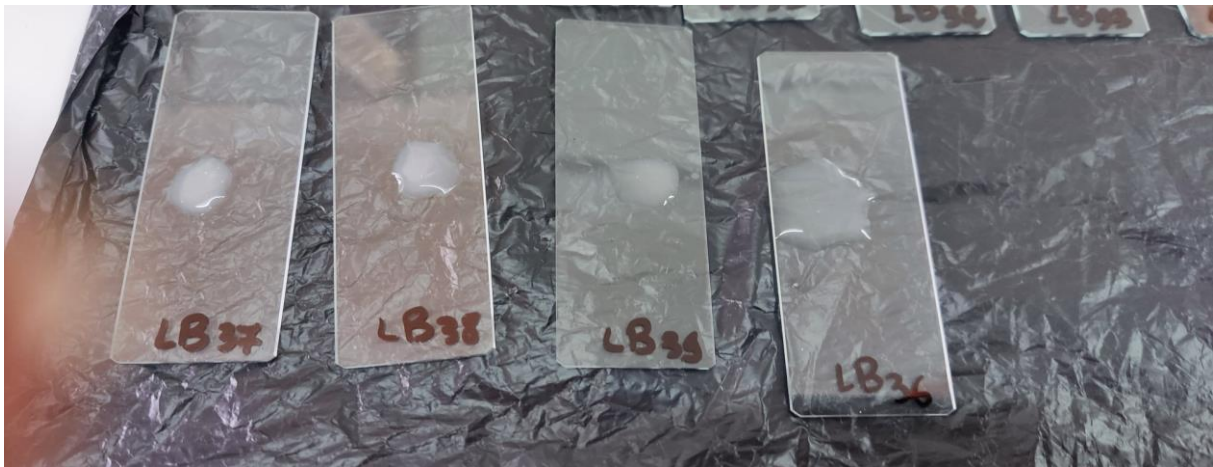
---

## ANNEXE VII : Résultat de coloration de Gram



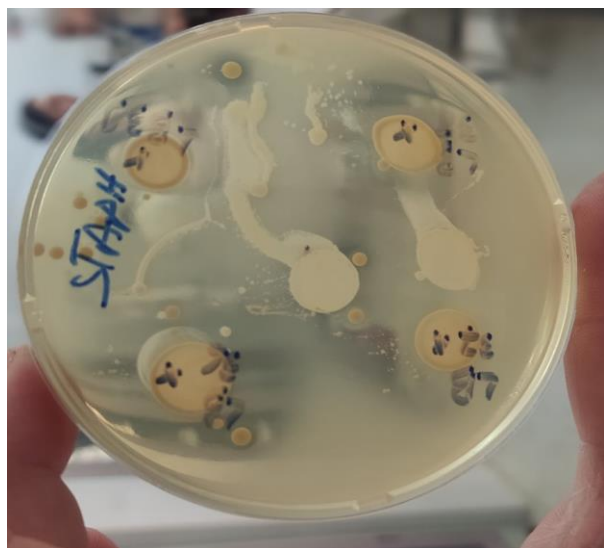
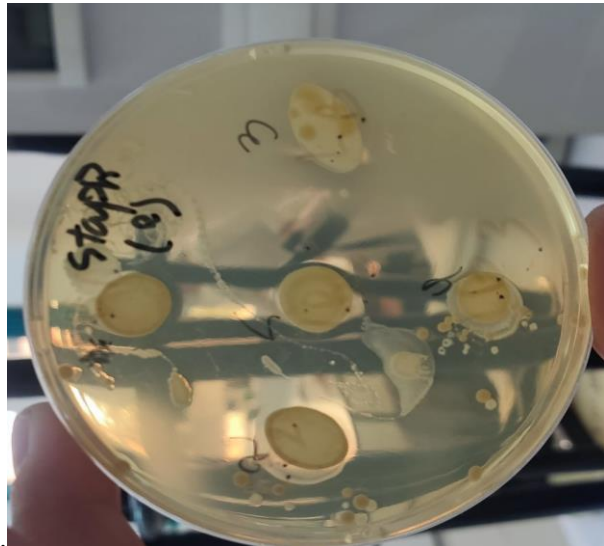
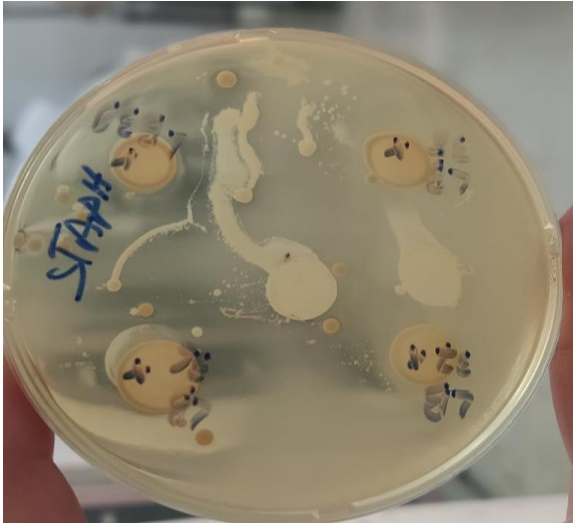
# ANNEXES

## ANNEXE VIII: Résultat de test de catalase



# ANNEXES

## ANNEXE IX : Résultat de test de spot



## Résumé

Les bactéries lactiques sont très utilisées en industrie agroalimentaire grâce à leur rôle dans la fermentation et la conservation des aliments par production de plusieurs facteurs inhibiteurs. Dans le but de mettre en évidence l'effet antimicrobien de telles bactéries, nous avons étudié le pouvoir antagoniste de 34 souches lactiques d'origine du tube digestif des poissons vis-à-vis de deux souches pathogènes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. L'activité antibactérienne a été réalisée suivant deux méthodes : la méthode des spots et des puits. Les résultats ont révélé que toutes les souches lactiques testées produisent et excrètent dans le milieu de culture des substances inhibitrices capables d'inhiber la croissance des deux souches pathogènes. Ceci est observé par l'apparition des zones d'inhibition importantes avec des diamètres différents s'étalant entre 10 et 40mm, pour le contact direct (test de spot) et ont observé le résultat négatif pour le contact indirect « test de puits »

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

## Abstract

Lactic acid bacteria are widely used in the food industry, thanks to their role in fermentation and food preservation through the production of several factors inhibitors. In order to demonstrate the antimicrobial effect of such bacteria, we have studied the antagonistic power of 34 lactic acid strains from the digestive tract of fish against two pathogenic strains: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Antimicrobial activity was assessed using two methods: the spot method and well method. The results showed that all the lactic strains tested produce and excrete inhibitory substances in the culture medium capable of inhibiting the growth of both pathogenic strains. This is observed by the appearance of zones of inhibition with different diameters ranging from 10 to 40mm, for the direct contact (spot test) and negative results for indirect contact "well test".

**Key words:** Lactic acid bacteria; antibacterial activity; inhibiting substance; pathogenic strains.

## ملخص

تستخدم بكتيريا حمض اللاكتيك على نطاق واسع في صناعة الأغذية بفضل دورها في تخمير وحفظ الغذاء عن طريق إنتاج العديد من العوامل المثبطة. من أجل تسليط الضوء على التأثير المضاد للميكروبات لمثل هذه البكتيريا، درسنا القوة العدائية لـ 34 سلالة من أصل الجهاز الهضمي للأسماك مقابل سلالتين ممرضتين: المكورات العنقودية الذهبية، الإشريكية القولونية، تم تنفيذ النشاط المضاد للميكروبات باستخدام طريقتين: البقعة والطريقة الجيدة. كشفت النتائج أن جميع السلالات اللبنية التي تم اختبارها تنتج وتفرز في المواد المثبطة المتوسطة المزروعة القدرة على تثبيط نمو كلتا السلالتين المسببتين للأمراض. يلاحظ ذلك من خلال ظهور مناطق تثبيط مهمة ذات أقطار مختلفة معايرة بين 10 و 40 مم، للتلامس المباشر (اختبار موضعي) ولاحظت النتيجة السلبية لـ «اختبار جيد» غير مباشر للتلامس

**الكلمات الرئيسية:** بكتيريا حمض اللاكتيك ؛ والنشاط المضاد للبكتيريا ؛ ومنع المادة ؛ السلالات الممرضة