

# الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun –Tiaret-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière : "Sciences biologiques"

Spécialité : "Infectiologie"

Présenté et soutenu publiquement par

**BOUDAR Aicha**

**MEDDAH Djamila**

**TAHRI Yasmina**

## Thème

**Effet probiotique de *Lactobacillus rhamnosus GG* et  
*LA80I* sur certaines bactéries pathogènes  
responsables d'infections humaines**

### JURY:

**Président: Dr. MEDJEBER Nacéra**

**MCB**

**Promoteur : Dr. DOUKANI Koula**

**MCA**

**Co-promoteur: Dr. TABAK Souhila**

**MCA**

**Examineur : Dr. CHIKHAOUI Mira**

**MCB**

**Année universitaire : 2017-2018**

# *Remerciements*

*Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*En premier lieu, Nous tenons à adresser tout particulièrement nos plus sincères remerciements à notre merveilleuse promotrice Dr. DOUKANI Koula d'avoir accepté de nous encadrer, pour tous les conseils techniques, les encouragements, et les orientations qu'elle nous a prodiguées durant la préparation de notre mémoire. Qu'elle trouve ici notre profonde gratitude.*

*Nous voudrions également exprimer nos vifs remerciements à Dr. TABAK Souhila notre co-promotrice qui nous a toujours accueillies avec une grande sympathie, bienveillance et avec ses remarques constructives tout au long de ce travail.*

*Un grand merci à Dr. MEDJBER Nacéra d'avoir accepté de présider notre travail.*

*Un grand merci également à Dr. CHIKHAOUI Mira d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous remercions tous les enseignants du Département des SNV-Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université IBN KHALDOUN- TIARET, et en particulier de l'équipe du master Infectiologie.*

*Nos sincères remerciements vont au personnel du laboratoire de Microbiologie, Technologie alimentaire et Biochimie de notre faculté.*

*Finalement, nous remercions, ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.*



# Dédicaces

*Avant tout Je remercie Allah le tout puissant de m'avoir  
donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes parents. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de  
l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur  
procure bonne santé et longue vie*

*A mes frères Mohammed et Taki dîne*

*A mes sœurs Fatima, Amira et ma petite Nourhane*

*A toute ma famille, et mes amis surtout Chahira, Hawaia et  
Hayet. Hanane, Raida, Halima et Maryem*

*A mes chère collègues Yasmina et Djamila*

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce  
projet soit possible, je vous dis merci*

*Aicha*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail aux êtres les plus chers à mon cœur :*

*A ma mère qui m'a soutenu jusqu'au bout grâce à son aide et à son sacrifice qu'elle a fait durant mes études Je le dédie également aux plus aimables au Monde*

*A mes chers frères: M'hamed, Abdelkader, Bouziane*

*A mes chères sœurs : Fatima, Chahra zed*

*A mes nièces et mes neveux: Abdelwadoud, Abdelkarim, Abdelmajid, Kawther, Salsabil, Ikhlil*

*Je dédie à toutes mes amies: Yasmina, Aicha, Sara, Nawal, Fatima.*

*et à toute ma famille sans exception: Meddah et Doumer*

*Et à ceux et celles que je n'ai pas cités et que je le gardé dans ma mémoire*

*Djamila*

# *Dédicaces*

*On remercie Allah le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes chers parents, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours*

*A mes chères sœurs Wahiba et Ibtissem, pour leur appui et encouragements*

*A toute ma famille pour son soutien tout au long de mon parcours universitaire*

*A mes amis : Houda, Sara, Nawal, Fatima, Abdelhadi et particulièrement mes trinômes : Djamilia et Aicha, et pour toute la promotion de master Infectiologie (2017-2018)*

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci*

*Yasmina*

## Sommaire

Liste des abréviations .....	i
Liste des figures .....	ii
Liste des tableaux .....	iii
Liste des annexes .....	iv

### Introduction

#### Première Partie : Synthèse bibliographique

#### Chapitre I : Les probiotiques

I.1. Historique .....	02
I.2. Définition .....	02
I.3. Classification.....	03
I.3.1. Bactéries lactiques.....	03
I.3.1.1. <i>Lactobacillus</i> .....	04
I.3.1.2. <i>Bifidobacterium</i> .....	05
I.3.2. Bactéries non lactiques.....	06
I.3.3. Levures .....	07
I.4. Critères de sélection des souches .....	07
I.4.1. Critères de sécurité.....	07
I.4.2. Critères fonctionnels.....	08
I.4.3. Critères technologiques.....	08
I.5. Mécanismes d'action.....	09
I.5.1. Compétition pour les nutriments.....	09
I.5.2. Compétition pour les sites d'attachement.....	09
I.5.3. Production des composés antimicrobiens.....	10
a. Acide lactique.....	10
b. Peroxyde d'hydrogène.....	10
c. Diacétyl.....	10
d. Dioxyde de carbone.....	11
e. Bactériocines.....	11
I.5.4. Immunomodulation.....	11
I.6. Effet santé des probiotiques.....	12
I.6.1. Amélioration de la digestion du lactose.....	12
I.6.2. Prévention des diarrhées infectieuses.....	12
I.6.3. Allergie.....	13
I.6.4. Prévention du cancer du colon.....	13

I.7. Effets indésirables.....	15
I.7.1. Infection .....	15
I.7.2. Effets indésirables métaboliques.....	15
I.7.3. Effets indésirables immunologiques .....	15
I.8. Applications des probiotiques.....	16
I.8.1. Applications alimentaires .....	16
I.8.2. Applications pharmaceutiques .....	16

## **CHAPITRE II : *Lactobacillus rhamnosus***

II.1. Historique.....	18
II.2. Classification .....	18
II.3. Habitat.....	19
II.4. Caractéristiques de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	19
II.4.1. Caractères généraux.....	19
II.4.2. Caractères génétique .....	19
II.4.3. Caractères spéciaux .....	20
II.5. Effet santé de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	20
II.5.1. Diarrhée de l'enfant.....	20
II.5.1.1. Prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques.....	21
II.5.1.2. Diarrhée à rotavirus.....	21
II.5.1.3. Diarrhée des voyageurs.....	22

## **Deuxième Partie :Eexpérimentale**

### **Chapitre I : Matériel et Méthodes**

I.1. Objectifs du travail.....	25
I.2. Lieu et période de travail.....	25
I.3. Matériels.....	25
I.3.1. Matériel biologique.....	25
I.3.2. Matériels du laboratoire.....	26
I.4. Méthodes.....	27
I.4.1. Protocole expérimental.....	27
I.4.2. Pré-identification des souches pathogènes.....	28
I.4.2.1. Purification.....	28
I.4.2.2. Conservation.....	28
I.4.2.3. Caractères morphologiques.....	28
I.4.2.4. Caractères biochimiques.....	28
I.4.2.5. Antibiogramme.....	29
I.4.2.6 Cinétique de croissance des bactéries pathogènes.....	30

I.4.3. Quelques caractères technologiques des ferments lactiques.....	31
I.4.3.1. Revivification.....	31
I.4.3.2. Purification et conservation .....	31
I.4.3.3. Pré-identification.....	31
a. Etudes des caractères morphologiques.....	31
b. Etude des caractères biochimiques.....	31
I.4.3.4. Etude de la cinétique d'acidité.....	31
a. Mesure du pH. ....	32
b. Dosage de l'acidité titrable.....	32
I.4.3.5. Cinétique de croissance des bactéries lactiques.....	32
I.4.4. Test d'antagonisme sur le milieu liquide.....	32
I.4.4.1. Recherche des agents antimicrobiens.....	32
a. Recherche l'effet de l'acidité.....	32
b. Recherche des bactériocines-like.....	33
<b>Chapitre II : Résultats et Discussion</b>	
II.1. Résultats de Pré-identification des bactéries pathogènes sélectionées.....	36
II.1.1. Aspect macroscopique .....	36
II.1.2. Aspect microscopique .....	37
II.1.3. Etude biochimique .....	38
II.1.4. Caractérisation de la sensibilité aux antibiotiques des trois souches pathogènes.....	43
II.1.5. Etude de la cinétique des souches pathogènes étudiées .....	45
II.2. Caractères technologiques des deux produits lactiques probiotiques .....	46
II.2.1. Revivification des ferments lactiques .....	46
II.2.2. Etude morphologique.....	46
a.Aspect macroscopique .....	46
b. Aspect microscopique.....	47
II.2.3. Etude biochimique .....	48
II.2.4. Mesure de pH et cinétique d'acidité .....	49
II.2.5. Cinétique de croissance des bactéries lactiques .....	50
II.3. Test d'antagonisme sur milieu liquide.....	50
II.4. Discussion générale.....	53
II.4.1. Caractères technologiques des deux produits lactiques probiotiques.....	53
II.4.2. Test d'antagonisme sur milieu liquide.....	54
<b>Conclusion.....</b>	<b>58</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>61</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>72</b>

## Liste des abréviations

**ADN:** Acide Désoxyribo Nucléique

**ARN:** Acide Ribonucléique

**ATB:** Antibiotique

**ATCC:** American Type Culture Collection

**CMI:** Concentration Minimale Inhibitrice

**DMI :** Diamètre Minimal Inhibition

**DZI :** Diamètre de Zone d'Inhibition

**FAO :** Food and Agriculture Organization (Organisation d'Alimentation et d'Agriculture)

**GN :** Gélose nutritive

**MH :** Muller Hinton

**MRS:** Milieu de Man Rogosa et Sharpe

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé

**OX :** Disque d'oxydase

**SB :** Surnageant Brut

**SN :** Surnageant Neutralisé

**UFC/ml :** Unité Formant Colonie Par millilitre

**WGO :** World Gastroenterology Organisation (Organisation Mondiale de Gastro-entérologie)

## Liste des figures

<b>Figure n°1 :</b> <i>Bifidobacterium</i> spp sous microscope électronique.....	06
<b>Figure n°2 :</b> <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 sous microscope électronique.....	06
<b>Figure n°3:</b> <i>Saccharomyces boulardii</i> sous microscope électronique .....	07
<b>Figure n°4 :</b> Produits probiotiques utilisés.....	25
<b>Figure n°5 :</b> Schéma du protocole expérimentale.....	27
<b>Figure n°6 :</b> Shéma illustrant les différentes étapes d'antagonisme sur le milieu liquide .....	34
<b>Figure n°7:</b> Aspect macroscopique des colonies des souches étudiées.....	36
<b>Figure n°8:</b> Observation microscopique des souches étudiées après coloration de Gram (G x100).....	37
<b>Figure n°9:</b> Résultat de test catalase des trois souches étudiées .....	38
<b>Figure n°10 :</b> Résultat de test d'oxydase des trois souches étudiées .....	39
<b>Figure n°11:</b> Résultats des Galeries Api (20 E et Staph) des trois souches étudiées .....	40
<b>Figure n°12:</b> Résultats d'antibiogramme d' <i>E.coli</i> .....	43
<b>Figure n°13:</b> Résultats d'antibiogramme de <i>S.aureus</i> .....	43
<b>Figure n°14 :</b> Résultats d'antibiogramme de <i>P.aeruginosa</i> .....	44
<b>Figure n°15:</b> Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes.....	46
<b>Figure n°16:</b> Résultat de révivification de deux produits probiotiques .....	46
<b>Figure n°17:</b> Aspect macroscopique des colonies de <i>L.rhamnosus</i> .....	47
<b>Figure n°18:</b> Aspect microscopique de <i>L.rhamnosus</i> après coloration de Gram à G x100.....	48
<b>Figure n°19:</b> Résultat de test de catalase de <i>L.rhamnosus</i> .....	48
<b>Figure n°20:</b> Résultat de test d'oxydase de <i>L.rhamnosus</i> .....	49
<b>Figure n°21:</b> Résultat de pH de <i>L.rhamnosus</i> (GG et LA 801) .....	49
<b>Figure n°22:</b> Résultat de l'acidité de <i>L.rhamnosus</i> (GG et LA 801) .....	49
<b>Figure n°23:</b> Cinétique de croissance de <i>L.rhamnosus</i> (GG et LA 801) .....	50
<b>Figure n°24:</b> Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes en présence de Hcl dans le milieu liquide.....	51
<b>Figure n°25 :</b> Cinétique de croissance des trois bactéries sélectionnées en présence de surnageant neutralisé et non neutralisé de <i>L.rhamnosus</i> GG dans le milieu liquide.....	52
<b>Figure n°26:</b> Cinétique de croissance des trois bactéries sélectionnées en présence de surnageant neutralisé et non neutralisé de <i>L.rhamnosus</i> LA 801 dans le milieu liquide.....	52



## Liste des tableaux

<b>Tableau n°1:</b> Principaux microorganismes utilisés comme probiotiques chez l'homme.....	03
<b>Tableau n°2:</b> Classification des Lactobacilles .....	05
<b>Tableau n°3:</b> Effets positifs des probiotiques sur la santé humaine.....	14
<b>Tableau n°4:</b> Matériels utilisés dans notre travail.....	26
<b>Tableau n°5:</b> Antibiotiques utilisés dans notre expérimentale.....	30
<b>Tableau n°6:</b> Résultats de l'examen microscopique des souches pathogènes.....	37
<b>Tableau n°7:</b> Résultats des tests de catalase et d'oxydase des souches pathogènes .....	38
<b>Tableau n°8:</b> Identification des bactéries <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> par les galeries API 20 E.....	41
<b>Tableau n°9:</b> Identification de <i>S.aureus</i> par galerie API staph.....	42
<b>Tableau n°10:</b> Diamètre Minimal d'Inhibition des trois souches pathogènes.....	45
<b>Tableau n°11:</b> Résultats de l'examen microscopique des deux souches lactiques.....	47
<b>Tableau n°12:</b> Résultats des tests de catalase et d'oxydase des deux souches lactiques.....	48

## Liste des annexes

<b>Annexe I :</b> Composition des différents milieux de culture.....	72
<b>Annexe II:</b> Technique de coloration de Gram.....	77
<b>Annexe III:</b> Tableaux de lecture de la galerie API 20 E .....	77
<b>Annexe IV:</b> Guide de la galerie API 20E .....	79
<b>Annexe V:</b> Tableaux de lecture de la galerie API Staph .....	82
<b>Annexe VI:</b> Guide de la galerie API Staph .....	83
<b>Annexe VII:</b> Concentrations et DMI des antibiotiques utilisés.....	87
<b>Annexe VIII:</b> Standardisation 0.5Mc Farland de l'inoculum.....	88
<b>Annexe IX:</b> Tableaux de l'ensemble des résultats obtenus dans notre étude.....	89
<b>Annexe X:</b> Produits lactiques utilisés dans notre expérimentation.....	90

# **Introduction**

## Introduction

---

Les probiotiques sont des préparations alimentaires ou pharmaceutiques contenant "des microorganismes vivants non pathogènes qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, confèrent un bienfait à l'hôte" (FAO / OMS, 2002).

Depuis quelques années, les probiotiques deviennent un sujet d'étude privilégié de par le monde, ils peuvent jouer un double rôle comme agents de la fermentation alimentaire et agents bénéfiques pour la santé (WGO, 2011).

Les bactéries lactiques sont les bactéries les plus étudiées dans le domaine des probiotiques. Elles ont un rôle important dans l'amélioration de la digestion et du transit intestinal, le maintien de l'équilibre de la flore intestinale et de l'équilibre acido-basique au niveau du côlon et forment actuellement un groupe d'organismes utilisés pour l'enrichissement de certains yaourts et laits. Aussi, elles sont connues par la production des substances inhibant la croissance des bactéries indésirables ou pathogènes (Klaenhammer et al., 2007).

Parmi ces bactéries lactiques ; *Lactobacillus rhamnosus* qui est généralement associé au microbiote gastro-intestinal humain et est l'une des bactéries probiotiques les plus étudiées (Lopes et al., 2017).

Des études cliniques menées dans le cadre du projet (Burden of Resistance and Disease) ont montré que *Escherichia coli*, et *Staphylococcus aureus* sont les causes de nombreuses maladies infectieuses dans le monde, elles sont parmi les bactéries les plus résistantes aux antibiotiques (De Kraker et al., 2011).

L'antibiorésistance est un problème majeur en termes de santé humaine au niveau international. De ce fait, l'émergence et la diffusion croissante de souches des bactéries résistantes aux antibiotiques remettent en question l'efficacité de ces traitements dont l'alternative de ce problème pourrait être la consommation des bactéries probiotiques.

L'objectif de notre étude est d'évaluer *in vitro* l'effet inhibiteur de deux ferments lactiques: *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Lactobacillus rhamnosus* LA80I sur trois bactéries pathogènes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et de rechercher leurs agents antibactériens (acide lactique et bactériocines).

**Première Partie**  
**Synthèse Bibliographique**

# **Chapitre I**

## **Les probiotiques**

### I.1. Historique

Il existe depuis longtemps des allégations de santé concernant les micro-organismes vivants dans les aliments, en particulier les bactéries lactiques. Dans une version de l'Ancien Testament, il déclare que «Abraham devait sa longévité à la consommation de lait aigre». En 76 av. J.-C., l'historien romain Plinius recommandait l'administration de produits laitiers fermentés pour traiter la gastro-entérite. Depuis l'avènement de l'ère de la microbiologie, certains chercheurs [par exemple, Carre, Tissier et Metchnikoff] ont attribué de tels effets sur la santé aux changements de l'équilibre microbien intestinal (**Schrezenmeir et Michael, 2001**).

Elie Metchnikov ou Metchnikoff (1845-1916) arrive à l'Institut Pasteur en 1896. Il est convaincu que les bacilles lactiques ont des propriétés bienfaisantes sur la santé humaine et qu'elles devraient en prolonger la vie, comme l'indique le titre de son fameux livre publié à Londres en 1907 (**Luquet et Corrieu, 2008**).

A cette époque, Henry Tissier, pédiatre français, a observé que les selles des enfants souffrant de diarrhée contenaient un petit nombre de bactéries caractérisées par une morphologie particulière en forme de Y. Ces bactéries "bifides" étaient au contraire abondantes chez les enfants sains (**Tissier, 1906**). A son avis, ces bactéries pourraient être administrées aux patients souffrant de diarrhée pour aider à rétablir une flore intestinale saine (**FAO/OMS, 2001 a**).

### I.2. Définition

La définition du terme probiotique a évolué avec le temps et la réflexion des chercheurs, des industriels et des spécialistes de la communication au grand public. Lilly et Stilwell furent apparemment les premiers, en 1965, à utiliser le terme pour désigner des « facteurs promoteurs de croissance produits par des micro-organismes » Parker, en 1974, proposa d'élargir la définition à des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ». Cependant, en 1991, Fuller reprocha à la définition de Parker d'être trop large et d'inclure potentiellement les antibiotiques et proposa alors : « des micro-organismes ajoutés à l'alimentation et influençant de manière bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale » (**Rambaud et al., 2004**).

Depuis Pasteur, on appelle probiotique, une préparation bactérienne généralement à base de bactéries lactiques intestinales utilisée sous forme revivifiable à des fins nutritionnelles et /ou thérapeutiques. Le yaourt lui-même peut être considéré comme un probiotique (**Bouix et Leveau, 1993**).

L'emploi du terme probiotique, l'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture (FAO) jointe à l'organisation Mondiale pour la santé (OMS) définit les probiotiques comme « des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice sanitaire à leur hôte » (Coyette et Mergeay, 2013).

### I.3. Classification

La majorité des microorganismes probiotiques appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Il existe également d'autres genres de bactéries et certaines levures qui sont largement utilisées (Tab n°1) (Malago et al., 2011).

**Tableau n°1** : Principaux microorganismes utilisés comme probiotiques chez l'homme (Selon Piquepaille, 2013).

Bactéries lactiques			Bactéries non lactiques et levures
Espèces de <i>Lactobacillus</i>	Espèces de <i>Bifidobacterium</i>	Autres	
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>		
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaris</i>	<i>B. infantis</i>	<i>S. thermophilus</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>L. helveticus</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. lactis</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			
<i>L. salivarius</i>			

#### I.3.1. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (Luquet, 1986). Elles sont le plus souvent immobiles, jamais sporulées, catalase négative, oxydase négative, anaérobies facultatives et micro-aérophiles (Sauadogo et Traore, 2011).



Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orza-Jenses (1919) et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique **(Bouix et Leveau, 1993)**. Au cours de fermentation des glucides, on peut distinguer les bactéries lactiques homofermentaires et bactéries lactiques hétérofermentaires **(Oteng Gyang, 1984)**.

#### **I.3.1.1. *Lactobacillus***

*Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries **(Guiraud, 2012)**.

Il s'agit de bacilles souvent allongés, Gram +, asporulés, parfois groupés en paires ou en chaînes, généralement immobiles. Ils sont catalase - **(Bourgeois et Larpent, 1996)**.

Ils sont anaérobies facultatifs (à l'exception de quelques souches) ou microaérophiles, immobiles, dépourvus de catalase (ne possédant pas de catalase, certaines souches possèdent une pseudocatalase) et d'oxydase. Toutes les espèces peuvent se développer de 30 °C à 37 °C **(Zein et al., 2008)**.

Les lactobacilles sont les bactéries majoritairement utilisées comme probiotiques, en particulier *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus rhamnosus*, car ces trois espèces offrent une bonne résistance à l'acidité gastrique et présentent une forte capacité d'adhérence aux cellules intestinales **(Bernardeau et al., 2008)**.

Tableau n°2: Classification des Lactobacilles (Selon Kandler et Weiss, (1986)).

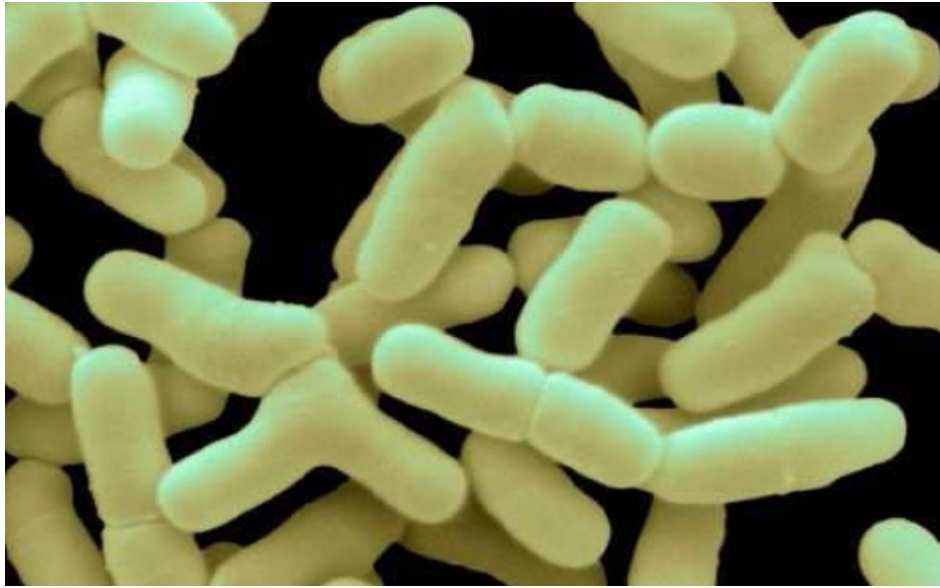
Les groupes	Caractéristiques	Les complexes	Exemple : espèces et sous-espèces
Groupe I	Homofermentaires strict fermentent les hexoses par voie E.M.P, ne fermentent ni gluconate ni les pentoses.	<i>Lb. delbrueckii</i>	Trois sous-espèces : <i>delbrueckii, lactis, bulgaricus</i>
		<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. acidophilus, Lb. heverticus Lb. amylovorus, Lb. crispatus, Lb. gassaeri, Lb. gallinarum, Lb. johnsonii</i>
		Autres espèces	<i>Lb. intestinalis, Lb. jonsonii, Lb. aviarius, Lb. hamsteri Lb. kefirano-faciens, Lb. mali, Lb. acetotolerans, Lb. ruminus, Lb. vitulinus.</i>
Groupe II	Hétérofermentaires facultatifs, fermentent les hexoses par E.M.P et les pentoses	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. plantarum, Lb. pentosus et Lb. agilis</i>
		<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. casei, Lb. paracasei, Lb. rhammosus.</i>
		<i>Lb. bavaricus</i>	<i>Lb. bavaricus, Lb. curvatus, Lb. sake</i>
		Autres espèces	<i>Lb. uli, Lb. graminis.</i>
Groupe III	Hétérofermentaires stricts fermentent les hexoses et les pentoses.	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. fermentum, Lb. cellobiosis, Lb. reuteri et Lb. vavaginalis.</i>
		<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. brevis, Lb. buchneri, Lb. kefir Lb. hilgardii, Lb. collinoides Lb. oris, Lb. sanfrancisco Lb. malfermentans.</i>
		Autres espèces	<i>Lb. fructivorans, Lb. suebicus, Lb. bifermentans (seule espèce capable, selon le pH, de dégrader le glucose en acide acétique).</i>

E.M.P: Embden-Meyrhof-Panas

Lb : *Lactobacillus*

### I.3.1.2. *Bifidobacterium*

Ces bactéries sont des batonnets de morphologie variée, avec des cellules courtes, coccoïdales, ramifiées, bifurquées, spatulées, isolées ou en chaînes, disposées en V ou en palissade. Elles sont Gram +, non acido-alcoolorésistantes, non sporulées, immobiles, anaérobies, bien que quelques espèces tolèrent l'oxygène en présence de CO<sub>2</sub>, de nombreux facteurs du milieu modifiant la morphologie de la bactérie: concentration en N-acétyl glucosamine, en acides aminés (alanine, acide aspartique, acide glutamique et sérine), et en ions Ca<sup>+2</sup> (fig.1) (Larpent, 1997).



**Figure n°1:** *Bifidobacterium* spp sous microscope électronique (Selon Wallace et al., (2003))

### I.3.2. Bactéries non lactiques

Certains micro-organismes n'appartenant pas en ferments lactiques. *E. coli* Nissle 1917 (Fig.2) est la seule souche avec une paroi à coloration de Gram négative, et reconnue pour ses propriétés probiotiques. Ce sont des bacilles non sporulants ayant un type respiratoire aéro-anaérobie, cette souche a aussi démontré son efficacité à réduire le temps des diarrhées chez les enfants (Henker et al., 2007).

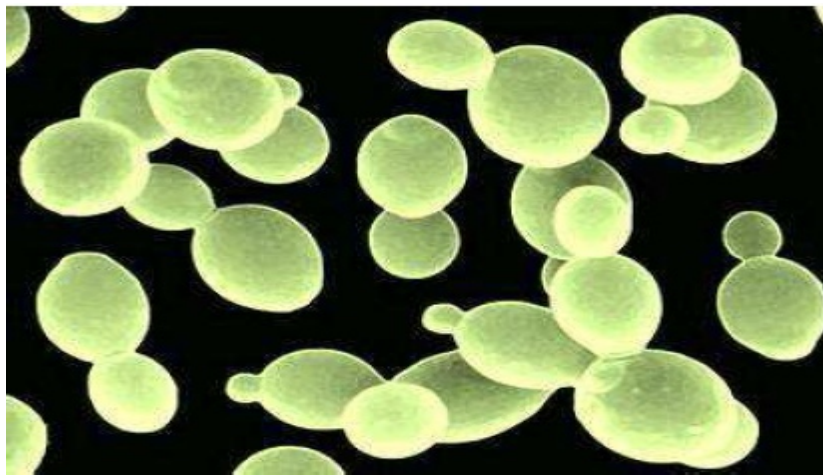


**Figure n°2 :** *Escherichia coli* Nissle 1917 sous microscope électronique (Selon Kramer et al.,(2006))

### I.3.3. Levures

Les levures ont été utilisées en alimentation surtout dans la panification et la vinification, depuis l'antiquité. Aujourd'hui, elles sont toujours employées pour produire de l'alcool, de la bière, et d'autres boissons alcoolisées (**Oteng-Gyang, 1984**).

La levure *Saccharomyces boulardii* lyophilisée Biocodex (Sb-B), se présente sous forme de cellules isolées, ovoïdes à arrondies (**Fig. 3**) est un médicament probiotique prescrit pour ses propriétés anti-diarrhéiques dans le cas des infections bactériennes et suite à des traitements par antibiotiques (**Raoult et Obadia, 2010**).



**Figure n°3:** *Saccharomyces boulardii* sous microscope électronique (Selon **Rampal, (1996)**)

## I.4. Critères de sélection des souches

### I.4.1. Critères de sécurité

Les bactéries susceptibles d'être produites et utilisées comme ferments lactiques ou probiotiques ne doivent évidemment pas présenter de caractère pathogène et ne pas générer de substance toxique. C'est le cas de la plupart des espèces de bactéries lactiques, qui possèdent le statut GRAS (Generally Recognized as Safe), à l'exception de certains entérocoque (**Dridier et Prevost, 2009**).

Une souche probiotique est identifiée par son genre, son espèce, et par des caractères alphanumériques. Dans la communauté scientifique, il existe une nomenclature reconnue et acceptée pour les micro-organismes par exemple, *Lactobacillus casei* DN-114 001 ou *Lactobacillus rhamnosus* GG (**WGO, 2011**). L'identification des souches (typage génique) pourrait être faite à l'aide d'une méthode comme l'électrophorèse en champ pulsé. Il est recommandé que les tests phénotypiques soient effectués avant, suivis d'une identification

génétique, à l'aide de méthodes telles que l'hybridation ADN/ARN, le séquençage d'ARN 16s ou d'autres méthodes internationalement reconnues **(FAO/OMS, 2001a)**.

Les préparations de ferments commerciaux doivent, en outre, être exemptes de substances infectieuses ou susceptibles de provoquer des problèmes d'hygiène. Elles ne doivent pas contenir de contaminants tels que des coliformes, des levures ou des moisissures.

#### **I.4.2. Critères fonctionnels**

Les probiotiques doivent être en mesure d'exercer leurs avantages sur l'hôte par la croissance et / ou l'activité dans le corps humain. Cependant, c'est la spécificité de l'action, et pas la source du micro-organisme qui est importante. En effet, il est très difficile de confirmer la source d'un micro-organisme. Les bébés naissent avec aucune de ces bactéries dans l'intestin, et l'origine de la microflore intestinale n'a pas été entièrement élucidée. C'est la capacité à rester viable sur le site cible et à être efficace qui doit être vérifiée pour chaque souche potentiellement probiotique **(FAO / OMS, 2002)**.

Il est nécessaire d'affiner les tests *in vitro* afin de prévoir l'aptitude des probiotiques à fonctionner chez l'homme. Les tests actuellement disponibles ne permettent pas de prévoir le fonctionnement des microorganismes probiotiques dans l'intestin **(FAO/OMS, 2001a)**.

La capacité d'adhésion à la couche intestinale est un critère de sélection recommandé pour le choix des probiotiques, parce que c'est une condition pour la colonisation des entrailles. L'adhérence constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes. Elle est basée sur la réalisation d'un ensemble de tests *in vitro* puis *in vivo* en utilisant des cellules d'origine animale et/ou humaine **(Palomares et al., 2007; Reyes-Gavilan et al., 2011)**.

En plus du pouvoir d'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin, les probiotiques peuvent se fixer au mucus qui recouvre les entérocytes ou aux divers microorganismes que l'on retrouve dans le tractus gastro-intestinal **(Lamoureux, 2000)**.

#### **I.4.3. Critères technologiques**

Le choix et la sélection des souches ont pour finalité d'élaborer un produit possédant des allégations santé. Afin de pouvoir bénéficier de leurs propriétés, les souches retenues doivent supporter les différentes étapes de la fabrication du produit probiotique fini et retrouver leur pleine efficacité lors de leur utilisation **(FAO/OMS, 2002)**. La sélection de souches doit intégrer des critères technologiques et physiologiques comme la viabilité et la survie des souches dans le produit. En effet, des souches probiotiques potentiellement intéressantes sur des critères fonctionnels ne sont d'aucun intérêt si elles ne peuvent être utilisées en production industrielle. Or, même si le procédé industriel peut s'adapter à certaines spécificités, des

contraintes technologiques incontournables doivent être respectées. Aussi les souches doivent satisfaire à trois étapes essentielles :

- La propagation et la production de la souche à grande échelle et son conditionnement en vue d'une utilisation ultérieure ;
- L'adaptation au milieu dans lequel elle sera utilisée : le lait ;
- La survie dans un produit fini pendant plusieurs semaines à 10°C.

Enfin, aucune de ces étapes ni leur succession ne doit affecter les propriétés santé pour lesquelles la souche a été sélectionnée **(Luquet et Corrieu, 2008)**.

### **I.5. Mécanismes d'action**

Les mécanismes d'action des probiotiques sont encore imparfaitement élucidés, les chercheurs avancent que l'influence des probiotiques s'exercerait de trois manières : sur le système immunitaire, sur le microbiote normal humain et contre les microbes nuisibles. Il semblerait que les probiotiques aient un effet modulateur positif sur le système immunitaire – une sorte d'effet de renforcement qui fait en sorte que nos défenses sont plus fortes contre les microbiotes pathogènes **(Tortora et al., 2012)**. Celui-ci se traduit par inhibition des bactéries indésirables (diminution du pH intestinal, compétition pour un acide aminé, production des substances antimicrobiennes comme d'eau oxygénée, des antibiotiques, des bactériocines **(Veissier et René, 2003)**).

#### **I.5.1. Compétition pour les nutriments**

L'inhibition de la croissance des pathogènes peut également s'effectuer par un processus de restriction des nutriments. Il est évident que la capacité des micro-organismes à entrer en compétition pour limiter les nutriments disponibles est un facteur non négligeable qui détermine la composition du microbiote. Ainsi, une augmentation du nombre de lactobacilles obtenu lors d'un traitement probiotique permettrait de diminuer les substrats disponibles pour l'implantation de micro-organismes pathogènes **(Fooks et Gibson, 2002)**.

#### **I.5.2. Compétition pour les sites d'attachement**

Les probiotiques pourraient agir en inhibant l'implantation des germes pathogènes par compétition pour la colonisation. Certains probiotiques ont une capacité d'adhérence à l'épithélium digestif, ceci peut être étudié *in vitro* avec des lignées cellulaires immobilisées, et/ou au mucus intestinal. Cette propriété pourrait constituer un avantage écologique favorisant les chances d'inter-relations étroites avec l'épithélium entérocytaire et le système immunitaire local. Certains lactobacilles adhèrent aux villosités intestinales et inhibent la fixation d'*Escherichia coli* entéro-pathogènes **(Robin et Rouchy, 2002)**.



Les mécanismes de compétition de l'adhésion se font généralement de deux façons. Ils peuvent survenir de façon spécifique par l'intermédiaire des adhésines ou de façon non-spécifique en impliquant des interactions électrostatiques ou hydrophobes, des forces passives et stériques (Servin et Coconnier, 2003).

### I.5.3. Production de composés antimicrobiens

Les bactéries lactiques sont connues pour produire, lors de leur croissance, des substances inhibant la croissance d'autres micro-organismes. Cette caractéristique est utilisée pour la destruction des bactéries indésirables ou pathogènes dans la fabrication des aliments. La plupart de ces composés ne sont caractérisés ni par leur nature biochimique ni par leur mécanisme d'action. Souvent même, les produits actifs ne sont que des métabolites excrétés par la bactérie comme l'acide lactique ou des dérivés du métabolisme de l'oxygène tels que le peroxyde d'hydrogène, devant l'incertitude actuelle de la distinction entre les différents composés : antibiotique, bactériocines, participant à la défense des bactéries productrices contre d'autres micro-organismes (Bouix et Leveau, 1993).

#### a. Acide lactique

Le métabolisme principal des bactéries lactiques a pour effet une production importante d'acide lactique conduisant à une acidification rapide et durable. Le pH final dépend de la matière première fermentée et des souches utilisées (plus ou moins acidifiantes). L'effet de pH est renforcé par la forme sous laquelle se trouvent l'acide lactique et les autres acides organiques produits lors des fermentations. En effet, la forme non dissociée de l'acide lactique qui est prédominante à pH acide est généralement plus toxique pour les cellules microbiennes, l'effet d'inhibition peut donc s'exercer à un pH permettant normalement la croissance d'une flore contaminante (Federighi, 2005).

#### b. Peroxyde d'hydrogène

En général, les bactéries lactiques sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène (Van de Guchte et al., 2001) qui permet de transformer l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) en super oxyde excité ( $O_2^-$ ), en peroxyde ( $H_2O_2$ ) ou en eau ( $H_2O$ ). Le peroxyde d'hydrogène possède donc un effet inhibiteur sur la croissance de micro-organismes ne possédant aucun système de défense adéquat comme les catalases (Touati, 2000).

#### c. Diacétyl

Le diacétyl ( $C_4H_6O_2$ ) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (El Ziney et al., 1998).

Cependant, le diacétyle peut agir synergiquement avec d'autres facteurs antimicrobiens et contribuer aux systèmes combinés de conservation en nourritures fermentées (**Jay, 1992**).

#### **d. Dioxyde de carbone**

Les bactéries lactiques hétérofermentaires sont capables de produire le CO<sub>2</sub>. Il crée des conditions anaérobies dans le milieu, pouvant conduire à l'élimination de bactéries aérobies strictes. Le CO<sub>2</sub> peut aussi empêcher la croissance de beaucoup des microorganismes de détérioration, particulièrement les bactéries psychotrophes à Gram – (**Farber, 1991**).

#### **e. Bactériocines**

Les bactériocines sont des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Elles 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 (**Klaenhammer, 1988**). Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram+. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram- n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram- ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité. Semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire (**Dortu et Thonart, 2009**).

#### **I.5.4. Immunomodulation**

Plusieurs expériences chez l'homme et l'animal montrent que certaines bactéries lactiques ingérées peuvent moduler des fonctions des systèmes immunitaires ; certains constituants des parois cellulaires ont un effet dans l'immunomodulation. Des études plus spécifiques portant sur la production d'anticorps ont montré que l'ingestion de *Lb rhamnosus GG* raccourcit la durée des diarrhées causés par les rotavirus et stimule en parallèle la production d'anticorps contre les rotavirus (**Drouault et Corthier, 2001**).

Toutefois, les modalités précises de ces interactions ne sont pas totalement élucidées à ce jour : bien que de nombreux récepteurs spécifiques de différents composants bactériens (constituants pariétaux, flagelline, ADN), aient été identifiés (les récepteurs Toll) comme relais de cette communication, la hiérarchisation et les interconnexions entre les signaux cellulaires qu'ils génèrent ne sont pas décryptées. Des nombreux travaux indiquent que des espèces de bactéries propioniques lactiques (bifidobactéries et *Lactobacillus*, principalement) dont certains sont représentatives des populations intestinales, sont capables de moduler la production des molécules de signalisation (chémiokines et cytokines). Ce potentiel est



confirmé par des études *in vivo*, basées sur l'utilisation de ces souches bactériennes comme probiotique chez l'animal ou chez l'homme (**Drider et Prevost, 2009**).

### **I.6. Effet santé des probiotiques**

Les effets positifs des probiotiques sur la santé humaine sont résumés comme suit (Tab.3).

#### **I.6.1. Amélioration de la digestion du lactose**

Les probiotiques permettent d'améliorer la digestibilité de nombreux nutriments : leur rôle essentiel est de garantir une bonne hygiène digestive en favorisant la dégradation et l'absorption de certains aliments. L'intolérance au lactose est due à l'absence de l'assimilation du lactose, le principal glucide du lait. Celle-ci est la conséquence d'un défaut de synthèse de  $\beta$ -galactosidase, l'enzyme digestive du lactose. Cette anomalie provoque de nombreux troubles gastro-intestinaux chez les sujets sensibles. De multiples travaux ont montré que la  $\beta$ -galactosidase véhiculée par certaines bactéries lactiques participait dans l'intestin à la digestion du lactose.

La  $\beta$ -galactosidase retrouvée dans les bactéries du yaourt a une membrane qui est très facilement attaquée par les acides biliaires (sécrétés lors de la digestion). Ceci explique l'excellente digestion du lactose du yaourt (90 %) (Contenant les deux bactéries *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) chez les sujets déficients en  $\beta$ -galactosidase (**Robin et Rouchy, 2002**).

L'intérêt éventuel d'une amélioration de la digestion du lactose chez les enfants en bas âge n'est donc pas connu, et il semble qu'aucune donnée n'a été publiée montrant un bénéfice de l'addition d'un prébiotique ou d'un probiotique pour la digestion du lactose chez le nourrisson et le jeune enfant (**Vidailhet, 2003**).

#### **I.6.2. Prévention des diarrhées infectieuses**

L'effet de probiotiques sur les diarrhées a été largement étudié, et leur efficacité dans la prévention et le traitement des diarrhées de différentes étiologies a été démontré, principalement lors de la mise en oeuvre des souches *Lactobacillus rhamnosus GG* et *Saccharomyces boulardii* (**Jones, 2010**).

L'effet des probiotiques sur les infections a fait l'objet de nombreux essais cliniques depuis plus de 30 ans. L'intérêt du yaourt sur le traitement des diarrhées infectieuses chez l'enfant a été montré pour la première fois par l'équipe de Niv et *al*, (1963). Depuis, le nombre d'études avec différents probiotiques, sous différentes formes (lait fermenté, lait infantile ou gélules de lyophilisat), pour diverses cibles étudiées (enfants ou adultes) et types de diarrhées (virales ou bactériennes) n'a fait qu'augmenter avec un faisceau de résultats

montrant un effet plutôt positif des probiotiques, ou du moins de certaines souches ou lait fermenté aux probiotiques, sur le traitement et /ou prévention des diarrhées (**Roberfroid et al., 2008** ).

### **I.6.3. Allergie**

L'évidence la plus forte réside dans la prévention de la dermatite atopique lorsque certains probiotiques sont administrés à des femmes enceintes ou à des nouveaux nés de moins de 6 mois. Cependant, un essai clinique n'a pas confirmé ces résultats. En ce qui concerne le traitement des maladies allergiques, quelques études contrôlées ont prouvé que des souches spécifiques de probiotiques pouvaient être efficaces dans le traitement d'un sous-groupe de patients avec eczéma atopique. On connaît peu de choses sur l'efficacité des probiotiques dans la prévention de l'allergie alimentaire (**WGO, 2008**).

### **I.6.4. Prévention du cancer du colon**

La flore intestinale et le système immunitaire jouent un rôle dans la cancérogenèse colique. Plusieurs études ont montré que certains probiotiques pourraient diminuer l'activité d'enzymes, de mutagènes ou des acides biliaires secondaires dans les selles et seraient impliqués dans le processus de cancérogenèse colique (**Marteau et al., 2003**).

**Tableau n°3** : Effets positifs des probiotiques sur la santé humaines (selon **Esther, (2009)**).

Effets probiotiques	Mécanismes d'activités proposées
Amélioration de la digestion de lactose	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Action de la <math>\beta</math>-galactosidase bactérienne dans l'intestin grêle.</li> </ul>
Diminution des allergies alimentaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité intestinale</li> <li>▪ Stimulation du système Immunitaire</li> </ul>
Réduction du risque des diarrhées	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Resistance à la colonisation par des bactéries pathogènes.</li> <li>▪ Stimulation du système immunitaire</li> </ul>
Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Modulation de la flore intestinale</li> <li>▪ Stimulation du système immunitaire</li> </ul>
Réduction du cholestérol	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Assimilation du cholestérol.</li> <li>▪ Déconjugaison des sels biliaires.</li> </ul>
Prévention du cancer du colon	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Stimulation du système immunitaire.</li> <li>▪ Production de composés antimutagéniques.</li> <li>▪ Modulation des enzymes fécales carcinogéniques.</li> <li>▪ Inhibition de carcinogènes</li> </ul>

## I.7. Effets indésirables

### I.7.1. Infection

Les probiotiques ne sont pas sélectionnés parmi des pathogènes, aussi, le risque d'infection est-il particulièrement bas. De rares cas d'infections locales ou systémiques incluant des septicémies ou des endocardites. Dues à des lactobacilles ou des bifidobactéries ont été rapportées. Pour résumer, le risque d'infection est très bas et il n'y a pas d'évidence que les probiotiques posent un risque d'infection plus important que les souches commensales. Pratiquement, toutes les infections ont été observées chez des sujets ayant des conditions prédisposantes tout particulièrement des anomalies valvulaires en cas d'endocardite ou la présence de cathéters pour ce qui est des septicémies. Les données sont encore insuffisantes sur les risques ou bénéfices des probiotiques en cas de déficit immunitaire (**Luquet et Corrieu, 2008**).

### I.7.2. Effets indésirables métaboliques

Si on admet que les probiotiques peuvent véhiculer ou promouvoir des activités bénéfiques dans le tractus gastro-intestinal, il pourrait aussi avoir des effets négatifs sur la santé par le même mécanisme. Les concentrations de micro-organismes transitant dans l'intestin grêle après l'ingestion de probiotiques sont souvent du même ordre de grandeur que ce qui est observé au cours de la colonisation bactérienne chronique du grêle. Une étude a attiré l'attention sur un risque potentiel d'une déconjugaison excessive ou d'une déshydroxylation des acides biliaires dans l'intestin grêle par des probiotiques. En effet, elle montrait, chez des sujets porteurs d'une iléostomie qui ingéraient *Lactobacillus acidophilus* et un *Bifidobacterium*, que ces deux micro-organismes transformaient significativement les acides biliaires primaires dans l'intestin grêle en acides biliaires secondaires libres. Une dégradation excessive du mucus intestinal pourrait également être un effet indésirable de certains probiotiques. Ruseler van Embden a étudié les effets des trois souches probiotiques *in vitro* et *in vivo* chez des rats génotobiotiques. Dans ce travail, les trois souches de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus rhamnosus* ne dégradait pas le mucus (**Sauadogo et Traore, 2011**).

### I.7.3. Effets indésirables immunologiques

L'administration parentérale de composants de parois bactériennes tels que les peptidoglycanes peut induire de la fièvre, des arthrites et maladies auto-immunes. Ces effets sont médiés par les cytokines et il est désormais bien établi que la sécrétion de cytokines est induite par de nombreux probiotiques. L'administration orale de fortes doses de probiotiques n'a pas induit d'effets indésirables immunologiques chez la souris, mais un passage

systémique accru de polymères de parois bactériennes a été observé chez le rat porteur de lésions coliques ou en cas de colonisation bactérienne chronique de l'intestin grêle. Un seul effet immunologique indésirable a été observé chez l'homme et non détaillée d'hépatite auto-immune qui aurait été aggravée par l'ingestion de très fortes quantités de yaourt. La modulation potentielle de maladies auto-immunes par ingestion de probiotiques suscite des travaux plus approfondis (**Sauadogo et Traore, 2011**).

## **I.8. Applications des probiotiques**

### **I.8.1. Applications alimentaires**

Aujourd'hui, une augmentation des connaissances sur les aliments fonctionnels a conduit à développer des aliments ayant des avantages pour la santé au-delà d'une nutrition adéquate. Les 20 dernières années ont montré un intérêt accru chez les consommateurs pour les aliments fonctionnels. Les probiotiques utilisés comme supplément alimentaire, de même que les aliments fonctionnels, sont considérés comme des denrées alimentaires. Ils sont généralement associés aux produits laitiers de culture, les protéines dans les produits laitiers produisent un effet tampon lorsque le probiotique traverse le milieu agressif du système digestif, et la réfrigération accroît la stabilité et prolonge la durée de conservation des probiotiques (**Ninane et al., 2009**).

Les probiotiques offrent une protection additionnelle aux organismes probiotiques et de nouvelles façons d'inclure des probiotiques dans les produits alimentaires. La gamme de produits probiotiques comprend maintenant des fromages, des crèmes glacées et des yogourts glacés de même que des aliments et des boissons non laitiers (**Patterson, 2008**).

Le lait et ses produits sont de bons véhicules de souches probiotiques en raison de leurs propriétés inhérentes et du fait que la plupart du lait et des produits laitiers sont stockés à des températures réfrigérées. Les probiotiques peuvent être trouvés dans une grande variété de produits laitiers commerciaux. Les produits laitiers jouent un rôle important dans la transmission des bactéries probiotiques aux humains (**Song et al., 2012**).

### **I.8.2. Applications pharmaceutiques**

L'application de bio-ingénierie biochimique pour la production de probiotiques était non seulement pour améliorer la viabilité, mais aussi pour produire des exopolysaccharides (EPS) avec des caractéristiques prébiotiques, lorsque les probiotiques et les prébiotiques se combinent pour former le synbiotique. Le terme synbiotique est utilisé pour décrire des produits composés à la fois de probiotiques et de prébiotiques (**Nguyen et al., 2016**).

# **Chapitre II**

## ***Lactobacillus rhamnosus***

### II.1. Historique

La souche de *L. rhamnosus* est isolée à l'origine en 1983 du tractus intestinal d'un être humain en bonne santé; **Sherwood Gorbach** et **Barry Goldin** ont déposé une demande de brevet le 17 avril 1985.

L'histoire de cette souche provient d'une étude microbiologique réalisée en 1987.

**Goldin** et son collègue **Gorbach** ont publié les résultats de leur étude sur le traitement de la colite récidivante à *Clostridium difficile* avec la souche *Lactobacillus*. Cette nouvelle approche thérapeutique a été rapidement brevetée. Le brevet présenté par **Sherwood Gorbach** et **Barry Goldin** fait référence à une souche de "*L. acidophilus GG*" portant le numéro d'accès 53103 à l'American Type Culture Collection (ATCC); Peu de temps après, cette souche a été revue et identifiée comme un membre de l'espèce *L. rhamnosus*. Le brevet a prétendu que la souche de *L. rhamnosus GG* (ATCC 53103) est stable aux acides et aux biliaires, ce qui est reconnu comme une propriété obligatoire des souches fonctionnellement probiotiques (**Papzadeh et al., 2016**).

### II.2. Classification

La souche de *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) est l'une des bactéries probiotiques les plus utilisées et les mieux documentées. Sa présence notable dans les pharmacies indique que cette variété a bénéficié d'une attention soutenue de la part de médecins praticiens et développeurs d'aliments fonctionnels (**Muller et al., 2009**).

- **Classification de *L.rhamnosus GG***

Domaine : Bacteria

Embranchement : Firmicute

Classe : Bacilli

Ordre : Lactobacillales

Famille : *Lactobacillaceae*

Genre : *Lactobacillus*

Espèce : *rhamnosus* (**Felis et Dellalio, 2015**)

Souche : *GG*

- **Classification de *L.rhamnosus LA801***

Domaine : Bacteria

Embranchement : Firmicute

Classe : Bacilli

Ordre : Lactobacillales

Famille : *Lactobacillaceae*

Genre : *Lactobacillus*

Espèce : *rhamnosus* (Felis et Dellalio, 2015)

Souche : LA801

### II.3. Habitat

Les bactéries lactiques sont présentes dans de nombreux milieux naturels, allant du sol, des plantes en décomposition, aux animaux. Chez ces derniers, on les trouve dans les cavités buccales et vaginales, les fèces et le lait. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques comme *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weissella* (Klein et al., 1998).

*L. rhamnosus* est une espèce ayant une capacité d'adaptation écologique couvrant une gamme d'habitats corporels, comme en témoignent les nombreuses souches isolées du tractus gastro-intestinal, des voies respiratoires, des cavités buccales et vaginales, des glandes mammaires en lactation et des pathologies cliniques (Kant et al., 2014).

### II.4. Caractéristiques de *Lactobacillus rhamnosus*

#### II.4.1. Caractères généraux

*Lactobacillus rhamnosus* est une bactérie à Gram positif, non sporulée, facultative anaérobie ou microaérophile, non motile et catalase négative. Elle appartient à des organismes mésophiles, mais en fonction de la souche, Les *Lactobacillus* sont caractérisés par leur métabolisme facultativement hétérofermentaire, elle est utilisée dans l'industrie alimentaire non seulement comme probiotique mais aussi comme culture protectrice dans les produits laitiers fermentés et non fermentés (Valik et al., 2008).

Elle croît aux températures comprises entre 15 et 45°C, mais au mieux à 37°C, et dans une plage de pH allant de 4.0 à 7.0 (Dubach, 2002).

*Lactobacillus rhamnosus* est une bactérie naturelle isolée à l'origine de l'intestin humain sain (Yan et al., 2013).

#### II.4.2. Caractères génétiques

Une étude génomique a trouvé les îlots spécifiques au *L.rhamnosus* qui comprennent des gènes codant pour les composants du bactériophage, le métabolisme et le transport du sucre, et la biosynthèse des exopolysaccharides Il en résulte que la taille du génome du base est estimée à environ 2 095 gènes et représente environ 43% de l'ensemble du génome (Yan et Polk, 2012).

Des détails supplémentaires sur les gènes de noyau de *L. rhamnosus*, y compris beaucoup de différents locus impliqués dans les fonctions essentielles d'entretien (ex: réplication de



l'ADN, transcription de l'ARNm, synthèse et dégradation des protéines, transport et biosynthèse / utilisation des glucides et adhésion cellulaire) ont été décrits par **Kant et al (2014)**.

### II.4.3. Caractères spéciaux

*Lactobacillus rhamnosus* est la souche probiotique la plus étudiée depuis son identification en 1985 par **Sherwood Gorbach** et **Barry Goldin**. L'adhésion de *Lactobacillus rhamnosus* est fondamentale pour l'exclusion compétitive vis-à-vis des autres micro-organismes, en particulier le cas de la compétition pathogène, elle a été montrée pour survivre à la partie supérieure du tractus gastro-intestinal lui permettant de se fixer aux cellules épithéliales intestinales. Plusieurs études montrent non seulement que *Lactobacillus rhamnosus* survit au tractus gastro-intestinal, mais démontre également sa capacité à se lier à la muqueuse du gros intestin (**Saxelin et al., 2010**).

*Lactobacillus rhamnosus* a révélé des pili contenant une protéine liant le mucus humain (**Kankainen, 2009**). Des études *in vitro* ont montré que la fixation de *Lactobacillus rhamnosus GG* est nécessaire pour l'atténuation de la réponse immunitaire (**Lebeer, 2012**).

Des effets bénéfiques à court terme de l'administration de *L.rhamnosus* aux nourrissons et aux jeunes enfants atteints de diarrhée infectieuse ont été signalés dans un certain nombre d'études, mais un effet prophylactique sur la diarrhée n'a pas été documenté. De plus, alors que certaines études ont rapporté un effet prophylactique (**VKM, 2007**).

### II.5. Effet santé de *Lactobacillus rhamnosus*

Les effets bénéfiques de *Lactobacillus rhamnosus* pour la santé ont été et sont toujours, et de plus en plus, étudiés dans de nombreux hôpitaux et universités dans le monde entier. En Estonie, Finlande, Grande Bretagne, Italie, Japon, Pakistan, Pérou, Thaïlande, USA etc., *Lactobacillus rhamnosus* a été testé scientifiquement en milieu hospitalier, en ce qui concerne l'utilisation thérapeutique et prophylactique sur des humains sains et malades. Ceci a donné lieu à un grand nombre de publications scientifiques accessibles au public.

Les recherches ayant été fortement intensifiées depuis le début des années 90, *Lactobacillus rhamnosus* est aujourd'hui la lactobactérie probiotique la mieux étudiée (**Dubach, 2002**).

#### II.5.1. Diarrhée de l'enfant

La diarrhée infectieuse est un problème de santé mondial majeur, responsable de plusieurs millions de décès chaque année. Alors que la majorité des décès surviennent chez les enfants des pays en développement, on estime que jusqu'à 30% de la population, même dans les pays développés, est touchée par la diarrhée d'origine alimentaire chaque année.

La plus forte preuve d'un effet bénéfique de souches définies de probiotiques a été établie en utilisant *Lactobacillus rhamnosus* pour la prévention et le traitement de diarrhée aiguë principalement causée par les rotavirus chez les enfants **(FAO/OMS, 2001b)**.

#### **II.5.1.1. Prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques**

Les diarrhées associées aux antibiotiques (DAA) constituent un domaine où de nombreuses études montrent le bénéfice des probiotiques dans la prévention ou le traitement de la maladie. Ces études portent notamment sur une variété de probiotiques, des lactobacilles. Les bénéfices se traduisent par une réduction du risque ou de la durée de la diarrhée **(Bresson, 2012)**.

Dans près de 10 % des cas, une antibiothérapie provoque l'apparition de troubles gastro-intestinaux, les plus fréquents étant les diarrhées. L'érythromycine, en particulier, est une cause fréquente de ce type de problème. Pour les 5 à 30 % des patients qui développeront une DAA, deux souches ont montré une efficacité, qui est cependant variable suivant les études. *L. rhamnosus GG* et *L.rhamnosus La801* ont été associées à une baisse de l'incidence de DAA chez l'enfant **(Duboc, 2009)**.

L'avantage de ces probiotiques dans la prévention de la DAA a été prouvé par des essais contrôlés, les probiotiques aident le microbiote intestinal naturel. Donc la DAA a été évitée en utilisant quelques préparations probiotiques, en particulier *L. rhamnosus GG* **(Mami et al., 2015)**.

#### **II.5.1.2. Diarrhée à rotavirus**

*Lactobacillus rhamnosus* accélère la récupération dans la diarrhée aiguë. Des études ont été menées principalement sur les enfants atteints de rotavirus, qui est la cause la plus fréquente de diarrhée dans les pays occidentaux. *Lactobacillus rhamnosus* a accéléré d'environ un jour la récupération des enfants hospitalisés pour la diarrhée aiguë. L'accélération de la récupération était généralement notée le deuxième jour: les enfants traités par *Lactobacillus rhamnosus* étaient moins souvent déféqués et leurs selles étaient plus solides que celles du groupe placebo. Les enfants traités à domicile, avec l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* à partir du deuxième jour après le début de la diarrhée, ont présenté des symptômes pendant environ la moitié de la durée du groupe placebo **(Saxelin, 2002)**.

**II.5.1.3. Diarrhée des voyageurs**

Bien que la diarrhée soit un problème très commun pour les voyageurs dans les pays à hauts risques fécaux, l'utilisation prophylactique d'antibiotiques contre la diarrhée n'est pas recommandée dans tous les cas (**Mercenier, 2003**).

Des études rétrospectives et prospectives ont montré que l'incidence de la diarrhée du voyageur allait de 15 à 56%. Une étude à double issue contrôlée par placebo auprès de voyageurs finlandais a montré que le probiotique *Lactobacillus rhamnosus* diminue l'incidence de la diarrhée du voyageur. *Lactobacillus rhamnosus*, initialement isolé chez l'homme sain, est remarquable pour sa capacité à résister à la dégradation de l'acide et de la bile (**Hilton et al., 2018**).

**Deuxième Partie**  
**Partie expérimentale**

# **Chapitre I**

## **Matériel et Méthods**

### I.1. Objectifs du travail

Notre travail expérimental répond à trois objectifs :

1. Caractérisation technologique de deux ferments lactiques commercialisés : *Lactobacillus rhamnosus GG*, *Lactobacillus rhamnosus LA80I*.
2. Evaluation *in vitro* de l'effet inhibiteur de ces deux ferments lactiques sur trois bactéries pathogènes sélectionnées: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa*.
3. Recherche des agents antibactériens (acide lactique et bactériocines-Like).

### I.2. Lieu et période de travail

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie, de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Ibn Khaldoun –Tiarret pendant une période allant du 25 Janvier au 15 Mars 2018.

### I.3. Matériel

#### I.3.1. Matériel biologique

##### ➤ Bactéries pathogènes

Dans notre étude, nous avons choisi trois bactéries pathogènes responsables des infections humaines (urinaires) : *E. coli*, *S. aureus* et *P.aeruginosa* provenant de laboratoire des analyses médicales de Maâchi –Tiarret. Elles ont été isolées à partir d'Examen cyto bactériologique des urines (ECBU).

Ces souches ont été conservées dans des boîtes à une température de 4°C et ont été transportées au laboratoire de la faculté.

##### ➤ Produits lactiques

On a utilisé deux produits lactiques commercialisés (**Fig.4**) : « Lactibiane » sous forme de gélules (composé de *Lactobacillus rhamnosus LA80I*) et « Probiolog » sous forme de sachets (composé de *Lactobacillus rhamnosus GG*. Ils ont été achetés d'une parapharmacie - Paris (France).



a. *Lactobacillus rhamnosus LA80I*

b. *Lactobacillus rhamnosus GG*

**Figure n°4** : Produits probiotiques utilisés

## I.3.2. Matériel du laboratoire

Le matériel nécessaire utilisé dans notre étude est représenté dans le tableau suivant :

**Tableau n°4 : Matériels et les produits utilisés**

Appareillages et autres	Verreries et autres	Réactifs et solutions
-Agitateur (Stuart SB162) -Autoclave (Wolf) -Balance analytique (B-350 OPTIKA) -Centrifugeuse (Sigma 203) - Etuve (Mettler) -Microscope optique (Sartorius) Réfrigérateur (IRIS) -Plaque chauffante -pH mètre (Hanna instruments type : EC214) -Spectrophotomètre (Pharmacia biotech type : Novaspe) -Vortex (techno Kartell type : TK3S) - Bec bunsen	-Anse de platine -Barreau magnétique -Béchers -Burette -Boites de Pétri -Dessiccateur -Entonnoir -Flacons en verre -Lames et lamelles -Micropipettes -Pipettes graduées - Pipettes Pasteur -Pince à bois pince métallique -Tubes à essai -Verre de montre -Ecouvillons	-Acide chlorhydrique (0.9 %) -Alcool -Eau distillée -Eau oxygénée H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Eau physiologique -Fuschine -Huile d'immersion -Huile à paraffine -Lugol -Solution de NaCl (0.85%) -Solution de NaOH (0.1 N) -Solution de phénolphtaléine -Violet de gentiane
<b>Autres produits</b>		
-Agar -Galleries API 20E -Antibiotiques (Annexe VII)		
<b>Milieux de culture (La composition des milieux de culture est mentionnée dans l'annexe I)</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gélose et bouillon Nutritif</li> <li>• Gélose Mueller Hinton</li> <li>• Gélose et bouillon MRS</li> <li>• Gélose et bouillon M17</li> <li>• Gélose cétrimide</li> <li>• Gélose Mc conkey</li> <li>• Gélose Chapman</li> </ul>		

I.4. Méthodes

I.4.1. Protocole expérimental

La figure n°5 résume toutes les étapes suivies dans notre démarche expérimentale :

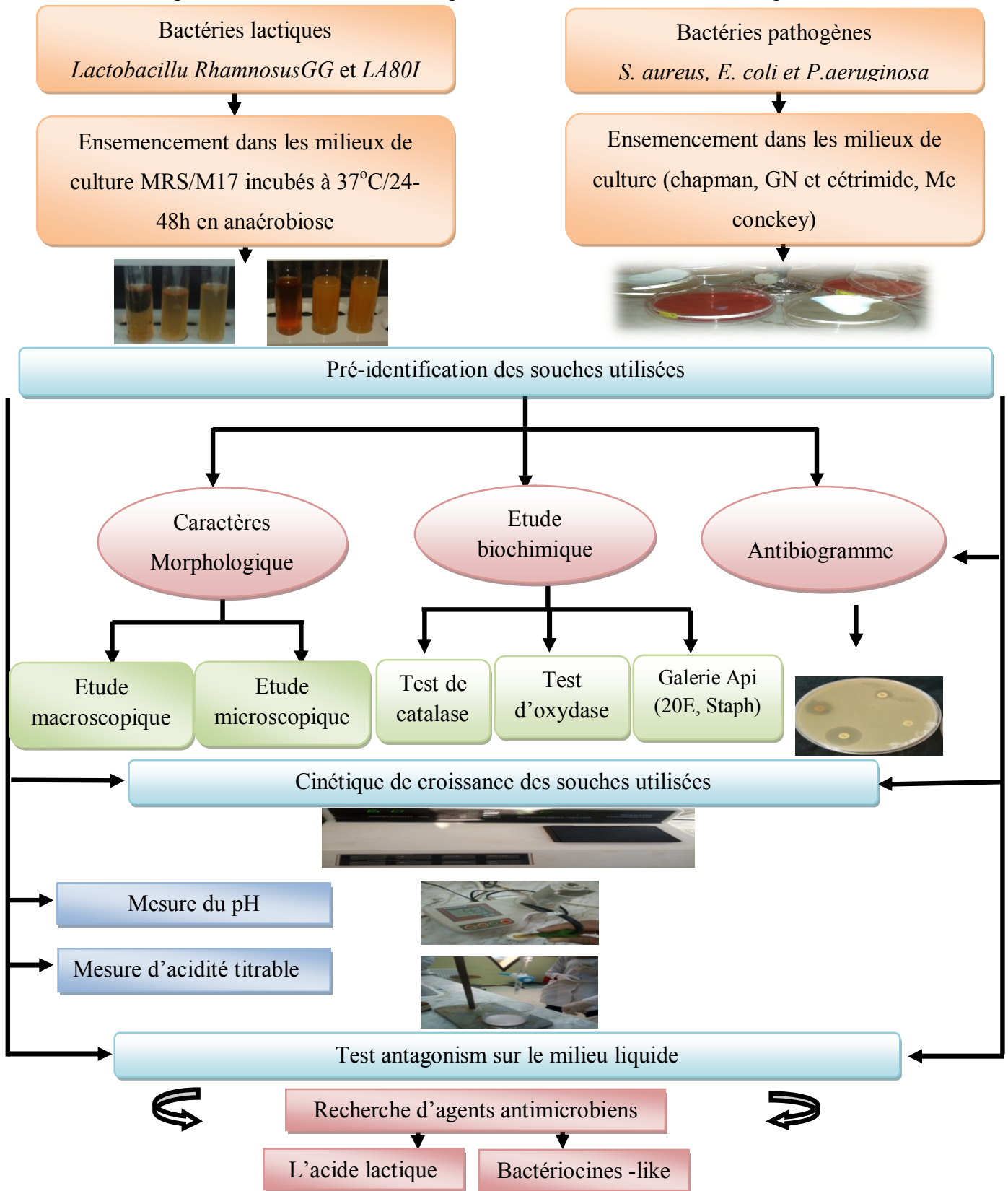


Figure n°5: Schéma du protocole expérimentale



## I.4.2. Pré-identification des souches pathogènes

### I.4.2.1. Purification

Le repiquage successif des souches (*E. coli*, *S. aureus* et *P.aeruginosa*) a été réalisé en milieu liquide dans BN puis en milieu solide dans leurs milieux sélectifs (Mc conkey, Chapman et cétrimide) respectivement. Ces souches ont été incubées à 37°C/24h, afin de vérifier leur pureté.

### I.4.2.2. Conservation

La conservation des souches a été faite par l'ajout d'un agent protecteur glycérol 99%, puis gardées dans un congélateur domestique (**Larpent et Gaurgaud, 1997**).

### I.4.2.3. Caractères morphologiques

#### ✓ Etude macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est effectué à partir de l'isolement après incubation. Les souches bactériennes doivent être cultivées sur un milieu gélosé solide en boîte de Pétri et dans un milieu liquide en tube, afin de déterminer les caractères cultureux de ces bactéries (**Delarras, 2007**).

#### ✓ Examen microscopique

L'examen microscopique apparaît comme la première étape de l'étude d'une bactérie (**Bourdon et Marchal, 1973**). Elle est révélée par la coloration de Gram qui permet effectivement de diviser le mode des bactéries en deux groupes distincts (Gram positif et Gram négatif) et renseigne sur la forme et la disposition des bactéries. Elle permet en général d'apprécier la pureté de souches bactériennes avant toute identification (**Delarras, 2007**). La technique de coloration de Gram est représentée dans l'Annexe II.

### I.4.2.4. Caractères biochimiques

#### ➤ Test de la catalase

##### Principe

Le test de catalase, une enzyme du système enzymatique du cytochrome, est responsable de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) formé pendant la respiration aérobie. Tous les organismes utilisant le système cytochrome de la respiration auront une réaction de catalase positive lorsqu'ils seront testés, autre organismes utilisant un système différent ne produisant pas de catalase et produiront une réaction négative (**Tang, 2013**).



### Technique

Recouvrir la culture avec 1 à 2 ml d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 20 volumes. Observer immédiatement, puis après 5 min, s'il y a ou non formation de bulles d'oxygène (**Larpen et Gaurgaud, 1997**).

#### ➤ Recherche d'oxydase

### Principe

L'enzyme cytochrome oxydase fait partie du transport électronique et le métabolisme du nitrate est constitué de certaines bactéries. L'enzyme peut accepter des électrons provenant de substrats artificiels tels qu'un dérivé de phenylenatramine produisant un produit oxydé foncé (**Harvey et al., 2007**).

### Technique

Déposer, sur une lame porte-objet propre « Ox » et l'imbiber avec une goutte d'eau distillés ou d'eau physiologique stérile. Prélever une partie de la colonie à étudier à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile et l'étaler sur le disque.

Une coloration violet foncé apparaît immédiatement sur le disque ou en quelques secondes puis vire au noir : test oxydase + (**Delarras, 2014**).

#### ➤ Identification par la galerie API

La galerie API 20E et API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne contenant 0.5Mc Farland. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs le test de la galerie est réalisé selon les instructions de l'entreprise (**BioMérieux, REF20100/20160, France**).

La méthode utilisée et les tableaux de lecture des galeries sont résumés dans l'annexe IV, et VI.

#### **I.4.2.5. Antibiogramme**

Le test de sensibilité d'un micro-organisme aux antibiotiques s'appelle communément l'antibiogramme. Il consiste à éprouver *in vitro* la capacité d'un antibiotique d'inhiber la croissance d'un germe, en les mettant en contact l'un et l'autre durant une période normale de croissance. Et en général l'antibiogramme a pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques (**Marchal, 1988**).

Cette sensibilité a été testée par la méthode de diffusion (méthode de disques) sur milieu Muller-Hinton en utilisant plusieurs antibiotiques (**Tab.6**). Les boîtes sont ensemencées par une suspension bactérienne contenant  $10^7$  UFC/ml, ajustée par l'étalon 0.5

de Mc Ferland, sur lesquelles sont disposés les disques d'antibiotiques. L'incubation s'effectue à 37°C pendant 24 h en aérobiose. La lecture des résultats s'effectue par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition apparue (DZI) (Delarras, 2014). Un résultat est positif si DZI est supérieur à 2 mm (Soussy, 2012).

**Tableau n°5 : Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme**

Antibiotiques	Concentration
<b>Ampicilline (AM)</b>	10µg
<b>Céfalotine céphalothine cefalotine (CF)</b>	30µg
<b>Ceftazidime (CAZ)</b>	30µg
<b>Ciprofloxacine (CIP)</b>	5µg
<b>Colistinsulfate (CS)</b>	10µg
<b>Doxycycline (DO)</b>	30µg
<b>Gentamycine (GM)</b>	10UI
<b>Oxacilline (OX)</b>	5µg
<b>Polymyxine (PB)</b>	300UI
<b>Metronidazole (MTZ)</b>	5µg
<b>Nalidixilacide (NA)</b>	30µg
<b>Tétracycline (TE)</b>	30µg
<b>Ticarcilline (TIC)</b>	75UI
<b>Rifampicine (RA)</b>	30µg
<b>Novobiocine (NV)</b>	30µg
<b>Ceftazidime (CAZ)</b>	30µg

UI: Unité Internationale

µg: microgramme

#### I.4.2.6. Cinétique de croissance des bactéries pathogènes

On prépare trois tubes contenant 10 ml de bouillon nutritif ensemencé par des cultures jeunes (18 h) de chacune de nos souches pathogènes (*E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*). Les tubes sont incubés à 37°C/24h, la croissance bactérienne est suivie par la mesure de la densité optique à 600 nm chaque 2h (Asperger, 1985).

La cinétique de croissance est suivie périodiquement après différents temps (0h, 2h, 4h, 6h, 8h et 24h).

### I.4.3. Quelques caractères technologiques des ferments lactiques

#### I.4.3.1. Revivification

Préparer 9 ml de bouillon MRS, M17 et ajouter une quantité de poudre de chaque produit commercialisé (*Lactobacillus rhamnous GG* et *Lactobacillus rhamnosus LA80I*), en anaérobie afin de les incuber à 37°C/24 à 48 h.

Ensuite, ces bactéries lactiques ont étéensemencées sur le milieu MRS et M17solide à partir de suspensions préparées auparavant. Les cultures ont été incubées à 37°C pendant 24h en anaérobiose (Labioui et al., 2005).

#### I.4.3.2. Purification et conservation

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose et bouillon MRS, avec une incubation à 37°C pendant 24h, jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches (Idoui et al., 2009).

Afin de conserver les souche pendant tout la durée de travail, la conservation se fait sur milieu MRS incliné à +4°C en tubes à essai (Labioui et al., 2005).

#### I.4.3.3. Pré-identification

L'identification des bactéries lactiques, entre autres du genre *Lactobacillus*, est basée sur l'étude des quelques caractères morphologiques (examen macroscopique et microscopique après coloration de Gram) et l'étude de quelques caractères biochimiques (Sutra et al., 1998).

##### a. Etudes des caractères morphologiques

Les examens microscopique et macroscopique sont réalisés par la même méthode citée précédemment.

##### b. Etude des caractères biochimiques

Les tests oxydase et catalase ont été réalisés par le même protocole cité précédemment.

#### I.4.3.4. Etude de la cinétique d'acidité

L'un des critères technologiques le plus important chez les bactéries lactiques est la cinétique de production d'acide lactique (Hassain, 2013).

L'évaluation de l'acidité, produite par les souches pures, est réalisée par titrimétrie et par pH -métrie. Chaque souche estensemencée dans 10 ml de lait écrémé. Les prés cultures sont préparées par incubation à 37°C jusqu'à coagulation de lait. 3ml du pré culture est transvasé stérilement dans 100 ml de lait écrémé qui est homogénéisé. Le mélange est réparti dans des tubes stériles à raison de 10 ml/tube. La cinétique d'acidification et pH est mesurée simultanément aux intervalles en temps réguliers ; 0h, 2h, 4h, 6h, et 24h (Mami et al., 2008).

### a. Mesure du pH

La mesure du pH s'effectue à une température du lait à 20°C avec un pH-mètre. Un volume de 10ml du lait cru est mis dans un bécher, le bout de l'électrode du pH-mètre est immergé dans le lait. La valeur du pH s'affiche instantanément sur l'écran (**Debouz et Guerguer, 2010**).

### b. Dosage de l'acidité titrable

L'acidité Dornic est une expression de l'acidité développée dans un lait par transformation du lactose en acide lactique. La mesure de l'acidité Dornic est réalisée par neutralisation, par de la soude N/9, de 10 ml de lait auquel est ajouté un indicateur de couleur (la phénolphthaléine);  $10^{\circ}D = 1 \text{ g/l}$  d'acide lactique (**Lucas et Ryrolle, 1989**).

#### I.4.3.5. Cinétique de croissance des bactéries lactiques

L'étude de l'évolution de la croissance sélectionnée est effectuée dans le milieu MRS, avec incubation à 37°C, en anaérobiose (**Allouche, 2010**).

La cinétique de croissance a été suivie par la même méthode que les bactéries pathogènes citée précédemment.

#### I.4.4. Test d'antagonisme sur le milieu liquide

Les bactéries lactiques peuvent produire des substances inhibitrices. Pour s'assurer de la présence de ces dernières, nous avons pris une culture jeune de *Lactobacillus rhamnosus GG* et *LA80I* qui ont été cultivées dans le bouillon MRS et incubées à 37°C pendant 18 h en anaérobiose. Après l'incubation, les suspensions ont été centrifugés à 4000 trs/ min pendant 15 min afin de récupérer le surnageant.

Des tubes de pré cultures des souches pathogènes sontensemencées dans BN et incubées à 37°C pendant 18h. La mesure de la croissance bactérienne de la souche pathogène est réalisée par la mesure de la densité optique toutes les 2 h (0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h). Après la 6<sup>ème</sup> h, 1ml du surnageant brute est ajouté dans le tube et on mesure de la densité optique jusqu'à 10 h. Ainsi, la courbe  $DO = f(t)$  peut être tracée (**Tabak et Bensoltane, 2011**).

Les différentes étapes d'antagonisme sur le milieu liquide sont illustrées dans la **figure n°6**.

##### I.4.4.1 Recherche des agents antimicrobiens

###### a. Recherche de l'effet de l'acidité

Des tubes de pré cultures des souches pathogènes sontensemencées dans le bouillon nutritif et incubées à 37°C pendant 18h. La mesure de la croissance bactérienne de la souche pathogène est réalisée par la mesure de la densité optique toutes les 2h (0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h).

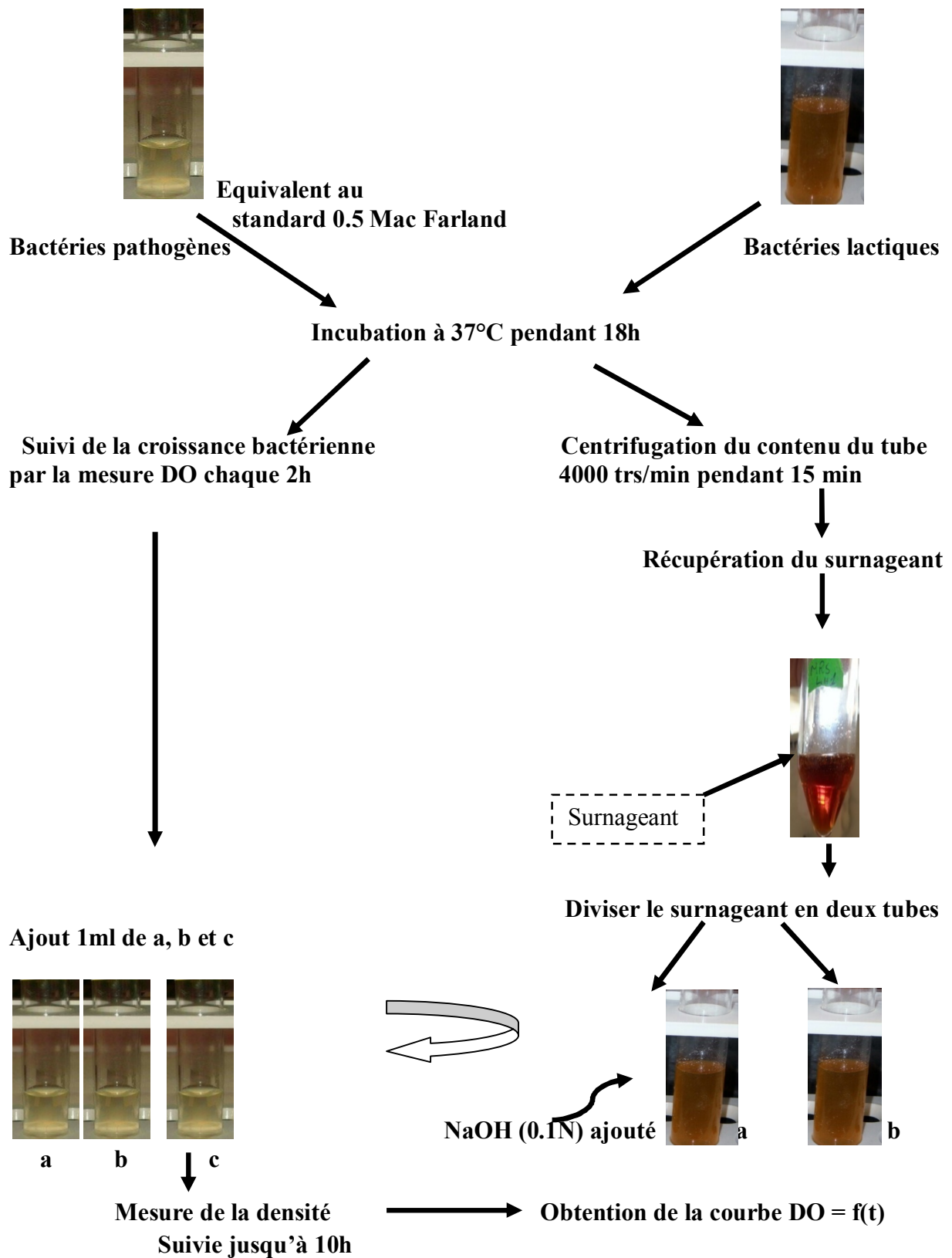
Après 6h d'incubation on ajoute à chaque tube 1ml de Hcl 1N ; les tubes sont incubés à 37°C, la croissance bactérienne est suivie par la mesure de la densité optique chaque 2h pendant 10h (**Bruno et Shah, 2002**).

### **b.Recherche de bactériocines –like**

Le surnageant à pH= 5.8 a été neutralisé par l'ajout d'une solution de NaOH à 0.1 N en présence d'une goutte d'une solution méthanoïque de phénophtaléine à 1% utilisée comme indicateur coloré.

Et on a suivi les mêmes étapes avec l'antagonisme dans le milieu liquide citées précédemment

➤ Préparation d'une culture jeune des souches utilisées



a : Surnageant neutralisé

b : Surnageant brute

c : Hcl

Figure n°6 : Shéma illustrant les différentes étapes d'antagonisme sur le milieu liquide

# **Chapitre II**

## **Résultats et Discussion**



## II.1. Pré-identification des bactéries pathogènes étudiées

### II.1.1. Aspect macroscopique

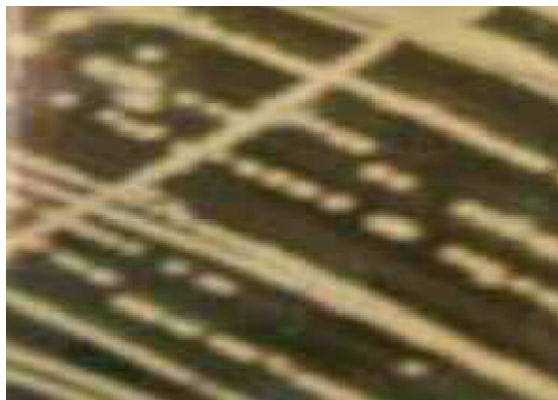
Les cultures obtenues sur les boîtes de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies (**Badis et al., 2004**).

Les colonies de *E.coli* sont apparues sur la gélose Mc conkey de très grande taille, larges et plates, de forme circulaire irrégulière, avec une couleur crème (**Fig.7a**).

Les colonies de *S.aureus* sont apparues sur la gélose Chapmen en forme de coque, sphériques, avec une couleur dorée et opaque (**Fig.7b**).

Les colonies de *P.aeruginosa* sont apparues sur la gélose Cétrimide de grande taille, de forme circulaire irrégulière, avec une couleur verte-jaune (**Fig.7c**).

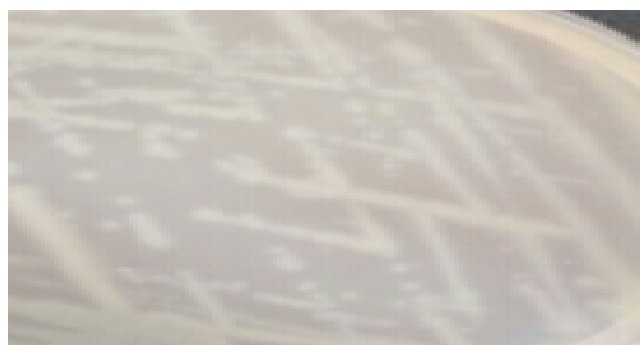
L'aspect des souches d'*E.coli*, *S.aureus* et *P.aeruginosa* sont similaires aux résultats obtenus par **Kloos et Bannerman (1999)** et **Joly et Reynaud (2003)**.



a. *E.coli*



b. *S.aureus*



c. *P.aeruginosa*

**Figure n°7:** Aspect macroscopique des colonies des souches étudiées

## II.1.2. Aspect microscopique

Les résultats de l'examen microscopique des trois souches pathogènes étudiées sont illustrés dans le tableau suivant :

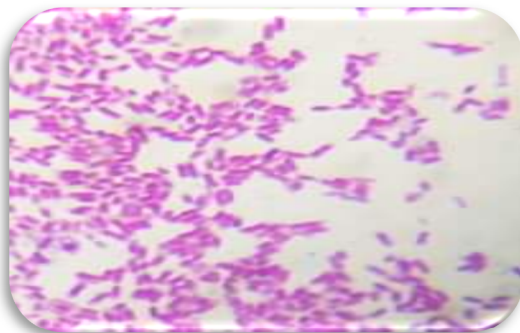
**Tableau n°6** : Résultats de l'examen microscopique des souches pathogènes étudiées

Souches	Coloration de Gram	Aspect	
		Forme	Regroupement
<i>E.coli</i>	-	Bacille (bâtonnet) <b>(Fig. 19)</b>	Isolé et en amas
<i>P.aeruginosa</i>	-	Petit bacille <b>(Fig. 21)</b>	En amas
<i>S.aureus</i>	+	Coque (cocci) <b>(Fig. 20)</b>	En chaînette

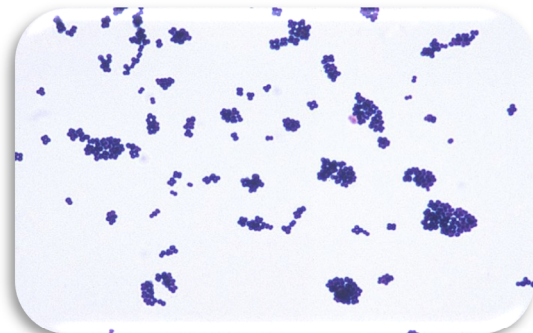
+ : Positif

- : Négatif

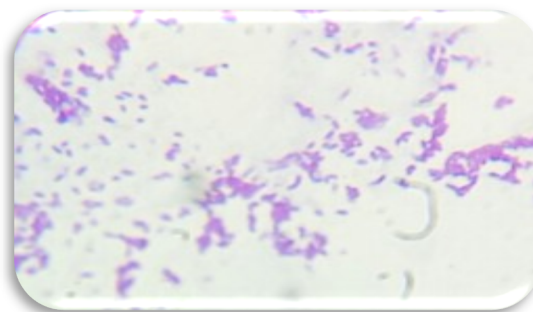
*Escherichia coli* et *P.aeruginosa* sont des bacilles de Gram négatif et *S. aureus* est Gram positif, cela est été bien démontré par **Richards et al. (2002)**.



**a.***E.coli*



**b.***S.aureus*



**c.***P.aeruginosa*

**Figure n°8**: Observation microscopique des souches étudiées après coloration de Gram (G

□ 100)

### II.1.3. Etude biochimique

#### ➤ Test de catalase et d'oxydase

Les résultats des tests de la catalase et d'oxydase de nos souches sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau n°7** : Résultats des tests de catalase et d'oxydases des souches pathogènes étudiées

Souches	Catalase	Oxydase
<i>E.coli</i>	+	-
<i>S.aureus</i>	+	-
<i>P.aeruginosa</i>	+	+

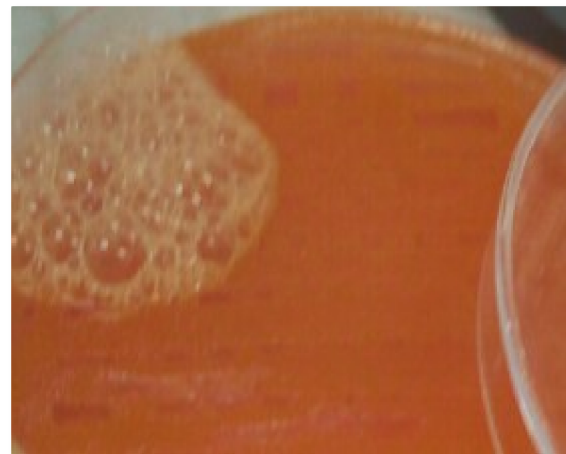
+ : Positif

- : Négatif

Les résultats observés révèlent que les trois souches ont une catalase positive (**Fig.9**), tandis que *E.coli* et *S.aureus* ne possèdent pas l'oxydase (**Fig.10**) (George et al., 2005).



**a.***E.coli*

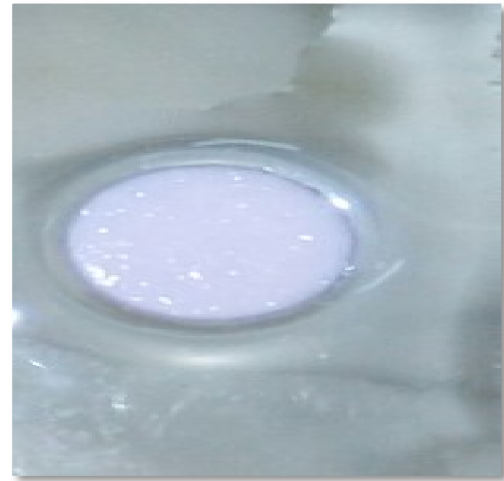


**b.***S.aureus*



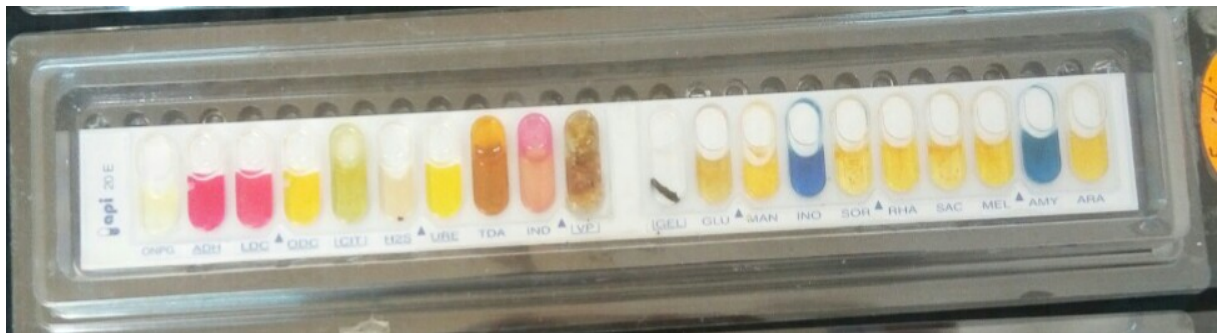
**c.***P.aeruginosa*

**Figure n°9**: Résultat de test catalase des trois souches étudiées

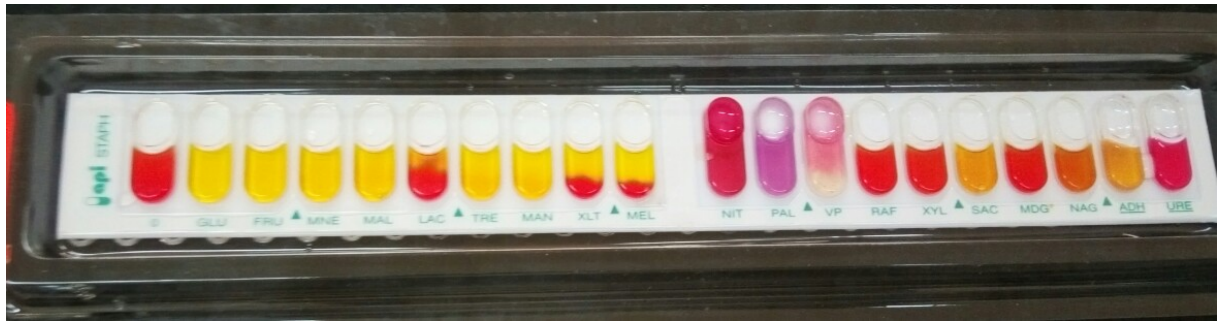
**a.** *E.coli***b.** *S.aureus***c.** *P.aeruginosa***Figure n°10:** Résultat de test d'oxydase des trois souches étudiées

➤ **Galerie API**

La lecture des Galeries API 20 E et API Staph incubées pendant 24h à 37°C est interprétée à l'aide du tableau de lecture pour obtenir un code de 7 chiffres (**Fig.11 et Tab. 8 et 9**).



a. *E.coli*



b. *S.aureus*



c. *P.aeruginosa*

Figure n°11 : Résultats des Galeries Api (20 E et Staph) des trois souches étudiées



Tableau n°08 : Différents résultats de la galerie API 20 E des deux souches pathogènes

N°	Test	Substrat	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
01	ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	+	-
02	ADH	L-Arginine	+	+
03	LDC	L-Lysine	+	-
04	ODC	L-Ornithine	-	-
05	CIT	L-Citrate de sodium	-	+
06	H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	-	-
07	URE	Urée	-	-
08	TDA	L-Tryptophane	-	-
09	IND	L-Tryptophane	+	-
10	VP	Sodium pyruvate	-	+
11	GEL	Gélatine	-	+
12	GLU	D-Glucose	+	+
13	MAN	D-Mannitol	+	-
14	INO	Inositol	-	-
15	SOR	D-Sorbose	+	-
16	RAH	L-Rhamnose	+	-
17	SAC	D-Saccharose	+	-
18	MEL	D-Melibiose	+	-
19	AMY	Amygdaline	-	-
20	ARA	L-Arabinose	+	+

+ : Résultat positif

- : Résultat négatif

**ONPG** : Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside, **ADH** : Arginine Di Hydrolase, **LDC** :Lysine Décarboxylase, **ODC** : Ornithine Décarboxylase, **CIT** : Citrate, **H<sub>2</sub>S** : Thiosulfate de sodium, **URE** : Urée, **TDA** : Tryptophane Désaminase, **IND** : Tryptophane

**VP** : Vosges Proskauer, **GEL** : Gellatine, **GLU** : Glucose, **MAN** : Mannitol, **INO** : Inositol, **SOR** : Sorbose, **RAH** : Rhamnose, **SAC** : Saccharose, **MEL** : Melibiose, **AMY** : Amygdaline, **ARA** : Arabinose.

Tableau n° 09 : Résultats de la galerie API Staph

N°	Test	Substrat	<i>S.aureus</i>
01	<b>0</b>	Aucun	-
02	<b>GLU</b>	D-Glucose	+
03	<b>FRU</b>	D-Fructose	+
04	<b>MNE</b>	D- Mannose	+
05	<b>MAL</b>	D- Maltose	+
06	<b>LAC</b>	D- Lactose	+
07	<b>TRE</b>	D- Trénalose	+
08	<b>MAN</b>	D-Mannitol	+
09	<b>XIT</b>	Xylitol	-
10	<b>MEL</b>	D-Melibiose	-
11	<b>NIT</b>	Nitrate de potassium	+
12	<b>PAL</b>	$\beta$ - Naphtyl phosphate	+
13	<b>VP</b>	Sodium pyruvate	+
14	<b>RAF</b>	D- Raffinose	-
15	<b>XYL</b>	D- Xylose	-
16	<b>SAC</b>	D-Saccharose	+
17	<b>MDG</b>	Méthyl- $\alpha$ D- Glucopyranoside	-
18	<b>NAG</b>	N- Acétyl- Glucosamine	+
19	<b>ADH</b>	L-Arginine	+
20	<b>URE</b>	Urée	+

+ : Test positif

- : Test négatif

**0** : Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside, **GLU** : Glucose, **FRU** : Fructose, **MNE** : Mannose, **MAL** : Maltose, **LAC** : Lactose, **TRE** : Trénalose, **MAN** : Mannitol, **XIT** : Xylitol, **MEL** : Melibiose, **NIT** : Nitrate, **PAL** : Naphtyl phosphate, **VP** : Vosges Proskauer, **RAF** : Raffinose, **XYL** : Xylose, **SAC** : Saccharose, **MDG** : Méthyl- $\alpha$ D- Glucopyranoside, **NAG** : N- Acétyl- Glucosamine, **ADH** : Arginine Déhydrolase, **URE** : Urée.

D'après les résultats présentés dans le tableau n° 08 et 09, et l'utilisation des tests d'identification morphologique et le logiciel API, nos souches bactériennes isolées peuvent être apparentées selon les codes **7044572**, **6736153** et **2207002** respectivement aux genres et espèces : *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*

#### II.1.4. Caractérisation de la sensibilité aux antibiotiques des trois souches pathogènes

La sensibilité antimicrobienne déterminée pour 15 antibiotiques en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé de Muller-Hinton après une incubation à 37°C pendant 24h a été interprétée selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (Soussy, 2012).

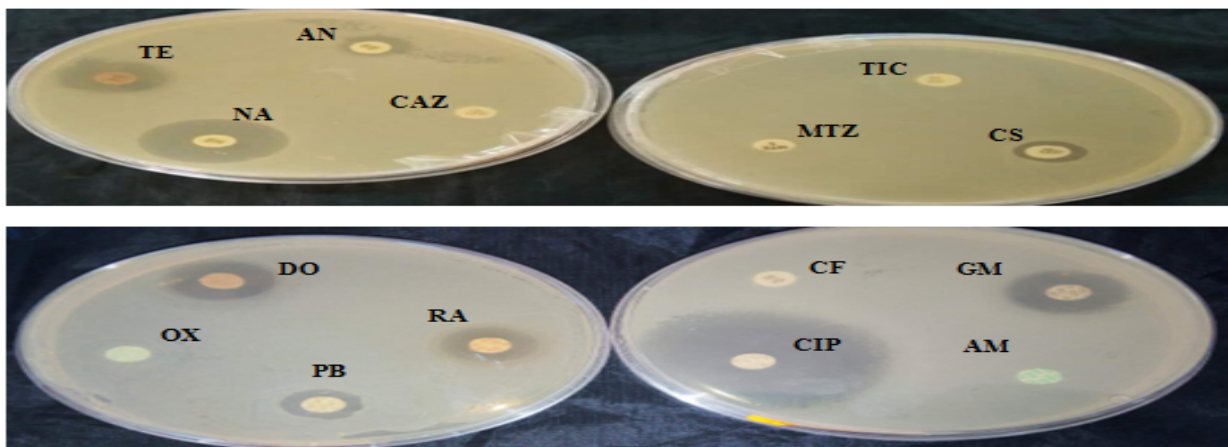
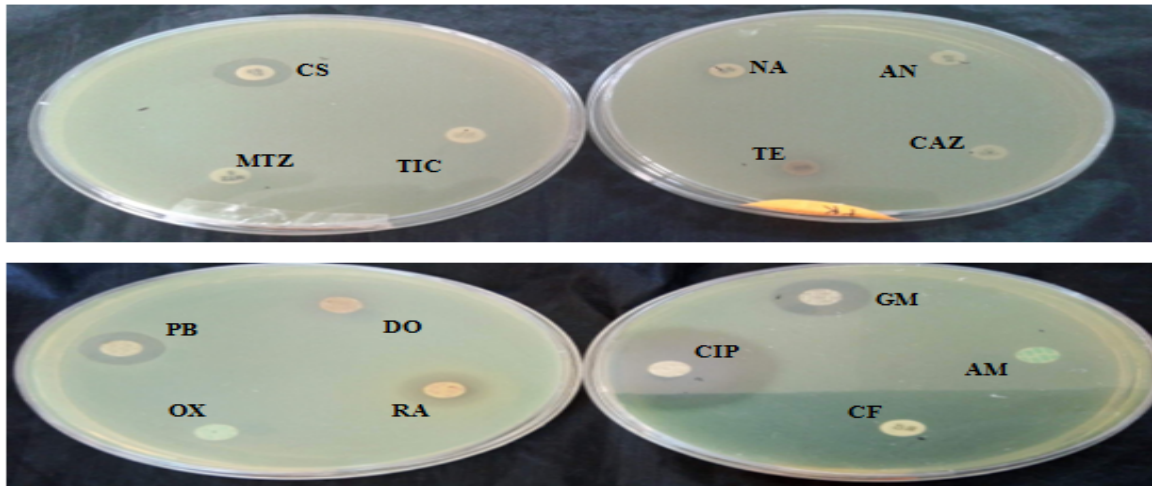


Figure n°12 : Résultats d'antibiogramme d'*E.coli*



Figure n° 13: Résultats d'antibiogramme de *S.aureus*





**Figure n°14:** Résultats d'antibiogramme de *P.aeruginosa*

Toute utilisation d'antibiotique en médecine humaine accroît les risques d'apparition de bactéries résistantes. L'étude de la sensibilité des trois souches pathogènes aux antibiotiques a montré que ces souches sont sensibles à Colistinsulfate, avec une résistance remarquable vis-à-vis aux antibiotiques comme Metronidazole, Ticarcilline, Ceftazidime, Ampicilline, Cefloline, Oxacilline, Gentamicine et Rifampine.

Il est noté que *P. aeruginosa* et *E.coli* sont à l'origine d'une augmentation des taux de mortalité chez les personnes infectées (Chung et al., 2011; Cometta et al., 1994).

Les infections causées par des souches multirésistantes représentent un problème majeur. Elles augmentent le risque d'échec thérapeutique (Maeda et al., 2008; Sabuda et al., 2008).

*P.aeruginosa* ont acquis une résistance à presque toutes les classes d'antibiotiques anti-*Pseudomonas* disponibles, y compris celles à large spectre telles que les Ampicillines, Doxycyclines, Oxacillines (Carmeli et al., 1999; Fish et al., 1995; Kollef et al., 2008; Quinn et al., 1986; Seok et al., 2011; Vettoretti et al., 2009). Elle est sensible à Colistinsulfate, Ciprofloxacine (Soussy, 2012).

*S. aureus* est sensible à Tétracycline, mais résistante à la Gentamicine (Ould Mouloud et al., 2016), Metronidazole, Doxycycline et celle-ci implique aussi une résistance à l'Ampicilline et l'Oxacilline (Kluytmans et Wertheim, 2005).

Les résultats de test d'antibiogramme de ces souches sont décrits dans les figures n°12-13-14 et interprétés dans le tableau n°10.

Tableau n°10: DMI des trois souches pathogènes

Antibiotiques	DMI en mm					
	<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>P.aeruginosa</i>	
METRONIDAZOLE(MTZ)	0	R	0	R	0	R
COLISTINSULFATE(CS)	10	S	11	S	12	S
TETRACYCLINE(TE)	15	R	19	S	8	R
NOVOBIOCINE(NV)	10	S	12	R	0	R
ACIDE NALIDIXICE (NA)	23	S	24	R	0	R
TICARCILLINE(TIC)	0	R	0	R	0	R
CEFTAZIDIME(CAZ)	0	R	0	R	0	R
DOXYCYCLINE(DO)	10	S	0	R	0	R
AMPICILLINE(AM)	0	R	0	R	0	R
CEFALOTINE(CF)	0	R	0	R	0	R
OXACILLINE(OX)	0	R	0	R	0	R
GENTAMICINE(GM)	12	R	6	R	10	R
POLYMXINE(PB)	9	S	6	R	9	S
RIFAMPINE(RA)	0	R	10	R	8	R
CIPROFLOXACINE(CIP)	40	S	7	R	39	S

R : Résistance

S : Sensible

DMI : Diamètre minimal d'inhibition

### II.1.5. Etude de la cinétique des souches pathogènes étudiées

Après l'incubation de chaque souche pathogène à 37°C pendant 18h, la croissance bactérienne est suivie chaque 2h par la mesure de la densité optique, il est intéressant de relever que les souches pathogènes : *E.coli* et *P.aeruginosa* présentent le même profil cinétique au début de la phase exponentielle par rapport au *S.aureus* où le taux de croissance atteint la valeur maximale. Il y a doublement de la population à des intervalles de temps réguliers(Fig.15) (Boulahbal, 1994).

Il a été remarqué que pour ces deux bactéries (*E.coli* et *P.aeruginosa*) pathogènes après 4h d'incubation, la croissance est très rapide de 6h à 8h, les valeurs du taux de croissance diminuent à partir de 8h pour les trois souches pathogènes ; la phase exponentielle ne dure que quelques heures. Le milieu devient de moins en moins favorable à la croissance. Le nombre de cellules viables reste constant. Il peut correspondre à un équilibre entre le nombre de cellules provenant de la multiplication et le nombre de cellules qui disparaissent par

autolyse. Donc cette phase est caractérisée par une diminution ou une annulation du taux de croissance (**Guzlane et al., 2008**).

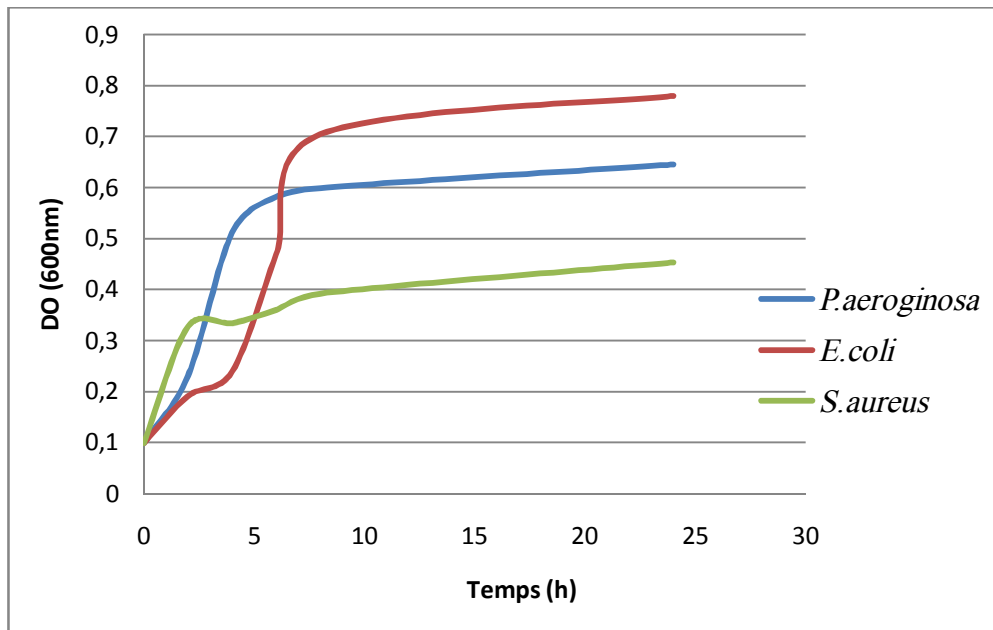


Figure n°15: Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes

## II.2. Caractères technologiques des deux produits lactiques probiotiques

### II.2.1. Revivification des ferments lactiques

Les deux produits *L.rhamnosus GG* et *L.rhamnosus LA801* ont été mis en culture sur le milieu MRS et M17 liquide. Le résultat de leur incubation à 37°C pendant 24 à 48 h, est démontré dans la figure suivante :

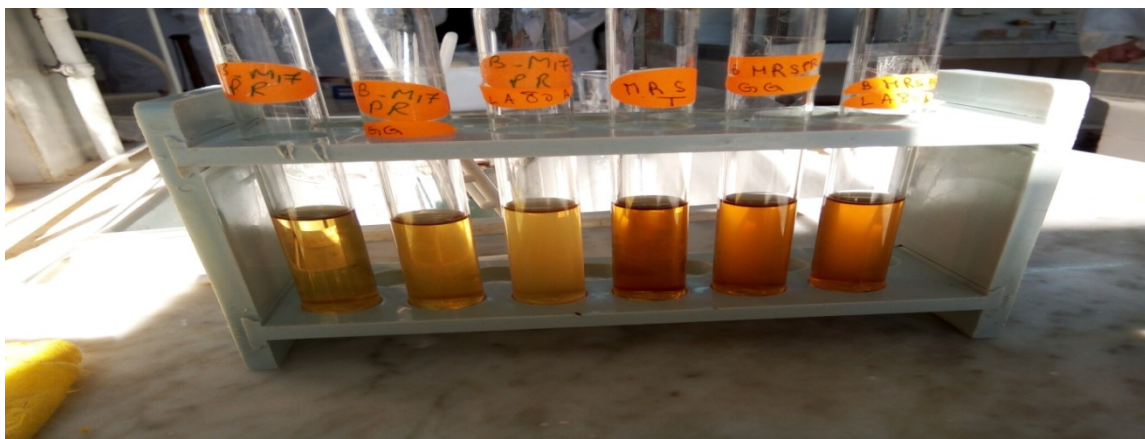


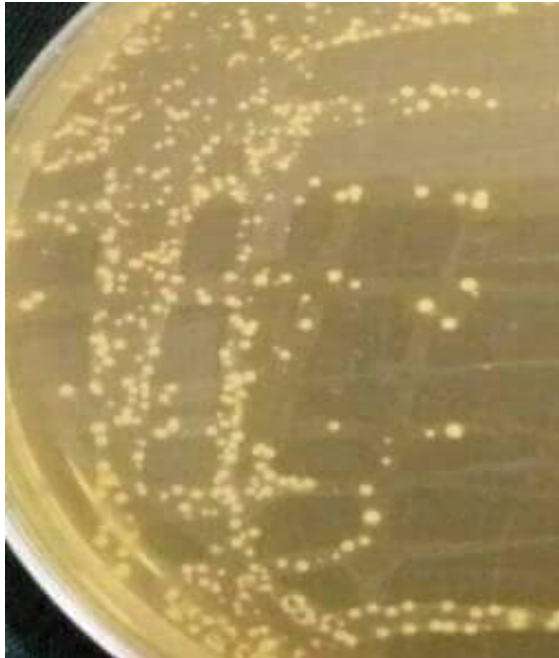
Figure n°16: Résultat de revivification des deux produits probiotiques

### II.2.2. Etude morphologique

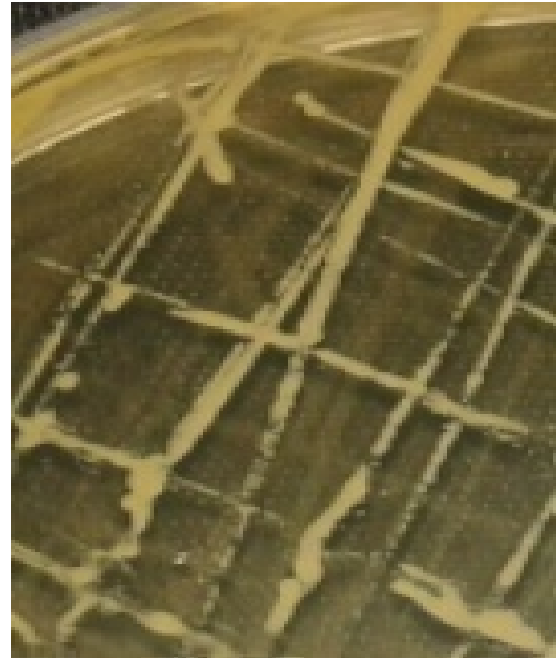
#### II.2.2.1. Aspect macroscopique

Les cultures obtenues sur les boîtes de Pétri sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies (**Badis et al., 2004**).

Les colonies de *L.rhamnosus GG* et de *L.rhamnosus LA801* obtenues sur gélose MRS et gélose M17 ont révélé qu'elles étaient circulaires ou lenticulaires, de couleur blanchâtre ou jaunâtre, rugueuse ou lisse (**Fig.17**). Elles appartenaient via ces critères au genre *Lactobacillus* (Sutra et al., (1998) et De Vos et al., (2009)).



**a.** *L.rhamnosus LA 801*



**b.** *L.rhamnosus GG*

**Figure n° 17:** Aspect macroscopique des colonies de *L.rhamnosus*

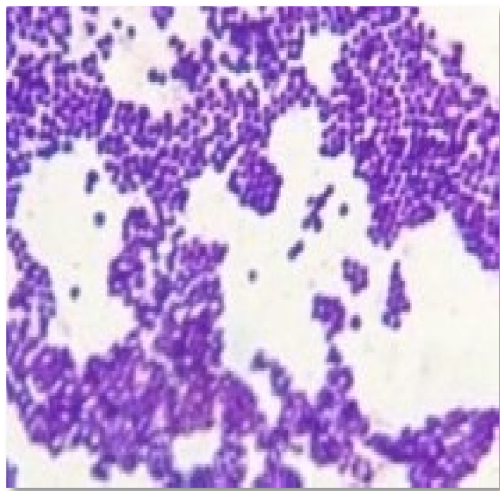
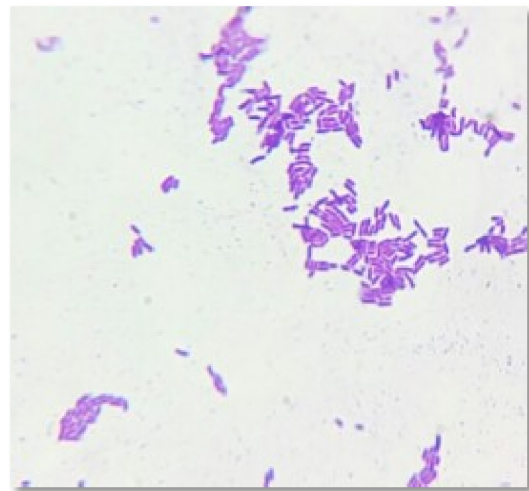
### II.2.2.2. Aspect microscopique

Les résultats de l'examen des souches lactiques étudiées basé sur la coloration de Gram est représenté dans le **tableau n° 11** et la **figure n°18**:

**Tableau n°11 :** Résultats de l'examen microscopique des deux souches lactiques

Souches	Coloration de Gram	Aspect	
		Forme	Regroupement
<i>L.rhamnosusGG</i>	+	Bacille (bâtonnet) <b>(Fig. 18b)</b>	Isolé et en amas
<i>L.rhamnosusLA801</i>	+	Coque (cocci) <b>(Fig. 18a)</b>	En amas

+ : Positif

a. *L.rhamnosus* LA801b. *L.rhamnosus* GG

**Figure n°18:** Aspect microscopique de *L.rhamnosus* après coloration de Gram (G  $\times$  100).

### II.2.3. Etude biochimique

#### ➤ Test de catalase et d'oxydase

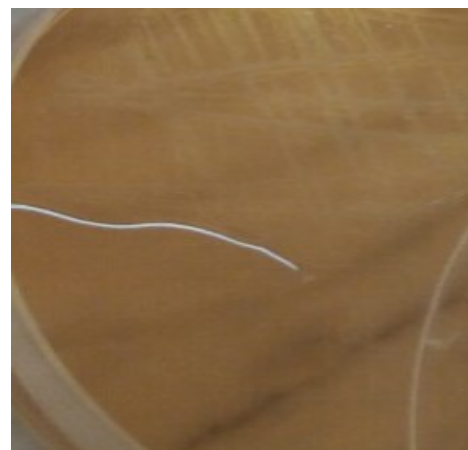
Les résultats des tests de la catalase et d'oxydase sont représentés dans le **tableau n° 12** et la **figure n° 19 et 20**.

**Tableau n°12:** Résultats des tests de catalase et d'oxydase de deux souches lactiques

Souches	Catalase	Oxydase
<i>L.rhamnosus</i> GG	-	-
<i>L.rhamnosus</i> LA801	+	-

- : Négatif

+ : Positif

a. *L.rhamnosus* LA801b. *L.rhamnosus* GG

**Figure n°19:** Résultat de test de catalase de *L.rhamnosus*

- Le test de la catalase de *L.rhamnosus* GG est négatif à la réaction de la catalase (**Fig.19b**). Selon le Bergey's Manuel de la Systématique Bactérienne « les *Firmicutes*», les lactobacilles sont catalase négative (**De Vos et al., 2009**).



- Généralement le genre *Lactobacillus* ne possédant pas de catalase, mais certaines souches possèdent une pseudocatalase comme *L.rhamnosus LA801* (Fig.19a).  
 Dépourvue d'oxydase (Fig.19b) (Zein et al., 2008).

a. *L.rhamnosus LA801*b. *L.rhamnosus GG*Figure n°20: Résultat de test d'oxydase de *L.rhamnosus*

#### II.2.4. Résultats de la cinétique d'acidité

Les résultats de pH et de l'acidité des souches lactiques ; *Lactobacillus rhamnosus GG* et *Lactobacillus rhamnosus LA801* sont représentés dans les figures suivantes :

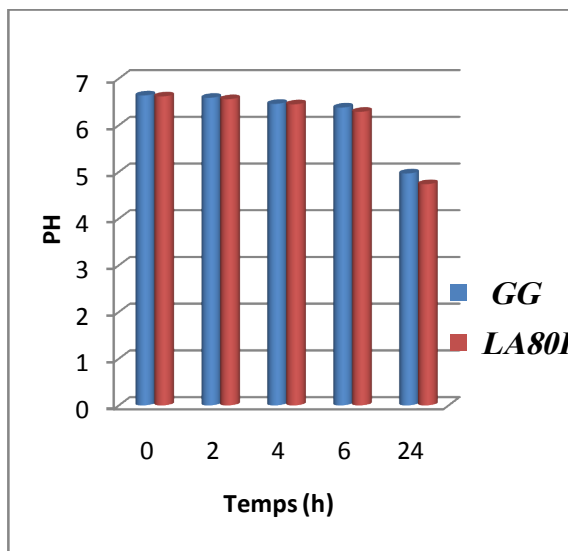


Figure n°21: Résultat de pH de *L.rhamnosus* (GG et LA801)

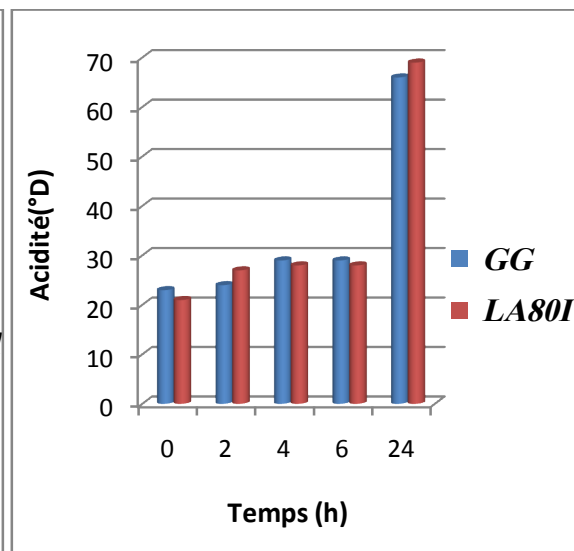


Figure n°22: Résultat de l'acidité de *L.rhamnosus* (GG et LA801)

D'après ces résultats nous remarquons que les deux ferments lactiques identifiés présentent une production progressive en acide lactique, le pH de *Lactobacillus rhamnosus*

*GG* et *Lactobacillus rhamnosus LA80I* est de pH6.64 et pH6.62 respectivement, Au bout de 24h d'incubation, ces valeurs de pH diminuent progressivement et se situent entre pH 4.97 pour *Lactobacillus rhamnosus GG* et pH 4.74 pour *rhamnosus LA80I*.

En parallèle, la quantité de l'acide lactique produite par *Lactobacillus rhamnosus GG* et *Lactobacillus rhamnosus LA80I* augmente de 23 et 21°D (0h) à 66 et 69 °D respectivement (Fig.21- 22).

### II.2.5. Cinétique de croissance des bactéries lactiques

Les deux souches lactiques présentent le même profil cinétique au début de la phase exponentielle. Après 4h d'incubation, la croissance est très rapide de 6h à 24h, les valeurs du taux de croissance diminuent à partir de 24h. La figure n°23 représente la cinétique de croissance de ces deux souches probiotiques.

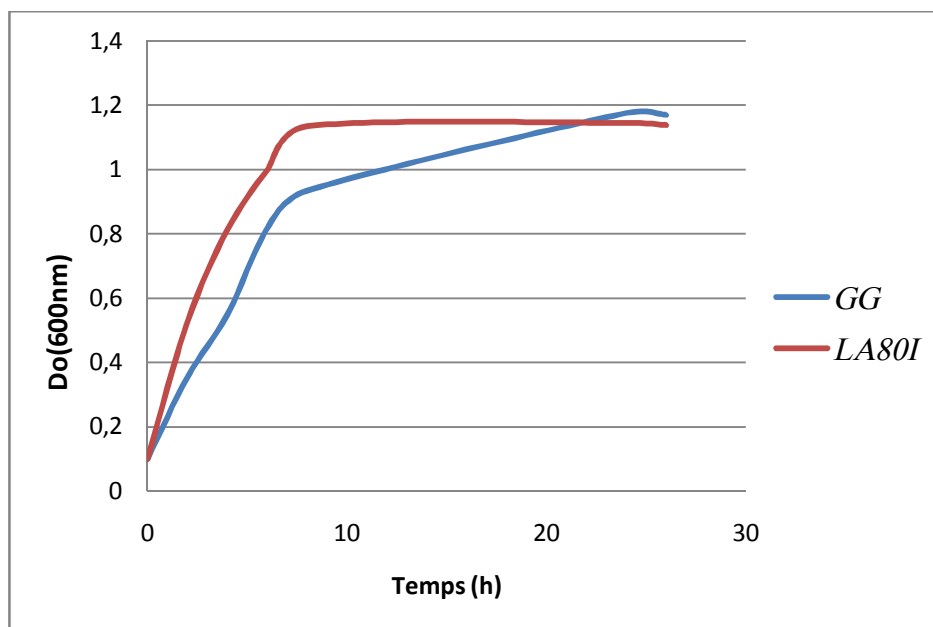
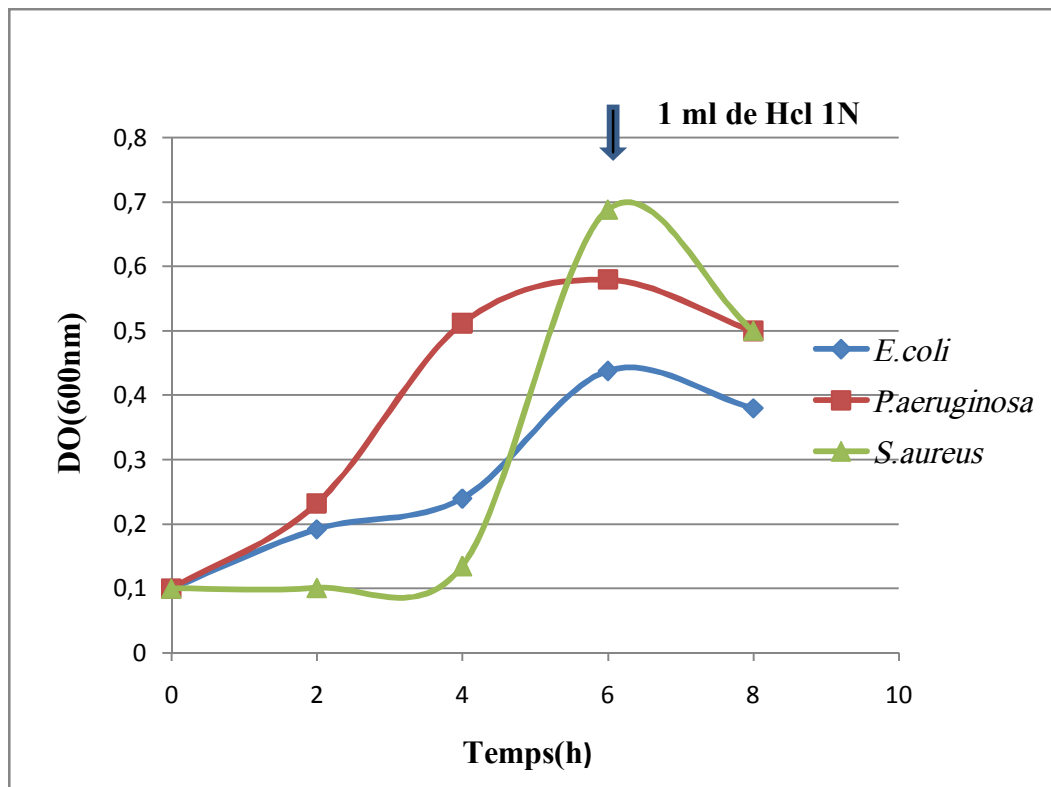


Figure n° 23: Cinétique de croissance de *L.rhamnosus* (GG et LA80I)

### II.3. Antagonisme sur milieu liquide

#### ➤ Effet de l'acidité

Les résultats de la cinétique de croissance des bactéries pathogènes étudiées par l'ajout de 1ml d'HCl après 6h d'incubation sont représentés dans la figure suivante :

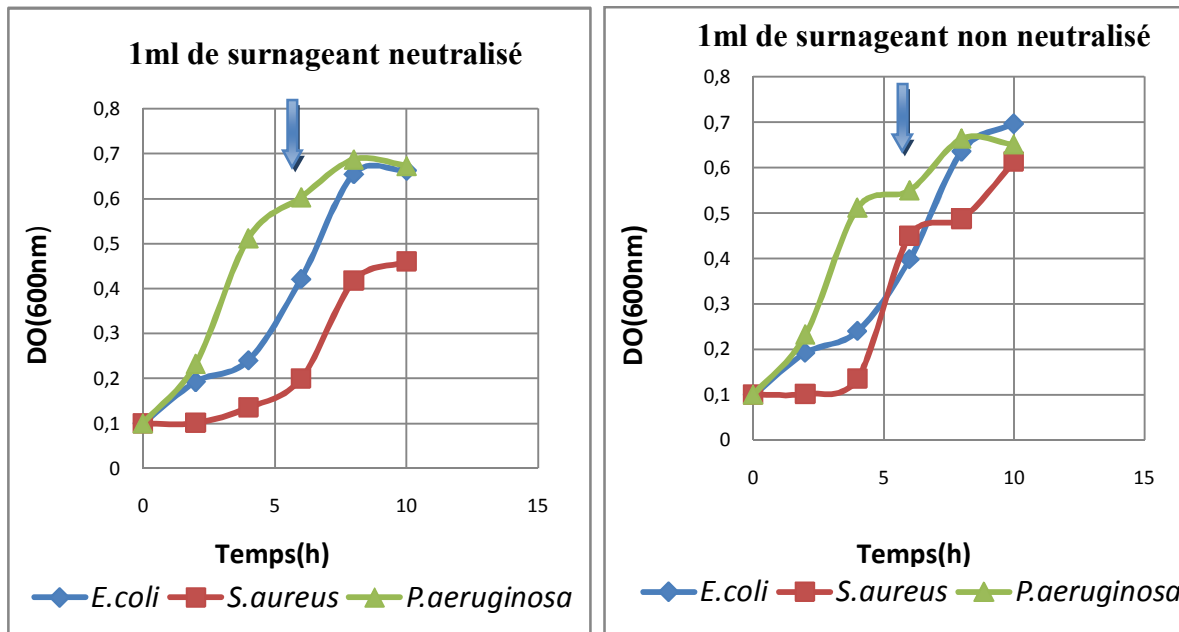


**Figure n°24:** Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes en présence de Hcl dans le milieu liquide

➤ **Recherche des agents antimicrobiens**

Les résultats de la cinétique de croissance des bactéries pathogènes sélectionnées par l'ajout de 1ml surnageant neutralisé et non neutralisé pour *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Lactobacillus rhamnosus* LA801 après 6h d'incubation sont représentés dans les figures suivantes :

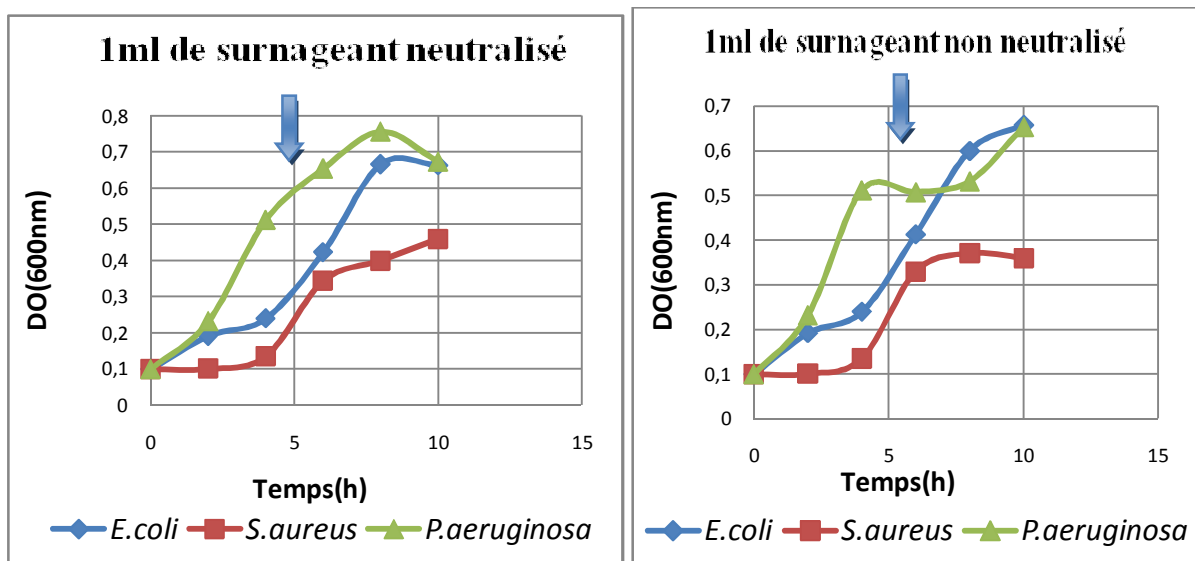




a : Surnageant neutralisé

b : Surnageant non neutralisé

**Figure 25 :** Cinétique de croissance des trois bactéries sélectionnées en présence de surnageant neutralisé et non neutralisé de *L.rhamnosus GG* dans le milieu liquide



a : Surnageant neutralisé

b : Surnageant non neutralisé

**Figure n°26:** Cinétique de croissance des trois bactéries sélectionnées en présence de surnageant neutralisé et non neutralisé de *L.rhamnosus LA80I* dans le milieu liquide

## II.4. Discussion générale

### II.4.1. Caractères technologiques des deux produits lactiques probiotiques

#### ➤ Etude de la cinétique

L'évaluation de l'acidité produite par les souches pures, est réalisée par titrimétrie et par pH mètre. La cinétique de croissance est mesurée chaque 2h et avec des densités optiques variables selon l'espèce.

La croissance de *L. rhamnosus* dans le milieu MRS est maximale après les 6 premières heures de fermentation, A partir de l'analyse des cinétiques de croissance, il est intéressant de relever que les deux souches probiotiques, présentent le même profil cinétique au début de la phase exponentielle, au-delà de laquelle on distingue une stabilité de la densité optique désignant une phase stationnaire suivie par une diminution de la croissance bactérienne, ceci peut être expliqué par l'épuisement des nutriments et/ou de l'accumulation des substances toxiques, cette diminution dure jusqu'à 24h d'incubation où la D.O diminue vers 1.17 pour *Lactobacillus rhamnosus GG* et 1.138 pour *Lactobacillus rhamnosus LA801*. Nos résultats sont comparables à ceux trouvés par **Benguier et al. (2015)**.

La production d'acide lactique est effectivement une des principales fonctions désirée des bactéries lactiques car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et aussi comme antimicrobien (**Schmidt et al., 1994**).

*L.rhamnosus* a montré une bonne croissance dans le lait à un pH de (6.6). La plupart des bactéries lactiques du lait sont capables de fermenter le lactose en produisant une acidification qui entraîne la coagulation de la caséine. Cette coagulation se produit à partir du pH 4.6 (**Guiraud, 2003**). Après 24h d'inoculation dans le lait écrémé, pour les deux produits lactiques testés, la valeur de pH est diminuée à 4.97 et 4.74 pour *L.rhamnosus GG et LA 801* respectivement. Nos valeurs sont similaires à ceux obtenus par **Dib et al (2012)**.

Au cours de la fermentation, le pH du milieu diminue en raison de l'accumulation des acides organiques, principalement de l'acide lactique. Cependant, le pH du cytoplasme des bactéries lactiques reste plus élevé (pH = 6.6) que le pH extracellulaire, en grande partie parce que les cellules excrètent rapidement l'acide lactique sous forme protonée dans le milieu extracellulaire (**Hutkins et Nannen, (1993) et Barry et al., (1992)**). Ces auteurs démontrent dans leur étude que *Lactobacillus rhamnosus* ne fermente pas le lactose, le maltose ou le saccharose et produit de petites quantités d'acide acétique et d'acide lactique, ce qui confirme nos résultats obtenus.

#### II.4.2. Test d'antagonisme sur milieu liquide

L'activité antimicrobienne vis-à-vis des germes pathogènes sélectionnées est l'un des critères fréquemment utilisés pour la sélection des souches probiotiques (**Dunne et al., 2001**).

Le test d'antagonisme des deux produits lactiques probiotiques et les trois bactéries pathogènes dans le milieu liquide a révélé que l'ajout d'1 ml de surnageant non neutralisé de *Lactobacillus rhamnosus GG* et *Lactobacillus rhamnosus LA801* inhibe la croissance de *P.aeruginosa*, et aucune activité inhibitrice pour *S.aureus* et *E.coli*.

L'effet antimicrobien des bactéries lactiques primaire est exercé suite à la production d'acide lactique et la réduction du pH (**Daeschel, 1989**).

Par ailleurs, ces bactéries sont capables de produire une variété de composés antimicrobiens comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (**Hansen, 1995**).

**Midassirou et al (2012)** ont rapporté que l'effet inhibiteur des souches de lactobacilles est lié à la production d'acide lactique, et probablement aux bactériocines agissant dans les conditions acides.

L'abaissement du pH dans les milieux MRS et M17 liquides signifie que chacune des deux souches lactiques possède un effet acidifiant en produisant des acides organiques. Cet effet est le principal facteur d'inhibition selon **Mathot et al., (1996)** et **Choisy et al. (1997)**.

Les lactobacilles développent des résistances à l'action détergente des sels biliaires. L'un des mécanismes de cette résistance est la déconjugaison des sels biliaires grâce à la « Bile Salt Hydrolase » (BSH) qui est aussi appelée cholyglycine hydrolase. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des sels biliaires conjugués avec la glycine ou la taurine en résidus d'acides aminés et en sels biliaires libres ce qui a pour effet de diminuer la solubilité de la bile et de réduire son activité détergente (**Begley et al., 2006 ; Hamon et al., 2011**).

Les lactobacilles sont naturellement bien adaptés à des pH bas (**Van de Guchte et al., 2002**).

L'action du pH bas ou une action synergétique entre les substances antibactériennes synthétisées par les deux produits lactiques probiotiques inhibe les micro-organismes en agissant en concert avec le ou les acide(s) produit(s) (**Alakomi et al., (2000) ; Servin et al., (2003)**), ceci s'expliquerait par une diminution du pH qui provoque une perméabilisation de la membrane externe des bactéries à Gram négatif facilitant ainsi la pénétration d'autres substances antimicrobiennes telles que les bactériocines.

➤ **Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes en présence de Hcl 1N**

L'ajout d'1 ml de Hcl aux cultures bactériennes à la 6<sup>ème</sup> heure d'incubation, engendre la diminution de la croissance d'*E.coli*, *S.aureus* et *P.aeruginosa* jusqu'à 10 h. Ce qui indique que ces bactéries sont sensibles et ne peuvent pas survivre dans un milieu acide. Nos résultats sont comparables à ceux trouvés par **Bruno et Shah (2002)**.

➤ **Recherche de bacteriocine**

Après l'élimination de l'effet de l'acidité par l'ajout de NaOH 1N jusqu'à obtention d'un pH de 6.8 environ, les surnageants neutres, ont fait l'objet de ce test.

Les résultats de la présente étude sur l'activité inhibitrice des surnageants neutres de *L.rhamnosus GG* a révélé un spectre d'inhibition étroit, dirigé notamment vis-à-vis des microorganismes cibles: *S.aureus*. Ces résultats se rapprochent notamment de ceux obtenus par **Allouche et al.(2010)**.

Ces résultats montrent également une perte d'activité inhibitrice du surnageant neutralisé de *L.rhamnosus LA801* vis-à-vis *P.aeruginosa*, *E.coli* et *S.aureus*.

Selon **Song et al (1997)**, l'élimination de l'effet des acides organiques favorise plutôt l'activité des substances antimicrobiennes telles que les bactériocines. La plupart des souches bactériennes inhibées par les bactéries lactiques ou leurs bactériocines sont des Gram (+) tels que *S.aureus* qui sont plus sensibles que les Gram (-) (**Savadogo et al., 2004**).

Les bactériocines agissant généralement sur la membrane cytoplasmique des cellules sensibles (Gram +) et cela par la formation de petits pores membranaires (**Luquet et Courrieu, 2005**).

**Papzadeh et al. (2016)** ont décrit la capacité de *L.rhamnosus GG* à exercer des effets bactéricides contre divers agents pathogènes, tels que *S.aureus* (**Savadogo et al., 2004**).

En effet, **Silva et al.(1987)** ont décrit la capacité de *L. rhamnosus GG* à exercer des effets bactéricides contre divers agents pathogènes, tels que *S.aureus*.

La substance inhibitrice produite par *Lactobacillus.rhamnosus GG*, est une bactériocine à faible poids moléculaire qui est active contre large spectre d'organismes à Gram positif.

D'autres études ont été réalisées sur le mode d'action des bactériocines, ce mode d'action se situe au niveau membranaire et modifie le potentiel de la membrane grâce à une structure alternante hydrophile et hydrophobe. Ces bactériocines peuvent s'insérer dans la membrane des bactéries sensibles et y former des pores ce qui entraîne des fuites d'ATP et d'ions  $K^+$  et par conséquent l'impossibilité pour les cellules de maintenir leur pH intracellulaire (**Desmazeaud, 1983**).

# **Conclusion**

## Conclusion

---

L'apparition de résistance aux antibiotiques a pour conséquence d'affaiblir leur efficacité dans le traitement des infections dues à la bactérie résistante chez l'animal ou l'Homme. Parmi ces bactéries résistantes, on cite les staphylocoques et les entérobactéries.

Ces dernières années, il y a eu une augmentation significative dans la recherche sur la caractérisation et la vérification des éventuels avantages pour la santé associés à l'utilisation de probiotiques qui est l'une des solutions alternatives pour éliminer les bactéries résistantes responsables d'infections chez l'homme.

Le but de notre travail est d'évaluer *in vitro* l'effet inhibiteur de deux ferments lactiques commercialisés: *Lactobacillus rhamnosus GG* et *Lactobacillus rhamnosus LA80I* vis-à-vis trois bactéries pathogènes: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et de rechercher les agents antibactériens (acide lactique et bactériocines).

Ces trois souches pathogènes ont été confirmées par l'étude de leurs caractères morphologiques (macroscopique et microscopique) et biochimiques (catalase, oxydase et les galeries Api 20E et Staph) ainsi leurs sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme).

L'étude de quelques caractères technologiques des deux produits lactiques (pH et l'acidité) a montré que *Lactobacillus rhamnosus LA80I* est la plus acidophile (69° D) par rapport à *Lactobacillus rhamnosus GG* (66°D) avec diminution progressive de pH.

La croissance bactérienne suivie chaque 2h par la mesure de la densité optique a révélé que les souches pathogènes: *E.coli* et *P.aeruginosa* présentent le même profil de cinétique au début de la phase exponentielle par rapport à *S.aureus*, les valeurs du taux de croissance diminuent à partir de 8h pour toutes les souches pathogènes; la phase exponentielle ne dure que quelques heures. Aussi, les deux souches lactiques ont le même profil de cinétique au début de la phase exponentielle. Après 4h d'incubation, la croissance est très rapide de 6h à 24h, les valeurs du taux de croissance diminuent à partir de 24h.

L'étude de l'activité antibactérienne en milieu liquide a montré un profil d'inhibition intéressant pour les deux ferments lactiques vis à vis *P.aeruginosa* qui due à la production des acides lactiques et bactériocines like.

Cette recherche s'inscrit dans une perspective d'une future utilisation des souches probiotiques :

- Tester les produits probiotiques; *Lactobacillus rhamnosus GG* et *Lactobacillus rhamnosus LA80I* vis-à-vis d'autres espèces de bactéries pathogènes.

## Conclusion

---

- Tester l'effet antagoniste du mélange ; *Lactobacillus rhamnosus GG* *Lactobacillus rhamnosus LA80I*.
- Evaluer l'effet inhibiteur d'autres produits probiotiques contre d'autres microorganismes pathogènes.
- Extraire et caractériser les agents antimicrobiens (acides lactiques et bactériocines)
- Confirmer le pouvoir antimicrobien des produits probiotiques par des études cliniques, *in vivo*.



# **Références Bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

- Abeet. A., Knock. L., Hill. C.(1995). Bacteriocins: modes of action and potential in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food microbiol*, 28: 169-185.
- Alakomi. H. L., Skytta. E., Saarela. M., Mattila-Sandholm. T., Latva-Kala. K., Helander. I.M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2001-2005.
- Alegre. E. I. (2009). Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de doctorat en chimie analytique. Université de Strasbourg, France, 230 P.
- Al-Malkey. M. K., Ismecal. M. C., Abo Al-Hur. F. J., Mohammed. S., Nayyef. H. J. (2017). Antimicrobial effect of probiotic *Lactobacillus spp.* on *Pseudomonas aeruginosa* *Tropical Biologic Research Unit.* 3(10): 1-6.
- Allouche. F. N., Hellal. A., Laraba. A. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de *Lactobacillus thermophilus* utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie*, 03: 13-20.
- Amrane. A., Prigent. Y. (1998). Analysis of growth and production coupling for batch of cultures *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 529-534.
- Aslim. B., Yuksekdağ. Z., Sarıkayab. E., Beyatli. Y. (2005). Determination of the bacteriocin- like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *Lebensmittel Wissenn chaft and Technology (LWT)*, 38 : 691-694.
- Asperger H. (1985). Produits laitiers fermentées: exemples d'interaction de microorganismes: *Osterreichische Milchwirtschaft.* 19: 15-31.
- Badis. A., Guetarni. D., Moussa Boudjemaa. B., Henni. D. E., Kihal. M. (2004). Identification and technological properties of lactic bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21: 579-588.
- Barry. R., Goldin., Sherwood. L., Gorbach. M. D., Saxelin. M., Barakat. S., Gualtieri. L., Salminen. S. (1992). Survival of *Lactobacillus* Species (Strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Sciences*, 37(1): 121-128.
- Beal. C., Louver. P., Corrieu. G. (1989). Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 32: 148-154.
- Begely. M., Hill. C., Gahan. C. G. M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl.Env. Microbiol.* 72(3): 1729-1738.

## Références bibliographiques

---

- Benguiar. R., Benaraba. R., Riazi. A. (2015).** Effet de l'extrait de caroube sur la croissance de deux candidats probiotiques : *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus rhamnosus*. *Nature et Technologie*, 13: 22-27.
- Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S., Gueguen M. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int J Food Microbiol* 126: 278–285.
- Bertrand. G., Toullec. R., Veissier. I. (2003).** Le veau de boucherie : concilier bien-être animal et production. Ed. Quae. Paris, 215 P.
- Bouix. M., Leveau .J.Y, (1993).** Microbiologie industrielle : Les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Lavoisier APRIA, 612 P.
- Boulahbal. F. (1994).** Microbiologie clinique. Ed. Office des Publications Universitaires, Alger, 173 P.
- Bourgeois. C.M., Larpent. J.P. (1996).** Microbiologie alimentaire. Ed. Technique and Documentation, Paris, 523 P.
- Bourdon. J.L., Marchal. N. (1973).** Techniques bactériologiques. Ed. Doin, Paris. 335 P.
- Bresson. J. L. (2012).** Effet des probiotiques: ce que disent les essais cliniques. Ed. Syndifrais, Paris, 08 P.
- Brownande, V. I., Lowbury, J. L. (1965).** Purification and properties of antimicrobial substances produced by medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. clin. Path.*, 18: 752-756.
- Bruno. F. A., Shah. N. P. (2002).** Inhibition of pathogenic and putrefactive microorganismes by lactic acid bacteria. *Milch wissenschaft*, 57: 617-621.
- Choisy. C. M., Desmazeaud. M., Gueguen. J., Lenoir. J-L., Schmid. T., Tourneur. C. (1997).** Les phénomènes microbiens. 3<sup>ème</sup> Ed, Tec & Doc. Ed. Lavoisier, 381, 424-429 PP.
- Chung. D. R., Song. J. H., Kim. S. H., Thamlikitkul. V., Huang. S. G., Wang. H., So. T. M., Yasin. R. M., Hsueh. P. R., Carlos. C. C., Hsu. L. Y., Buntaran. L., Lalitha. M. K., Kim. M. J., Choi. J. Y., Kim. S. I., Ko, K. S., Kang. C. I., Peck. K. R. (2011).** High Prevalence of multidrug resistant non-fermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. *Am J Respir Crit Care Med*, 184: 1409-1417.
- Cometta. A., Baumgartner. J. D., Lew. D., Zimmerli. W., Pittet. D., Chopart. P., Schaad. U., Herter. C., Eggimann. P., Huber. O., (1994).** Prospective randomized comparison of imipenem monotherapy with imipenem plus netilmicin for treatment of severe infections in nonneutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother* 38(6): 1309–1313.
- Coyette. J., Mergeay. M, (2013),** Microbiologie. 4<sup>ème</sup> Ed. De Boeck, Paris, 983 P.

## Références bibliographiques

---

- Daeschel. M. A. (1989).** Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, 43(1): 164-167.
- Debouz. A., Guerguer. L., Hamid oudjana. A., Hadj seyd AEK. (2014).** Etude comparative de la qualité physico-chimique et microbiologique du lait de vache et du lait camelin dans la wilaya de Ghardaïa. *Revue ElWahat*, 7(2): 08-15.
- Deegan. L. H., Cotter. P. D., Hill C. Ross P. (2006).** Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058-1071.
- De Kraker. M. E. A., Grundmann. H., Davey. P. G. (2011).** Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. *PLOS Medicine*, 8(10): 1-8.
- Delarras. C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Ed. Lavoisier, Paris, 476 P.
- Delarras. C. (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et de levures moisissures. Ed. Tec et Doc Lavoisier .Paris, 757 P.
- Desmazeaud. M, (1983).** L'état des connaissances en matière de nutrition sur les bactéries lactiques. *Le lait.* 63: 286-310.
- De Vos. P., Garrity. G.M., Jones. D., Krieg. N.R., Ludwig. W., Rainey. F.A., Schleifer K.H., Whitmanet. W.B. (2009).** Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In : « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes » Vol 3. Ed. Springer, New York, 19-511 PP.
- De Vuyst luc., Leroy F. (2007).** Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 194–199.
- Dib. H., Hajj. E., Semaan. R., Mrad. J., Ayoub. L., Choueiry. H., Moussa. H., Bitar. G. (2012).** Identification et évaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages caprins traditionnels. *Lebanese Science Journal*, 13(1): 43-58.
- Dortu. C., Thonart. P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(1): 143-154.
- Dridier. D., Prevost. H. (2009).** Bactéries lactiques, Ed. Economica, Paris, 593 P.
- Drouault. S., Corthier.G. (2001).** Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet. Res.* 32(2): 101-117.
- Dubach. A. (2002).** Aperçu Scientifique sur *Lactobacillus GG*. Ed. Emmi, Paris, 36 P.
- Duboc. H. (2009).** Diarrhée aigue et probiotiques : trois situations pratiques confrontées à l'evidence – based medicine. *L'hépto-gastroentérologue*, 3: 100-103.

## Références bibliographiques

---

- Dunne. C. O'Mahony. L., Murphy. L., Thornton. G., Morrissey. D. O'Halloran. S., Feeney. M., Flynn. S., Fitzgerald Daly. C., Kiely. B. O'Sullivan. G. C., Shanahan. F., Collins. J. K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 386-392.
- El-Ziney, M.G., Uyttendaele, M., Debevere, J., Jakobsen, M. (1998). Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Lett.* 20(10): 913-916.
- FAO/OMS. (2001a). Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes. Cordoba, Argentine, 3-34 PP.
- FAO/OMS. (2001b). Consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 1-4 PP.
- FAO/OMS. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada, 11 P.
- Farber. J. M. (1991). Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology: are view. *J. Food Prot.* 54: 58-70.
- Fedirighi. M, (2005), Bactériologie alimentaire : Compendium d'hygiène des aliments, Ed. Economica, Paris, 292 P.
- Felis.G. E., Dellaglio. F. (2015).Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Curr. Issues Intestinal Microbiol*, 8:44-61.
- Fooks. L. J., Gibson. G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *Br. J. Nutr.* 88: 39-49.
- George. Y. L., Buchanan. J. T., Datta. V., Essex. A., Hoffman.H. M., Fierer. J., Nizet. V., Bastian. J. F. (2005). *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulencethrough its antioxidant activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 202: 1-7.
- Guiraud. J. P. (2003). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris. 91-116 PP.
- Guiraud. J.P. (2012), Microbiologie Alimentaire. Ed. Dunod, Pris, 651 P.
- Guzlane. T. N., Kahlouche. B., Athmani. G. S. (2008). Microbiologie: Travaux pratiques. Ed. Office des publications universitaires, Alger. 138 P.
- Hamon. E., Horvatovich. P., Izquierdo. E., Bringel. F., Marchioni. E., Aoude-Werner. D., Ennahar. S. (2011). Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC. Microbiol.* 11(63): 191-201.

## Références bibliographiques

---

- Hansen. J. N. (1994).** Nisin as a model food preservative. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 34: 69-93.
- Harvey.R-A., Carnellissen .C.N., Fisler .B.D.(2007).** Microbiology Lippincott's Illustrated Reviews. Ed. Wilkins Awolters Kluver. New York. 37 P.
- Hassaine. O. (2013).** Caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien. Thèse de doctorat en biotechnologie: Université d'Oran – Essenia. 57-102 PP.
- Henker. J., Laassa. M., Blokhin. BM., Bolbot. YK., Maydannik VG.Elze. c., Schulze. J. (2007).** The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *European journal of pediatrics*, 166(4): 311-318.
- Hilton. E., Kolakowski. P., Singer. C., Smith. M. (2018).** Efficacy of *Lactobacillus GG* as a diarrheal preventive in travelers. *Journal of Travel Medicine*, 4(1): 41-43.
- Hutkins. R. W., Nannen. N. L. (1993).** pH Homeostasis in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*, 76: 2354-2365.
- Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et Karam N.E. (2009).** Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites*. 60(2): 177-183.
- Jay. M. J. (1992).** Modern Microbiology. 4<sup>ème</sup> Ed. Van Nostrand Reinhold, New York. 31-409 PP.
- Joffin, N, J., Leyral, G. (2006).** Microbiologie Technique. Tome 1, Dictionnaire des Techniques conidin de Biologie Technique, Ed. Canopé- CRDP d'Aquitaine-Bordeaux,: 102, 226, 239, 257 PP.
- Joly B., Reynaud. A. (2003).** Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. Ed. Lavoisier, Paris, 29-38 PP.
- Jones. K. (2010).** "Probiotics: preventing antibiotic-associated diarrhea." *Journal for Specialists in Pediatric Nursing*, 15(2): 160-162.
- 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 en Microbiologie Appliquée. Université d'Oran. 164 P.
- Kankainen. M., Paulin. L., Tynkkynen. S., Von ossowski. I., Reunanen. J., Partanen. P., Satokari. R., Vesterlund. S., Hendrickx. A. P., Lebeer. S., De Keersmaecker. S. C., Vanderleyden. J., Hamalainen. T., Laukkanen. S., Salovuori. N., Ritari. J., Alatalo. E., Korpela. R., Mattila-Sandholm. T., Lassig. A., Hatakka. K., Kinnunen. K. T., Karjalainen. H., Saxelin. M., Laakso. K., Surakka. A., Palva. A., Salusjarvi. T., Palva.**

## Références bibliographiques

---

- A., Salusjarvi. T., Auviren. P., De Vos. W. M. (2009). Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG human-mucus binding protein. *Pnas* 106 (40): 17193-17198.
- Kant. R., Rintahaka. J., Yu. X., Palva. A., Ossowski. I. V., Mattila. P. S., Paulin. L., Mecklin. J. P., Saarela. M. (2014). A comparative Pan-Genome perspective of niche-adaptable cell-surface protein phenotypes in *Lactobacillus rhamnosus*. *Plos one*. 9 : 1-16.
- Klaenhammer. T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: 337-349.
- Klaenhammer. T. R., Azcarate-Peril. M. A., Altermann. E., Barrangou. R. (2007). The influence of dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. *The Journal of Nutrition Effects of Probiotics and Prebiotics*, 137: 758-750.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C., and Reuter G. (1998) .Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*.41: 103-125.
- Kloos. W. E., Bannerman. T. L. (1999). *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR., Baron EJ., Pfaller MA., Tenover FC., Yalken RH, Ed. Manual of Clinical Microbiology. 7<sup>ème</sup> Ed. *World Cat Washington*, 271-276 PP.
- Kluytmans. J. A. J. W., Wertheim. H. F. L. (2005). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *U. S National Library of Medicine*, 33:3-8.
- Kramer. N.E., Van Hijum. S.A., Knol J., Kok J., Kuipers O.P. (2006). Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lc. lactis* acquires nisin resistance. *Antimicrob.Agents Chemother*, 50: 1753-1761.
- Labioui. H., Elmoualdi. L., Elyachioui. M., Ouhssine. M. (2005). Selection de souches de bacteries lactiques antibacteriennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 144: 237-250.
- Lamoureux. L. (2002). Exploitation de l'activité  $\beta$ -galactosidase de cultures de bifidobactérie en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. *National. Library of Canada*, 23-47.
- Larpent. J.P., Gourgaud. M.L. (1997). Mémento technique de microbiologie, Ed. Technique et Documentation, Paris. 1039 P.
- Lebeer. S., Claes. I., Tytgat. H. L., Verhoeven. T. L., Marien. E., Von Ossowski. I., Reumanen. J., Palu. A., Vos. W. M., Keersmaecker. S. C., Vanderleyder. J. (2012). Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol*, 78(1): 185-193.
- Lopes. S., Bueno. L., De Agular Junior. F., Finkler. C. (2017). Preparation and characterization of alginate and gelatin microcapsules containing *Lactobacillus rhamnosus*, *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 89 (3): 1601 -1613.



## Références bibliographiques

---

- Lucas. S., Reyralle. J. (1989). Etude d'un lot de ferments lactiques mésophiles. Equilibre des flores du cours de la première étape de la fabrication du levain. *Lait*, 69(2): 121-130.
- Luquet.F.M. (1986). Lait et produits laitiers: vache, brebis, chèvre. Ed. Technique et Documentation (Lavoisier), Paris. 445 P.
- Luquet. F. M., Correiu. G. (2005). Bactériocines de bactéries lactiques. In: « Bactéries lactique et probiotiques ». Ed. Tec and Doc, Paris. France. 113-194 PP.
- Luquet. F.M., Correiu .G, (2008), Bactéries lactiques et probiotiques, Lavoisier, Paris, 307 P.
- Maeda. K., Kobayashi. Y., Oie. S., Ishida. S., Okano. Y., Kobayashi. T., Shikichi. K., Mizuno. H., Kamiya. A. (2008). Antimicrobial effects of drugs against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Biol Pharm Bull*, 31: 1898–1901.
- Malago. J.J., Koninkx. J.F.J.G., Logar. R.M. (2011). Probiotic bacteria and enteric infections: Cytoprotection by probiotic bacteria, Ed. Springer, New York, 465 PP.
- Mami. A., Guessas. B., Henni. J., Kihal. M. (2008). Effet inhibiteur des espèces de *Lactobacillus* isolées du lait cru de chèvre, sur la croissance de *Staphylococcus aureus*. *Journal Algérien des Régions Arides*. 07: 01-16.
- Mami.A., Hamedi A.R., Henni. J., Kihal. M., Kerfof. A. (2010). Activité anti-bactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. *Les Technologies Des Laboratoires*. 5(21): 26-33.
- Man, J. C., Rogosa, M., Sharp M., E (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.*, 23: 130-135.
- Marchal. N., Bourdon. J. L., Bimet. F. (1988). Laboratoire de bactériologie médicale. Ed. Doin, Paris. 495 P.
- Marteau. P. H., Daniel. F., Morales. E., Seksik. P.h., Jian. R. (2003). Protection contre les maladies intestinales par des probiotiques. *Cah Nutr Diet*, 38(6): 363-368.
- Mathot. A. G., Beliard. E., Thuault. D. (1996). Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques en microbiologie alimentaire tome 2, aliments fermentés et fermentation alimentaire. Tec & Doc. Ed. Lavoisier. 432-447 PP.
- Mercenier. A., Pavan. S., Pot. B. (2003). Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 175-91.
- Meyer A., Deiana J., Bernard A. (2004). Cours de microbiologie générale. 2<sup>ème</sup> Ed. Doin, France. 134-135 PP.
- Midassirou. B., Mahdhi. A., Chaieb. K., Bakhrouf. A. (2012). Recherche de bactéries lactiques et étude *in vitro* de leurs propriétés probiotiques. *Rev. Microbiol. Ind. San*



## Références bibliographiques

---

*Environn.* 6(2):147-163.

-Mohammedsaeed. W., O'Neill. A., McBain. A. J., Cruickshank.S. M. (2014). *Lactobacillus rhamnosus GG* Inhibits the toxic effects of *Staphylococcus aureus* on epidermal keratinocytes. *Applied and Environmental Microbiologiy.* 80(18): 5773-5781.

-Muller. D., Helenius. J., Alsteens. D., Dufrene. Y. F. (2009). Force probing surfaces of living cells to molecular resolution. *Nat. Chem. Biol.* 5: 383-390.

- Mueller. J. H., Hinton. J. (1941). Protein-free medium for primary isolation of gonococcus and meningococcus. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 48 :330-333.

-Nelly. B., Anthony. T. (2003). L'antibiogramme : La determination des sensibilités aux antibiotiques. Ed. L'antibiogramme Des bactério. Paris, 29 PP.

- Nami. Y., Haghshenas. B., Rosli. R., Abdullah. N., Radiah.D., Barzegari. A., Yari Khosroushahi. A. (2015). Probiotics or antibiotics : future challenges in medicine. *Journal of Medical Microbiology*, 64: 137-146.

-Nguyen. H –T., Kouhoundé. S., Ly. S., Delvigne. F., Truong. D-H., Razafindralambo. H. (2016). Biochemical engineering approaches for increasing viability and functionality of probiotic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences.* 17(867): 1-18.

-Ninane. V., Mukandayambaje. R., Berben. G. (2009). Probiotiques aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(3): 459-466.

-Norwegian Scientific Committee for Food Safety. (2007). Report in risk assessment and use of *Lactobacillus rhamnosus (LGG)* as an ingredient in infant formula and baby foods (II), 32 P.

-Oteng-Gyang. K. (1984). Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Ed. Technique et Documentation (Lavoisier), Paris, 260 P.

-Ould Mouloud. M. M., Ghaber. S. M., Ould Salem. M. L., Baba. S. (2016). Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* communautaires dans la région de Nouakchoh (Mauritanie). *Pan African Médical Journal*, 24: 276-280.

-Palomares. I. C., Pérez-Morales. R., Acedo-Félix. E. (2007). Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev. Latinoam . Microbiol.* 49(3-4): 46-54.

-Papzadeh. M., Rohani. M., Nahrevanian. H., Hosseini. S. N., Shojaosadati. S. A. (2016). *Lactobacillus rhamnosus* Gorbach –Goldin (GG): A top well – researched probiotic strain. *J Med Bacteriol.* 5(5, 6): 46-59.

## Références bibliographiques

---

- Patterson. C. (2008).** Probiotiques: Bienfaits au delà des fonctions nutritionnelles de base. Ed. Agriculture et agroalimentaire, Canada, 4 P.
- Piquepaille. C. (2013).** Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Limoges. France, 183 P.
- Rambaud. J.C., Buts. J.P., Corthier. G., Flourié. B. (2004).** Flore microbienne intestinale : Physiologie et pathologie digestives. Ed. John Libbey Eurotext, Paris, 245 P.
- Rampal. P. (1996).** Les levures : classification, propriétés, utilisations technologiques et thérapeutiques. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 9: 185-186.
- Raoult. D., Obadia. Y. (2010).** Rapport scientifique. Ed. Fondation de Coopération Scientifique, Infectiopole SUD, Paris, 23 P.
- Richards. R. G., Harris. L. G., Foster. S. J. (2002).** An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S.aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European Cells and Materials*, 4: 39-60.
- Roberfroid .M. B., Coscam. V., Delzenne. N. (2008).** Aliments fonctionnels. Ed. Lavoisier, Paris, 1042 P.
- Robin. J.M., Rouchy . A. (2002).** Les probiotiques. *Nutrithérapie Info*, 6 :1-4.
- Sabuda. D. M., Laupland. K., Pitout. J., Dalton. B., Rabin. H., Louie. T., Conly. J. (2008).** Utilization of colistin for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Infect Dis Med Microbiol* , 19: 413–418.
- Sauadogo. A., Traore. A.S. (2011),** La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *Int. J. Biol. Chem. Sci* 5(5): 2057-2075.
- Savadogo. A., Ouattara. C. A.T., Bassole. I. H. N., Traore. A. S. (2004).** Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Journal of Nutrition*, 3(3): 174-179.
- Saxelin. M. (2002).** LGG summatim. Ed. Valio ltd, Finland. 59 P.
- Saxelin. M., Karjalainen. H., Tynkkynen. S., Surakka. A., Hatakka. K., Lassig. A., Mutarren. M., Kopela. R., Vopaaral. H., Jarvenpaa. S. (2010).** Persistence of probiotic strains gastrointestinal tract when administered as capsules, yaghurt, or cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 293-300.
- Schmidt. J., Tourneur. C., Lenoir. J. (1994).** Fonction et choix des bactéries lactiques en technologies laitières. In: De Roissart H et Luquet FM. Bactéries lactiques. Ed. Loriga, Paris, 37-54 PP.
- Schrezenmeir. J., De Vrese. M. (2001).** Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approching a definition. *The American Journal of clinical Nutrition*. 73(2): 361-364.

## Références bibliographiques

---

- Servin. A. L., Coconnier. M. H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17(5): 741-754.
- Silva. M., Deneke. C., Gorbach. S. L., Jacobus. N. V. (1987). Antimicrobial Substance from a Human *Lactobacillus* Strain. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 31(8): 1231-1233.
- Singleton, P. (1999). Biotechnologie, 5<sup>ème</sup> Ed. Dunod; Paris, 304 PP.
- Soussy. C. J. (2012). Société Française de Microbiologie. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: recommandations 2011. CA-SFM, 59 P.
- Song. D., Ibrahim. S., Hayek. S. (2012). Recent application of probiotics in food and agricultural Science. Ed. *licensee InTech*, 36 P.
- Song. H. J., Richard. J. (1997). Anti-*Listeria* activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentration and cross-resistance of the surviveers. *Int.J. Food Microbiol.* 36 (2): 155-161.
- Sutra. L., Federighi. M., Jouve. J. L. (1998). Bactéries lactiques. In: « Manuel de bactériologie alimentaire », Ed. Polytechnica Paris. 235-260 PP.
- Tabak. S., Bensoltane. A. (2011). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature & Technologie.* 6 :71-79.
- Tadesse. G., Ephraim. E., Ashenafi. M. (2004). Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from borde of Shamita, traditional Ethiopian fermented beverage, on some food borne pathogens and effect of growth medium in the inhibitory activity. *Food Safety*, 5: 13-20.
- Tagg . J. R., Dajani. A.S., Wannamaker. L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756.
- Tng .Y.W., Stratton .C.W. (2013). Advanced techniques in diagnostic microbiology. Ed. Springer , New York.419 P.
- Todorov. S. D., Dicks. L. M.T. (2005). Production of bactreocin ST33LD, produced by *Leuconostoc mesentroides subsp. Mesenteroides*, as recorded in the presence of different medium components. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 21: 1585-1590.
- Tortora. G .J., Funke. B.R., Case. C.L., (2012). Introduction à la Microbiologie : Adaptation française Louise Martin, 2<sup>ème</sup> Ed du renouveau pedagogique inc (ERP), Paris, 624 P.
- Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373: 1-6.

## Références bibliographiques

---

- Trerzaghi. B. E., Sandine. W. E. (1975).** Improved media for lactic *Streptococci* and their bacteriophages. *Appl. Environ. Microbol.*, 29: 807-813.
- Valik. L., Medvedova. A., Liptakova. D. (2008).** Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk at suboptimal temperatures. *Journal of Food and Nutrition Research*. 47(2): 60-67.
- Van de Guchte. M., Ehrlich. S. D., Maguin. E. (2001).** Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Applied Microbiology*, 91 : 147-153.
- Van de Guchte. M., Serror. P., Chervaux. C., Smokvina. T., Ehrlich. S. D., Maguin. E (2002).** Stress responses in lactic acid bacteria. *Ant. Van. Lee.* 82: 187-216.
- Vidailhet. M. (2003).** Rapport du groupe de travail « Alimentation infantile et modification de la flore intestinale ». Ed. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Paris, 40 P.
- Wallace. T. D., Bradley. S., Buckley. N. D., Green-Johnson. J. H (2003).** Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. *Journal of Food Protection*, 66 (3): 466-472.
- World Gastroenterology Organisation** (Organisation mondiale de Gastroenterologie), (2008). Probiotiques et Prébiotiques. Recommandations pratique. 23 P.
- World Gastroenterology Organisation Global Guidelines, (2011).** Probiotiques et Prébiotiques. Recommandations pratiques. 3-7 PP.
- Zdolec. N., Kozaeinski. L., Hadziosmanović. M., Cvrtila. Z., Filipović. I. (2007).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in dry fermented sausages. *Veterinarski Arhiv*, 77(6): 507-514.
- Zein. E.F., Karaa. S., Chemaly. A., Saidi. I., Daou - chahine. W., Rohban. R. (2008).** Septicémie à *Lactobacillus rhamnosus* chez une patiente diabétique prenant un traitement probiotique. *Ann Biol*, 66(2): 195-198.
- Yan. F., Polk. B. (2012).** *Lactobacillus rhamnosus* GG: An Updated strategy to use Microbial products to promote Health. *Funct Food Rev.* 4(2): 77-84.
- Yan. F., Liu. L., Dermsey. P. J., Tsai. Y. H., Raines. E. W., Wilson. C. L., Cao. H., Cao. Z., Liu. L., Polk. D. B. (2013).** A *Lactobacillus rhamnosus* GG –derived soluble protein, p40, stimulates ligand release from intestinal epithelial cells to transactivate EGF receptor. Ed. The American society of Biochemistry and Molecular Biology, American, 22 P.

## Annexes

### Annexe I: Composition des milieux de cultures (g/l)

Milieu	Composition
<b>MRS</b> <b>(Man et al., 1960)</b>	Peptone.....10.0g
	Extrait de viande.....8.0g
	Extrait de levure.....4.0g
	Glucose.....20.0g
	Acétate de sodium.....5.0g
	Citrate d'ammonium.....2.0g
	Tween 80.....1000ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....2.0g
	MgSO <sub>4</sub> .....0.2g
	MnSO <sub>4</sub> .....0.05g
	Agar.....10.0g
	Eau distillée.....1000ml
	pH=6.2
	Autoclavage : 121°C/15 min

Milieu	Composition
<b>Muller-Hinton</b> <b>(Mueller et Hinton, 1941)</b>	Extrait de viande.....2g
	Hydrolysate acide de caséine.....17.5g
	Amidon.....1.5g
	Gélose.....10g
	Agar.....17g
	Eau distillée.....1000ml
	pH=7.4
	Autoclavage : 115°C/15 min

## Annexes

Milieu	Composition
<b>M17</b> (Trezaghi et Sandine, 1975)	Extrait de levure.....2.5g
	Extrait de viande .....5g
	Peptone de caséine.....2.5g
	Peptone de viande.....2.5g
	Lactose .....5g
	Peptone de soja.....5g
	Acide ascorbique.....0.5g
	B-glycérophosphate de sodium.....19g
	Agar.....20g
	Sulfate de magnésium.....0.25g
	Eau distillée.....1000 ml
pH=7.2	
Autoclavage : 121°C/15 min	

Milieu	Composition
<b>Gélose nutritive</b> (Singleton, 1999)	Peptone.....10g
	Extrait de viande .....5g
	Chlorure de sodium.....5g
	Gélose .....15g
	Eau distillée.....1000 ml
	pH=7.2
Autoclavage : 120°C/20 min	

## Annexes

Milieu	Composition
<b>Cétrimide</b> <b>(Brownande et Lowbury, 1965)</b>	Cétrimide.....0.2g
	Peptone.....20g
	Chlorure de magnésium.....3g
	Sulfate de potassium.....10g
	Glycérol.....10 ml
	Phosphate dipotassique.....0.3g
	Acide nalidixique (facultatif selon les formules).....15mg
	Gélose.....13g
	Eau distillée..... 1000ml
	pH=7.2
Autoclavage : 120°C/15 min	

Milieu	Composition
<b>Chapman</b> <b>(Meyer et al., 2004)</b>	Peptone.....10g
	Extrait de viande de bœuf.....1g
	Chlorure de sodium .....75g
	Mannit.....10g
	Rouge de phénol.....0.025g
	Agar agar.....15g
	Eau distillé.....1000ml
	pH=7.4
Autoclavage : 120°C/15 min	

## Annexes

Milieu	Composition
<b>Mac Conkey (Guzlane. et al., 2008)</b>	Hydrolysate pancréatique de gélatine.....17g
	Hydrolysate pancréatique de caséine.....1.5g
	Hydrolysate pepsique de tissus animaux.....1.5g
	Lactose.....10g
	Sels biliaires.....1.5g
	Chlorure de sodium.....5g
	Rouge neutre..... 0.0 3g
	Crystal violet.....0.001g
	Agar agar.....13.5g
	Eau distillée..... 1000ml
	pH= 7.4
	Auclavage à 110°C/30 min

### ➤ Milieux liquides

Milieu	Composition
<b>MRS (Man, et al., 1960)</b>	Peptone..... 10g
	Extrait de viande.....8.0g
	Extrait de levure.....4.0g
	Glucose.....20.0g
	Acétate de sodium.....5.0g
	Citrate d'ammonium.....2.0g
	Tween 80..... 1000 ml
	KH <sub>2</sub> P <sub>4</sub> .....2.0g
	MgSO <sub>4</sub> .....0.2g
	MnSO <sub>4</sub> .....0.05g
	Eau distillée..... 1000 ml
	pH=6.2
	Autoclavage : 121°C/15 min



## Annexes

Milieu	Composition
<b>M17</b> <b>(Trezaghi et Sandine, 1975)</b>	Extrait de levure.....2.5g
	Extrait de viande.....5g
	Peptone de caséine.....2.5g
	Peptone de viande.....2.5g
	Peptone de soja.....5g
	Acide ascorbique.....0.5g
	B-glycérophosphate de sodium.....19g
	Sulfate de magnésium.....0.25g
	Eau distillée.....1000 ml
	pH=7.1 Autoclavage : 121°C/15 min

Milieu	Composition
<b>Bouillon nutritif</b> <b>(Singleton, 1999)</b>	Peptone.....10g
	Extrait de viande.....5g
	Chlorure de sodium.....5g
	Eau distillée.....1000 ml
	pH=7.2 Autoclavage : 120°C/20min

**Lait (Candia) « Alger »**



## Annexes

### Annexe II : Technique de coloration de Gram ( Selon Joffin et Leyral, 2006)

<b>Coloration de Gram</b>	
<b>Technique</b>	<b>Résultats</b>
-Réaliser le frottis et le fixer. -Colorer au violet de gentiane (cristal) phénolé durant environ 1 min. -Laver à l'eau distillée (ou de robinet). -Faire agir la solution de lugol durant environ 1 min. -Laver à l'eau distillée (ou de robinet). -Faire agir l'éthanol à 0.95 durant 10 secondes ou faire couler l'éthanol sur la lame jusqu'à décoloration. -Laver à l'eau distillée (ou de robinet). -Colorer à la fuchsine phénolée de quelques secondes à 1 min selon sa concentration. -Laver à l'eau distillée(ou du robinet). -Observer après séchage à l'immersion (objectif x100) et à pleine lumière.	<p><b>Les bactéries à Gram positif apparaissent violettes</b></p> <p>et</p> <p><b>Les bactéries Gram négatif sont roses</b></p>

### Annexe III : Tableaux de lecture de la galerie API 20 E (Delarras, 2007)

➤ Extrait du tableau de lecture de la galerie API 20 E (tests ONPG à VP)

<b>Tests</b>	<b>Résultats</b>	
	Négatif	Positif
<b>ONPG</b>	Incolore	Jaune (et coloration jaune légère)
<b>ADH</b>	Jaune	Rouge/Orange <sup>2</sup>
<b>LDC</b>		
<b>ODC</b>		
<b>CIT</b>	Vert pale/jaune	Bleu-Vert/bleu(dans la cupule)
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
<b>URE</b>	Jaune	Rouge/Orange
<b>TDA<sup>1</sup></b>	Jaune	Marron-rougeâtre
<b>IND<sup>1</sup></b>	Incolore Vert pale/jaune	Rose
<b>VP<sup>1</sup></b>	Incolore	Rose/rouge (après 10 min, noter négatif)

**ONPG** : Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside

**VP** : Vosges Proskauer

## Annexes

<sup>1</sup>. Ajout de réactifs pour la lecture de ces tests ; <sup>2</sup>Une couleur orange après 36 à 48 h d'incubation traduit un résultat négatif.

➤ Extrait du tableau de lecture de la galerie API 20 E (Tests GEL à ARA)

Tests	Résultats	
	Négatif	Positif
<b>GEL</b> <sup>1</sup>	Pas de diffusion	Diffusion du pigment noir
<b>GLU</b>	Bleu/bleu-vert Jaune <sup>2</sup>	Jaune <sup>2</sup>
<b>MAN</b>		
<b>INO</b>		
<b>SOR</b>		
<b>PHA</b>		
<b>SAC</b>		
<b>MEL</b>		
<b>AMY</b>		
<b>ARA</b> <sup>1</sup>		
<b>OX</b>		

**GEL** : Gellatine

**ARA** : Arabinose

<sup>1</sup>. Tests GLU à ARA : réaction de fermentation/oxydation des sucres.

<sup>2</sup>. La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes. L'oxydation commence dans la cupule.

## Annexe IV: Guide de la galerie Api 20E

REF 20 100 / 20 160

07584H - fr - 2009/06

api® 20 E

IVD

Système d'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux

## INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'identification en fin de notice.

## PRINCIPE

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

## PRESENTATION

## Coffret de 25 tests (réf. 20 100)

- 25 galeries API 20 E
- 25 boîtes d'incubation
- 25 fiches de résultats
- 1 barrette de fermeture
- 1 notice

## Coffret de 100 tests (réf. 20 160)

- 100 galeries API 20 E (4x25 galeries)
- 100 boîtes d'incubation
- 100 fiches de résultats
- 1 barrette de fermeture
- 1 notice

## COMPOSITION DE LA GALERIE

La composition de la galerie API 20 E est reportée dans le Tableau de Lecture de cette notice.

## REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

## Réactifs

- API NaCl 0,85 % Medium, 5 ml (Réf. 20 230) ou API Suspension Medium, 5 ml (Réf. 20 150)
- API 20 E coffret de réactifs (Réf. 20 120) ou réactifs individuels : TDA (Réf. 70 402)  
JAMES (Réf. 70 542)  
VP 1 + VP 2 (Réf. 70 422)  
NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)
- Réactif Zn (Réf. 70 380)
- Oxydase (Réf. 55 635\*)  
\* référence non commercialisée dans certains pays : utiliser un réactif équivalent.
- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- Catalogue Analytique API 20 E (Réf. 20 190) ou logiciel d'identification **apiweb™** (Réf. 40 011) (consulter bioMérieux)

## Matériel

- Pipettes ou PSipettes
- Protège-ampoule
- Portoir pour ampoules
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

## REACTIFS COMPLEMENTAIRES

- API OF Medium (Réf. 50 110) :  
Test pour la détermination du métabolisme fermentatif ou oxydatif du glucose.
- API M Medium (Réf. 50 120) :  
Test pour la détermination de la mobilité des bactéries aéro-anaérobies.

## PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle micro-biologique.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* - Révision en vigueur". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Dernière édition", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage des différents composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, sachet déshydratant ouvert, ...
- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.

## CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries sont présentes dans une poche en aluminium avec sachets déshydratants.

Après ouverture de celle-ci (\*), conserver les galeries restantes avec les déshydratants en refermant la poche à l'aide de la barrette de fermeture (présente dans le coffret) : placer l'extrémité de la poche entre les deux pièces de la barrette et les clamer soigneusement, à fond, sur toute leur longueur. Les galeries peuvent ainsi être conservées **10 mois après ouverture de la poche**, à 2-8°C (ou jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage, si celle-ci est antérieure).

(\* *Recommandation pour l'ouverture de celle-ci* : couper juste en dessous de la soudure, en maintenant la poche droite, pour éviter d'endommager les sachets déshydratants.

## ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API 20 E ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autres.

Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté à la culture des *Enterobacteriaceae* et/ou des bacilles à Gram négatif non fastidieux selon les techniques usuelles de bactériologie.

## MODE OPERATOIRE

### Test oxydase

Le test oxydase doit être réalisé selon les instructions du fabricant, il constitue le 21<sup>ème</sup> test d'identification à noter sur la fiche de résultats.

### Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
- Sortir la galerie de son emballage.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

**NOTE** : API 20 E doit être utilisé avec des *Enterobacteriaceae* et/ou des bacilles à Gram négatif non fastidieux. Les microorganismes fastidieux, exigeants et nécessitant des précautions de manipulation particulières (ex. *Brucella* et *Francisella*) ne font pas partie de la base de données API 20 E. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour exclure ou confirmer leur présence.

### Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (5 ml) ou une ampoule d'API Suspension Medium (5 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions" de la notice du produit, ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif.
- A l'aide d'une pipette ou d'une PSlpette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

**NOTE** : la plupart des espèces de *Vibrio* sont halophiles. En cas de suspicion d'un *Vibrio*, réaliser la suspension bactérienne dans API NaCl 0,85 % Medium.

## Inoculation de la galerie

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSlpette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) :
  - pour les tests [CIT], [VP] et [GEL], remplir tube et cupule,
  - pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
  - pour les tests : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.

## LECTURE ET INTERPRETATION

### Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
  - Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur **marron-rougeâtre** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.
  - Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur **rose** diffusant dans toute la cupule indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.
  - Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur **rose** ou **rouge** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration **rose** apparaissant après 10 minutes doit être considérée **negative**.
- **NOTE** : Le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.
- Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à 3 :
  - Réincuber la galerie 24 heures (± 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.
  - Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir paragraphe précédent).
  - Pour compléter l'identification, il peut être utile de réaliser des tests complémentaires (se reporter au paragraphe Identification).

### Interprétation

L'identification est obtenue à partir du **profil numérique**.

- Détermination du profil numérique :  
Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21<sup>ème</sup> test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.
- Identification :  
Elle est réalisée à partir de la base de données (V4.1)  
\* à l'aide du Catalogue Analytique :
  - Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.  
\* à l'aide du logiciel d'identification **apiweb™** :
  - Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.

Par ailleurs dans certains cas, le profil à 7 chiffres étant insuffisamment discriminant, les tests complémentaires suivants sont nécessaires :

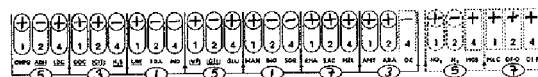
- Réduction des nitrates en nitrites (NO<sub>2</sub>) et en azote (N<sub>2</sub>) : ajouter 1 goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le tube GLU. Attendre 2 à 5 minutes. Une coloration **rouge** indique une réaction **positive** (NO<sub>2</sub>). Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) : ajouter 2 à 3 mg de réactif Zn dans la cupule GLU. Après 5 minutes, un tube resté **jaune** indique une réaction **positive** (N<sub>2</sub>) à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule est **orange-rouge**, la réaction est **négative**, les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zinc.

Cette réaction est intéressante pour les bacilles à Gram négatif oxydase positive.

**NOTE :** Pour les mêmes raisons que le test indole (se référer à la note du paragraphe "Lecture de la galerie"), le test de réduction des nitrates doit être réalisé en dernier.

- Mobilité (MOB) : Inoculer une ampoule d'API M Medium (cf notice).
- Culture sur gélose de MacConkey (McC) : Ensemencer un milieu de Mac Conkey (cf notice).
- Oxydation du glucose (OF-O) : Inoculer une ampoule d'API OF Medium (cf notice).
- Fermentation du glucose (OF-F) : Inoculer une ampoule d'API OF Medium (cf notice).

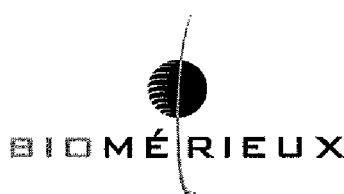
Ces tests complémentaires, mentionnés dans l'introduction (Codage des profils) du Catalogue Analytique, peuvent être utilisés pour constituer un profil à 9 chiffres, identifiable avec le logiciel d'identification.



5 315 173 (57) *Enterobacter gergoviae*

D'autres tests supplémentaires peuvent être proposés en cas de faible discrimination. Se référer au logiciel ou Catalogue Analytique.

bioMérieux, le logo bleu, API et **apiweb** sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales. ATCC est une marque appartenant à American Type Culture Collection. Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.



**bioMérieux SA**  
 au capital de 12 029 370 €  
 RCS LYON 673 620 399  
 69280 Marcy-l'Etoile / France  
 Tél. 33 (0)4 78 87 20 00  
 Fax 33 (0)4 78 87 20 90  
<http://www.biomerieux.com>

**bioMérieux, Inc**  
 Box 15969,  
 Durham, NC 27704-0969 / USA  
 Tél. (1) 919 620 20 00  
 Fax (1) 919 620 22 11



Imprimé en France

## Annexes

### Annexe V : Tableaux de lecture de la galerie API Staph (BioMérieux, REF 20 500, France, 2009)

Tests	Résultats	
	Négatif	Positif
<b>0</b>	rouge	-
<b>GLU</b>	rouge	jaune
<b>FRU</b>		
<b>MNE</b>		
<b>MAL</b>		
<b>LAC</b>		
<b>TRE</b>		
<b>XLT</b>		
<b>MEL</b>		
<b>NIT</b>		
	Incolore – rose pale	rouge
<b>PAL</b>	ZIM A+ZIM B/10 min	
	jaune	violet
<b>VP</b>	VP 1+VP 2/10 min	
	Incolore –rose pale	rouge
<b>RAF</b>	rouge	jaune
<b>XYL</b>		
<b>SAC</b>		
<b>MDG</b>		
<b>NAG</b>		
<b>ADH</b>	jaune	orange-rouge
<b>URE</b>	jaune	rouge-violet

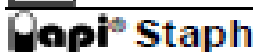
Les tests d'acidification doivent être lus comparativement aux témoins négatif (0) et positif (GLU).

- Les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de tests positifs, on doit alors considérer comme négatifs.
- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.

## Annexe VI: Guide de la galerie API Staph

REF 20 500

CHARRÉ - 9 - 2009/11



IVD

Système d'identification des staphylocoques, microcoques et apparentés

## INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API Staph est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Acetivibrio* comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'identification en fin de notice.

## PRINCIPE

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstruit les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou réalisés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et d'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

## PRESENTATION (coffret de 25 tests)

- 25 galeries API Staph
- 25 boîtes d'incubation
- 25 ampoules d'API Staph Medium
- 25 fiches de résultats
- 1 notice

## COMPOSITION

## Galerie

La composition de la galerie API Staph est reportée dans le tableau de lecture de cette notice.

## Milieu

API Staph Medium 6 ml	Extrait de levure Bacto-peptone (origine bovine/porcine) NaCl Oligoéléments Eau déminéralisée pH : 7,0 - 7,4	0,5 g  10 g 5 g 10 ml qsp 1000 ml
--------------------------	--	--

## REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

## Réactifs

- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- Réactifs : VP 1 + VP 2 (Réf. 70 422)  
NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)  
ZYM A (Réf. 70 494)  
ZYM B (Réf. 70 492)
- McFarland Standard (Réf. 70 900)
- Catalogue Analytique API Staph (Réf. 20 590) ou logiciel d'identification *apiweb™* (Réf. 40 011) (consulter [www.bioMérieux.com](http://www.bioMérieux.com))

## Matériel

- Pipettes ou PO pipettes
- Portoir pour ampoules
- Protège-ampoule
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

## PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle microbiologique.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation; se référer à "CLSI M29-A, Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline - Révision en vigueur". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Dernière édition", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage et des composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : capsule déformée, sachet déshydratant ouvert, ...
- Ouvrir les ampoules délicatement comme suit :
  - Placer l'ampoule dans le protège-ampoule.
  - Tenir l'ensemble verticalement dans une main (bouchon blanc vers le haut).
  - Bien enfoncez le bouchon.
  - Exercer une pression horizontale avec le pouce sur la partie striée du bouchon de façon à casser l'extrémité de l'ampoule.
  - Retirer l'ampoule du protège-ampoule et conserver le protège-ampoule pour une utilisation ultérieure.
  - Enlever délicatement le bouchon.
- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.
- Il est recommandé de réaliser un contrôle qualité avant d'utiliser chaque nouvelle ampoule de réactif ZYM B.





**CONDITIONS DE STOCKAGE**

Les galeries et milieux se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

**ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)**

API Staph ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autre. Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.

**MODE OPERATOIRE**

**Préparation de la galerie**

- Rasoir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée (ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl<sub>2</sub>, OCl<sub>2</sub>...)) dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

**Préparation de l'inoculum**

- Réaliser une pré-culture sur gélose Columbia au sang (ou Agar P) 18-24 H à 36°C à 37°C.
- Vérifier l'appartenance de la souche à la famille des Micrococccaceae (morphologie, Gram, catalase...), ainsi que sa pureté.
- Ouvrir une ampoule d'API Staph Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation".
- Préparer une suspension bactérienne homogène, d'opacité égale à 0,5 de McFarland. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures). Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

**Inoculation de la galerie**

- A l'aide d'une pipette ou d'une Pôlipette, remplir les tubes de la galerie avec API Staph Medium ensemençé. Ne remplir que les tubes et non les cupules, sans dépasser le niveau du tube. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser le pointe de la pipette ou de la Pôlipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH et UBE en remplaçant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe.
- Rincer la boîte d'incubation.
- Incuber à 36°C à 37°C pendant 18-24 heures.

**LECTURE ET INTERPRETATION**

**Lecture de la galerie**

- Après incubation, lire les réactions conformément au Tableau de Lecture en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants :
  - Test VP : VP 1 et VP 2. Attendre 10 minutes. Une couleur rose franche ou violette indique une réaction positive. Une couleur rose pâle ou rose claire obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.
  - Test HIT : HIT 1 et HIT 2. Attendre 10 minutes. Une coloration rouge indique une réaction positive.
  - Test PAL : ZYM A et ZYM B (\*). Attendre 10 minutes. Une coloration violette indique une réaction positive. (\*) Il est recommandé de contrôler chaque ampoule de réactif ZYM B avant la 1<sup>ère</sup> utilisation. Pour cela, il est recommandé d'utiliser la souche ATCC<sup>®</sup> 706484 mentionnée au paragraphe Contrôle Qualité afin d'exclure tout réactif défectueux.
- Noter les résultats sur la fiche de résultats.

**Test de résistance à la lysostaphine**

Déterminer la résistance à la lysostaphine sur milieu Agar P selon la procédure suivante ou selon les recommandations du fabricant. Pour cela, ensemençer par inondation la surface d'une gélose Agar P avec une suspension bactérienne d'environ 10<sup>8</sup> germes/ml. Laisser sécher 10-20 min à 36°C à 37°C. Déposer à la surface de la gélose, une goutte d'une solution de lysostaphine à 200 µg/ml. Incuber 18-24 H à 35-37°C. Une lyse totale ou partielle de la culture bactérienne indique une sensibilité à l'enzyme. Ce test constitue le 21<sup>ème</sup> test de la galerie. Il est considéré positif en cas de résistance à la lysostaphine.

**Interprétation**

- L'identification est obtenue à partir du profil numérique.
  - Détermination du profil numérique : Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique.
  - Identification : Elle est réalisée à partir de la base de données (V 4.1)
    - \* à l'aide du Catalogue Analytique :
      - Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.
    - \* à l'aide du logiciel d'identification *apiweb*<sup>™</sup> :
      - Entrer manuellement ou cliquer le profil numérique à 7 chiffres.



API 700 113 Staphylococcus epidermidis

### CONTROLE DE QUALITE

Les galeries, milieux et réactifs font l'objet de contrôles de qualité systématiques à différentes étapes de leur fabrication. Le Contrôle de Qualité Minimum peut être utilisé pour vérifier que les conditions de stockage et de transport n'ont pas d'impact sur les performances de la galerie API STAPH. Ce contrôle peut être réalisé en suivant les instructions et critères attendus ci-dessus en lien avec le référentiel CLSI M50-A Quality Control for Commercial Microbial Identification Systems.

Le contrôle peut être fait en utilisant la souche *Staphylococcus capitis* ATCC<sup>®</sup> 35061 pour évaluer les performances du test XYL. Des études réalisées par bioMérieux ont montré que sur la galerie API STAPH, le test XYL est le test le plus sensible. Lors du contrôle, l'intégrité de la galerie peut être vérifiée en utilisant la souche *Staphylococcus capitis* ATCC 35061.

Dans le cas où un Contrôle de Qualité Complet est exigé pour cette galerie, les trois souches suivantes doivent être testées pour vérifier les réactions positives et négatives de la plupart des tests de la galerie API STAPH.

- |                                  |             |                                 |             |
|----------------------------------|-------------|---------------------------------|-------------|
| 1. <i>Staphylococcus capitis</i> | ATCC 35061  | 3. <i>Staphylococcus lentus</i> | ATCC 700400 |
| 2. <i>Staphylococcus xylosum</i> | ATCC 700404 |                                 |             |

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20108-0009, USA.

	U	GU	FRU	MRU	VAL	LAC	TRH	MAN	GLU	MEU	ST	PR	OP	RAF	STL	SPC	MOO	NAG	ADH	URE
1.	-	+	+	+	-	-	-	V	-	-	+	-	+	-	-	- <sup>a</sup>	-	-	+	-
2.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	V	-	+	+	-	+	-	+
3.	-	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	V	V	+	+	+	+	+	-	-

<sup>a</sup> Ce résultat peut varier en fonction du milieu de culture utilisé.

Profil obtenu après culture des souches sur gélose au sang de mouton.

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en œuvre conformément à la législation locale en vigueur.

#### LIMITES DU TEST

- Le système API Staph est destiné à l'identification des espèces mentionnées dans la base de données (voir Tableau d'identification en fin de notice), et à elles seules. Il ne peut être utilisé pour identifier d'autres microorganismes ou exclure leur présence.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.

#### • Microcoques/Kocourie

- 171 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :
  - 87,73 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
  - 7,60 % des souches n'ont pas été identifiées.
  - 4,66 % des souches ont été mal identifiées.

#### RESULTATS ATTENDUS

Se référer au Tableau d'identification en fin de cette notice pour les résultats attendus des différentes réactions biochimiques.

#### ELIMINATION DES DECHETS

Éliminer les réactifs utilisés ou non utilisés ainsi que les matériaux à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux. Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

#### PERFORMANCES

- **Staphylocoques**
  - 2104 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :
    - 92,49 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
    - 4,42 % des souches n'ont pas été identifiées.
    - 3,09 % des souches ont été mal identifiées.

**TABLEAU DE LECTURE**

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	CDE (mg/ml)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTAT	
				NEGATIF	POSITIF
0	Auon		Témoin négatif	rouge	—
GLU	D-glucose	1,50	(Témoin positif) (D-Glucose)	rouge*	jaune
FRU	D-fructose	1,4	acidification (D-FRuctose)		
MNE	D-mannose	1,4	acidification (D-Mannose)		
MAL	D-malose	1,4	acidification (MALlose)		
LAC	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACTose)		
TRG	D-tréhalose	1,30	acidification (D-TRÉhalose)		
MAN	D-mannitol	1,30	acidification (D-MANNitol)		
XLT	xylitol	1,4	acidification (XyLITol)		
MEL	D-mélibiose	1,30	acidification (D-MELbiose)		
NT	nitrate de potassium	0,08	Réduction des NITrates en nitrites		
PAL	D-nicotyl phosphate	0,004	Phosphatase Alcaline	<u>276 A + 276 B / 10 min</u> jaune	violet
VP	sodium pyruvate	1,004	production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges-Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u> incolor-rose pâle	violet-rose
RAF	D-raffinose	1,50	acidification (RAFtrose)	rouge	jaune
XYL	D-xyllose	1,4	acidification (XYLose)		
SAC	D-saccharose	1,30	acidification (SACcharose)		
MDG	méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	1,20	acidification (Méthyl- $\alpha$ -Glucopyranoside)		
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,20	acidification (N-Acetyl-Glucosamine)		
ARG	L-arginine	1,004	Arginine Dihydrolyase	jaune	orange-rouge
URE	urée	0,70	URÉase	jaune	rouge-violet


Les tests d'acidification doivent être lus comparativement aux témoins négatif (0) et positif (GLU).

- \* Les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de tests positifs. On doit alors les considérer comme négatifs.
- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

METHODOLOGIE	p. I
TABLEAU D'IDENTIFICATION	p. II
BIBLIOGRAPHIE	p. III
TABLES DES SYMBOLES	p. IV

BIOMÉRIEUX, le logo BEX, AP et d'ailleurs sont des marques déposées, déposées et/ou enregistrées appartenant à BIOMÉRIEUX SA ou à l'une de ses filiales. ATCC est une marque appartenant à American Type Culture Collection.  
Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.




**BIOMÉRIEUX SA**  
 RCS LYON 875 620 390  
 69200 Marcy-l'Étoile / France  
 Tél. 33 (0)4 78 67 20 00  
 Fax 33 (0)4 78 67 20 00  
 www.biomerieux.com

**bioMérieux, Inc.**  
 Box 15940  
 Durham, NC 27704-0940 / USA  
 Tél. (1) 919 620 20 00  
 Fax (1) 919 620 22 11  
 Imprimé en France



## Annexes

### Annexe VII : Concentrations et DMI des antibiotiques utilisés (Selon Soussy, (2012)).

Antibiotiques	Concentration	Diamètre critique (mm)		
		Résistance	Intermédiaire	Sensibilité
<b>Ampicilline (AM)</b>	10µg	< 16	17-20	≥ 21
<b>Metronidazole (MTZ)</b>	5µg	< 21	-	≥ -
<b>Colistin sulfate (CS)</b>	10µg	< 10	-	≥ -
<b>Novobiocine (NV)</b>	30µg	< 10	-	≥ -
<b>Acide Nalidixice (NA)</b>	30µg	< 23	-	≥ -
<b>Ticarcilline (TIC)</b>	75UI	< 22	-23 -	≥ 24
<b>Tetracycline(TE)</b>	30µg	< 17	18 -	≥ 19
<b>Ceftazidime (CAZ)</b>	30µg	< 21	22-25	≥ 26
<b>Doxycycline (DO)</b>	30µg	< 10	11-12	≥ 13
<b>Cefalotine (CF)</b>	30µg	< 12	13-17	≥ 18
<b>Oxacilline (OX)</b>	5µg	< 17	-	≥ 18
<b>Gentamicine (GM)</b>	10UI	< 16	-17-	≥ 18
<b>Polymixine (PB)</b>	30µg	< 8	-	≥ 9
<b>Ciprofloxacin (CIP)</b>	5µg	< 22	23-24	≥ 25
<b>Rifampicine (RA)</b>	30µg	< 14	15-18	≥ 19

UI: Unité Internationale

µg: microgramme

## Annexes

---

### **Annexe VIII: Standardisation 0.5Mc Farland de l'inoculum (Selon Soussy, 2012).**

La solution de Mc Farland sert de standard de turbidité pour préparer des suspensions de microorganismes. Les standards de turbidité se préparent en mélangeant des produits chimiques qui se précipitent pour former une solution de turbidité reproductible.

Les standards Mc Farland sont préparés par ajout d'acide sulfurique à une solution aqueuse de chlorure de baryum, ce qui entraîne la formation d'un précipité de sulfate de baryum en suspension.

BaCl<sub>2</sub> (0.048M).....0.5ml

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.18).....99.5ml

- Le standard de 0.5 Mc Farland devrait avoir une densité optique comprise entre (0.08-0.13). Dans cet intervalle le nombre de germes est de  $6 \times 10^7$  à  $6 \times 10^8$  UFC/ml.
- Longueur d'onde : 625nm

## Annexes

### Annexe IX : Tableaux de l'ensemble des résultats obtenus dans notre étude

#### ➤ Cinétique de croissance des bactéries pathogènes

Temps (h)	0	2	4	6	8	24	26	28
<i>E.coli</i>	0.1	0.192	0.24	0.47	0.705	0.78	0.981	0.986
<i>S.aureus</i>	0.1	0.328	0.335	0.361	0.393	0.454	0.665	0.709
<i>P.aeruginosa</i>	0.1	0.232	0.512	0.583	0.6	0.646	0.858	0.865

#### ➤ Cinétique de croissance des bactéries lactiques

Temps (h)	0	2	4	6	8	24	26
<i>L.rhamnosus GG</i>	0.1	0.354	0.548	0.816	0.934	1.176	1.17
<i>L.rhamnosus LA801</i>	0.1	0.525	0.811	0.997	1.134	1.145	1.138

#### ➤ Résultats de pH et acidité de *L.rhamnosus GG*

Temps (h)	0	2	4	6	24
pH	6.64	6.59	6.46	6.38	4.97
Acidité (°D)	23	24	29	29	6.6

#### ➤ Résultats de pH et acidité de *L.rhamnosus LA801*

Temps(h)	0	2	4	6	24
pH	6.62	6.56	6.45	6.29	4.74
Acidité (°D)	21	27	28	28	69

#### • Antagonisme des deux produits probiotiques vis-à-vis des bactéries pathogènes

Temps (h)		Bactéries pathogènes		
		<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
0		0.1	0.1	0.1
2		0.192	0.101	0.232
4		0.24	0.135	0.512
6	Surnageant neutralisé de <i>L.rhamnosus GG</i>	0.421	0.200	0.603
	Surnageant non neutralisé de <i>L.rhamnosus GG</i>	0.398	0.45	0.55
	Surnageant neutralisé de <i>L.rhamnosus LA801</i>	0.423	0.344	0.654

## Annexes

	<b>Surnageant non neutralisé de <i>L.rhamnosus LA801</i></b>	0.413	0.33	0.508
	<b><i>Hcl</i></b>	0.438	0.688	0.58
<b>8</b>	<b>Surnageant neutralisé de <i>L.rhamnosus GG</i></b>	0.655	0.417	0.687
	<b>Surnageant non neutralisé de <i>L.rhamnosus GG</i></b>	0.636	0.487	0.664
	<b>Surnageant neutralisé de <i>L.rhamnosus LA801</i></b>	0.666	0.4	0.756
	<b>Surnageant non neutralisé de <i>L.rhamnosus LA801</i></b>	0.6	0.371	0.532
	<b><i>Hcl</i></b>	0.38	0.5	0.5
<b>10</b>	<b>Surnageant neutralisé de <i>L.rhamnosus GG</i></b>	0.663	0.46	0.673
	<b>Surnageant non neutralisé de <i>L.rhamnosus GG</i></b>	0.697	0.613	0.651
	<b>Surnageant neutralisé de <i>L.rhamnosus LA801</i></b>	0.721	0.445	0.793
	<b>Surnageant non neutralisé de <i>L.rhamnosus LA801</i></b>	0.658	0.36	0.654
	<b><i>Hcl</i></b>	0.3	0.452	0.49

### Annexe X: Produits lactiques utilisés dans notre expérimentation

#### ❖ Lactibiane®



> Complément alimentaire à base de souches microbiotiques dosées à 12 milliards par gélule

Lactibiane ATB est composé de la souche microbiotique *Lactobacillus rhamnosus LA801*.

## Annexes

---

**Ingrédients** : Agent de charge : amidon de maïs, ferments lactiques, gélule d'origine végétale, anti-agglomérant : stéarate de magnésium

### **Conseils d'utilisation**

1 gélule par jour, avec un grand verre d'eau. A prendre avant un repas. A conserver dans un endroit frais et sec.

Toutes les souches sélectionnées pour la gamme Lactibiane répondent aux critères de qualité :

- Survie et résistance tout au long du tube digestif (acidité gastrique, bile...)
- Capacité d'adhésion évaluée dans des modèles *in vitro*
- Stabilité testée dans le produit fini
- Sélectionnées par PiLeJe, elles sont inscrites à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM).
- Lactibiane est **fabriqué en France**

### ❖ **Probiolog**



#### **Probiolog enfant nourrisson sticks - boîte de 10 sticks**

Probiolog enfant nourrisson sticks contient une souche de bactérie vivante, *Lactobacillus rhamnosus GG*, naturellement présente dans la flore intestinale.

#### **Utilisation**

De 0 à 2 ans : diluer le contenu du stick dans un biberon d'eau ou de lait.

A partir de 2 ans : verser le contenu du stick directement dans la bouche ou le diluer dans un verre d'eau.



# Résumé

## Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer *in vitro* l'effet inhibiteur de deux ferments lactiques: *Lactobacillus rahmnosus GG* et *Lactobacillus rahmnosus LA80I*, vis-à-vis *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* responsables des infections humaines.

Les caractères technologiques des deux ferments ont été testés. Il s'avère que *L. rahmnosus LA80I* est plus performante (69°D avec un pH= 4.74) par rapport à *L. rahmnosus GG* (66°D avec pH = 4.97).

Les trois bactéries pathogènes étudiées ont été confirmées par différents tests (Morphologique, biochimique et antibiogramme).

L'activité antibactérienne de nos ferments probiotiques a montré un effet inhibiteur important vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* par rapport aux autres souches bactériennes, ceci est expliqué par la production des acides lactiques et bactériocines like.

**Mots clés :** Effet probiotique, *Lactobacillus rahmnosus GG*, *Lactobacillus rahmnosus LA80I*, souches pathogènes, acide lactique, bactériocines like.

## المخلص

ان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التأثير المثبط لنوعين من باديء حامض اللاكتيك

، *Escherichia coli* ضد *Lactobacillus rahmnosus LA80I* و *Lactobacillus rahmnosus GG* و *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و المسؤولية عن عدوى الانسان.

تم التأكد من الأنواع الثلاث للبكتيريا الممرضة المستخدمة و ذلك من خلال القيام بعدة اختبارات (المورفولوجية أو الشكالية، البيوكيميائية و الحساسية للمضادات الحيوية).

تم اختبار الخصائص التكنولوجية لكلا باديء حامض اللاكتيك، حيث تبين أن *L. rahmnosus LA80I* أكثر كفاءة (69 درجة حموضة مع رقم هيدروجيني يساوي 4.74) مقارنة مع *L. rahmnosus GG* (66 درجة حموضة مع رقم هيدروجيني يساوي 4.97).

أظهر النشاط المضاد للبكتيريا لباديء حامض اللاكتيك وجود تأثير مثبط هام ضد بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* مقارنة مع السلالات البكتيرية الأخرى، يمكن تفسير ذلك بإنتاجها للأحماض اللبينية و البكتيريوسينات. **الكلمات المفتاحية:** تأثير البروبيوتيك، *Lactobacillus rahmnosus GG*، *Lactobacillus rahmnosus LA80I*، سلالات ممرضة، حامض اللاكتيك، بكتيريوسينات متشابهة.

