

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
de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de
Master académique*

Domaine Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité : Sciences des Procédés Biotechnologiques et Agroalimentaires

Présenté et soutenu publiquement par

- **BOUDINE** Aicha
- **BENCHAIB** Mahdjouba
- **ZOUBIDA** Houaria

*Effet probiotique de quelques ferments
lactiques sur certaines bactéries pathogènes
responsables d'infections humaines*

Membres de Jury

Grade

- **Président : Dr. MEDJBER** Nacéra **MCB**
- **Promoteur: Dr. TABAK** Souhila **MCB**
- **Co-promoteur: Dr. DOUKANI** Koula **MCA**
- **Examineur : Dr. YEZLI** Wassim **MCB**

Année Universitaire : 2016-2017

Remerciements

Remerciements

Avant tout

on remercie « ALLAH » le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce modeste travail.

Nos vifs remerciements et notre profonde gratitude s'adressent à nos encadreurs Dr. TABAK Souhila et Dr. DOUKANI Koula, on les remercie infiniment pour leur grande patience, encouragements, aide et leurs conseils judicieux, durant la réalisation du présent travail.

Nous tenons à remercier les membres de jury Dr. MEDJBER Nacéra et Dr. YEZLI Wassim d'avoir accepté de juger notre modeste travail.

On tient à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de Microbiologie, Biochimie et Technologie alimentaire pour leur soutien, leur gentillesse et leur grande disponibilité surtout Melle SOUALEMI Kheira, Melle BOUHENNI Hasna, Mer AOUALI Houari et Melle BENSATAR Karima.

Un grand merci va également à GUEROUMI Ahmed et ZOUBIDA Kheira pour leur aide durant la réalisation de ce manuscrit.

Enfin

Merci

à ceux qui ont collaboré de près ou de loin pour l'élaboration de ce travail

Dédicace

A ma très chère mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le Symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Mes très chères sœurs

Messaouda , Fatima, Gouta, Khadidja, Manina, Lila, et Meriem, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

A mes très chers frères

Miloud et Lakhdar Je vous dédie ce travail pour leurs dévouements, leurs amours, leurs sacrifices et leurs encouragements jusqu'au bout, que Dieu leur accorde une longue vie.

Aux familles Gueroumi, Hamis, Hanafi, Khalifa Qui n'ont cessé de me soutenir pendant tout mon parcours. Je leur exprime toute ma gratitude pour leur soutien financier et moral, ce qui m'a permis d'être à ce niveau.

A mes chères Mahjdouba et Houaria

Aucun mot ne saurait exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance envers vous, pour votre soutien et votre patience, pour vos efforts et votre dévouement.

Enfin

A toutes les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à un moment ou à un autre et qui m'ont accompagné et soutenu.

Et

Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer.....

Aicha

Dédicace

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

*En plus particulièrement à ma très chère mère **FATMA** qui m'a toujours encouragé et m'a donné l'envie d'aller jusqu'au bout, Saches que je suis fière, chaque jour un peu plus de l'éducation que tu m'as donné*

*À la mémoire de mon très cher père **MOHAMED** symbole de douceur, de tendresse et d'amour. Votre absence a creusé un terrible fossé, et votre présence ne pourra jamais être remplacée*

À mes sœurs et mes frères sans exception

*À toute la famille **ZOUBIDA** et **HASSANI***

*À Celle qui tant donné et tant enseigné, toi qui m'a guidé dans le droit chemin, toi qui m'a appris que rien est impossible... À toi Ma chère **BOUDINE AICHA**.*

*À celle qui m'a toujours aidé et encouragé durant la période de réalisation de ce travail.. À toi Ma chère **BENCHAIIB MAHDJOUBA**.*

À toutes mes chères amies qui m'ont donné l'envie d'aller jusqu'à bout

Talbia, Hadjira, Sarah, Lila, Khadra, Nadia, Sarita

J'aimerais bien leur dire que suis très heureuse de passer tous ces années avec eux, des liens créés, de nouvelles amitiés, ainsi que, pour tous les moments passés ensemble et encore à venir.

À toute la promotion des Sciences de Procédés Biotechnologique et Agroalimentaire (2016-2017)

Enfin

à toutes les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à un moment ou à un autre et qui m'ont accompagné et soutenu.

Et

Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

Houaria

Dédicace

Grace à " Allah " ...

Je dédie ce travail à celui qui a éclairé mon chemin et sans lui je n'aurais jamais arrivé à ce que je suis aujourd'hui mon père que dieu lui accorde sa miséricorde.

A la lumière de ma vie ma mère qui m'a donné l'envie d'aller jusqu'au bout, Saches que je suis fière.

A mes chers frères : AHMED, KHALED, BEN AOUJA

A mes chères sœurs : KHADIDJA, BAKHTA, HALIMA, FATMA.

A mes neveux : Mohamed et Anes

A mes nièces : Naima, Meriem, Chaima et Amina

A tout le reste de ma famille également

A mes chères amies : Kheira, Fatima, Khadidja, Meriem, Talbia, Hadjira

A Celle qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années d'études. Merci pour ton amour et ta confiance totale... A toi très chère BOUDINE AICHA

A celle qui m'a accompagnée toute la durée de réalisation de ce travail à toi ma chère ZOUBIDA HOUARJA

En fin

je le dédie à tous ceux que je connais de loin au de près.

Et

Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

Mahdjouba

Sommaire

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

Introduction

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1.Objectifs du travail.....	3
I.2. Lieu et période du travail	3
I.3. Matériel	3
I.3.1.Matériel Biologique	3
I.3.2. Matériels de laboratoire	5
I.4.Méthodes.....	7
I.4.1. Protocole expérimental	7
I.4.2. Caractéristiques des souches pathogènes.....	8
I.4.2.1. Purification.....	8
I.4.2.2. Conservation	8
I.4.2.3. Pré-identification.....	8
I.4.2.3.1. Étude morphologiques	8
a. Aspect macroscopique.....	8
b. Aspect microscopique	8
I.4.2.3.2. Etude biochimique	9
a. Production de la catalase	9
b. Test d'oxydase.....	9
c. Galerie API 20E (Bio Mérieux	9
d. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	9

I.4.3.2.3. Etude de la cinétique	11
I.5. Caractères technologiques de deux produits probiotiques	11
I.5.1. Revivification.....	11
I.5.2. Mesure du pH et cinétique d'acidité	11
I.5.3. Mesure de la cinétique de croissance.....	14
I.6. Test d'antagonisme	14
I.6.1. Milieu solide	14
I.6.2. Milieu liquide.....	17

Chapitre II: Résultats et discussion

II.1. Caractéristiques des bactéries pathogènes	11
II.1.1. Purification	11
II.1.2. Pré-identification	11
II.1.2.1. Étude morphologique	11
II.1.2.1.1. Aspect macroscopique	11
a. Sur milieu solide.....	11
b. Sur milieu liquide.....	12
II.1.2.1.2. Aspect microscopique.....	12
II.1.2.2. Etude biochimique.....	14
a. Tests de la catalase et d'oxydase	14
b. Galerie API 20E (Bio Mérieux.....	15
c. Caractérisation de la sensibilité aux antibiotiques des trois souches pathogènes	17
II.1.2.3. Etude de la cinétique.....	19
II.2. Caractères technologiques des deux produits lactiques probiotiques.....	20
II.2.1. Revivification des ferments lactiques.....	20
II.2.2. Mesure du pH et cinétique d'acidité.....	21
II.2.3. Cinétique de croissance	22

II.3. Test d'antagonisme.....	24
II.3.1. Sur milieu solide.....	24
a. Antagonisme des deux produits lactiques probiotiques/ <i>E. cloacae</i>	24
b. Antagonisme des deux produits lactiques probiotiques / <i>P. aeruginosa</i>	24
c. Antagonisme des deux produits lactiques probiotiques / <i>B.cereus</i>	25
d. Interactions entre les bactéries pathogènes et HCl.....	26
II.3.2. Milieu liquide	26
II.4. Discussion.....	30
II.4.1. Caractéristiques des bactéries pathogènes	30
a. Purification et pré-identification.....	30
b. Caractérisation de la sensibilité aux antibiotiques	31
II.4.2. Caractères technologiques des deux produits lactiques probiotiques.....	31
II .4.3. Test d'antagonisme.....	32
Conclusion.....	45
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR : Association Française de Normalisation

AMC : Amoxicilline + acide Clavulanique

B: *Bacillus*

Bf : *Bifidobacterium*

BN: Bouillon nutritif

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

DZI : Diamètre de Zone d'Inhibition

E: *Enterobacter*

FAO : Organisation d'Alimentation et d'Agriculture

GN : Gélose nutritif

GRAS: Généralement Reconnu Comme Sûr (Generally Recognized as Safe)

McF : Mac Farland

MH : Mueller Hinton

MRS : Man, Rogosa Sharpe

OMS : Organisation Mondiale pour la Santé

P: *Pseudomonas*

S : *Streptococcus*

S : Souche

Spp: plusieurs espèces non précisées

Trs: Tours

UFC: Unités Formant Colonie

WGO : Organisation Mondial Gastrologie (World Gastrology Organisation)



LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : Produit probiotique composé de <i>Lactobacillus helveticus</i> « PUPER DIET ».....	4
Figure n° 2 : Produit probiotique composé de Six ferments lactiques « BENEFLORE ».....	4
Figure n° 3 : Schéma de protocole expérimental	7
Figure n°4 : Suspension bactérienne de <i>Bacillus cereus</i> ajustée à 0.5 Mc Farland	10
Figure n°5 : Protocole de mesure du pH et de l'acidité des deux produits lactiques probiotiques	13
Figure n°6 : Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'activité antibactérienne des deux produits lactiques probiotiques	16
Figure n°7 : Aspect macroscopique des colonies de <i>P. aeruginosa</i>	18
Figure n°8 : Aspect macroscopique des colonies de <i>B. cereus</i>	18
Figure n°9 : Aspect macroscopique des colonies d' <i>E. cloacae</i>	18
Figure n°10 : Aspect des trois cultures pathogènes pures sur milieu liquide	19
Figure n°11 : Observation microscopique de <i>P. aeruginosa</i> (G x400).....	20
Figure n°12 : Observation microscopique d' <i>E. cloacae</i> (Gx400).....	20
Figure n°13 : Observation microscopique de <i>B. cereus</i> (G x400)	21
Figure n°14 : Résultat de test de la catalase	22
Figure n°15 : Résultats de la Galerie API20 E des trois souches pathogènes.....	22
Figure n°16 : Résultat d'antibiogramme de <i>B. cereus</i>	25
Figure n°17 : Résultat d'antibiogramme de <i>P. aeruginosa</i>	25
Figure n°18 : Résultat d'antibiogramme d' <i>E. cloacae</i>	25
Figure n°19 : Cinétique de croissance de <i>B. cereus</i> dans le BN incubé à 37°C.....	26
Figure n°21 : Cinétique de croissance de <i>P. aeruginosa</i> dans le BN incubé à 37°C.....	27

Figure n°23: Aspect macroscopique des colonies de six ferments	28
Figure n°22: Aspect macroscopique des colonies de <i>L. helveticus</i>	28
Figure n°24 : pH et acidité de <i>L. helveticus</i> cultivé dans le lait écrémé à 30°C à l’obscurité.....	28
Figure n°25: pH et acidité de mélange de six ferments lactiques cultivés dans le lait écrémé à 30°C à l’obscurité.....	29
Figure n°26 : Cinétique de croissance de <i>L. helveticus</i> au cours de la fermentation	30
en bouillon MRS incubé à 37°C.....	30
Figure n°27 : Cinétique de croissance de mélange de six ferments au cours de la fermentation en bouillon MRS incubé à 37°C.....	30
Figure n°28 : Résultats des interactions entre les deux produits lactiques et <i>E. cloacae</i>	31
Figure n°29 : Résultats des interactions entre les deux produits lactiques et <i>P. aeruginos</i>	32
Figure n°30: Résultats des interactions entre les deux produits lactiques et <i>B. cereus</i>	32
Figure n°31 : Résultats des interactions entre les bactéries pathogènes et HCl.....	33
Figure n°32: Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes en présence de surnageant non neutralisé de mélange de six ferments lactiques dans le milieu liquide.....	34
Figure n°33: Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes en présence de surnageant neutralisé de mélange de six ferments lactiques dans le milieu liquide.....	34
Figure n°34 : Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes en présence de surnageant non neutralisé de <i>L. helveticus</i> dans le milieu liquide.....	35
Figure n°35: Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes en présence de surnageant neutralisé de <i>L. helveticus</i> dans le milieu liquide.....	35
Figure n°36 : Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes en présence de HCl.....	36
dans le milieu liquide	36

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°1: Principaux matériels	5
Tableau n°2 : Résultats de l'examen microscopique des souches pathogènes	19
Tableau n°3: Résultats des tests de la catalase et d'oxydase des souches pathogènes	21
Tableau n°4: Identification des bactéries pathogènes par les galeries API20E	23
Tableau n°5 : DZI des trois souches pathogènes	24

Liste des Annexes

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

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

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

Annexe IV : Standardisation 0.5 Mac Farland

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



Introduction

La définition du terme probiotique a évolué dans le temps en fonction de la réflexion des chercheurs, des connaissances scientifiques et des avancées technologiques. Les probiotiques sont donc définis comme « des organismes vivants qui, ingérés en quantité suffisante, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (FAO/OMS, 2001).

Les probiotiques sont des microorganismes qui peuvent être intégrés dans différents types de produits, y compris les aliments, les médicaments et les suppléments alimentaires. Les espèces de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les plus communément utilisées comme probiotiques, mais la levure *Saccharomyces cerevisiae* et quelques espèces de *E. coli* et de *Bacillus* sont également utilisées comme probiotiques (WGO, 2011).

Les effets bénéfiques de ces souches probiotiques sur la santé du consommateur, notamment l'amélioration de la digestion du lactose, l'équilibration de la microflore intestinale, la prévention ou le raccourcissement de la durée de la diarrhée (notamment les diarrhées provoquées par le rotavirus et par *Clostridium difficile*), la diminution du risque d'allergie alimentaire, la stimulation et la modulation du système immunitaire, l'amélioration de la maladie inflammatoire intestinale et la prévention du cancer n'ont toutefois été démontrées que pour un nombre limité de souches. Ces effets sur la santé peuvent s'expliquer par des mécanismes tels que certaines activités microbiennes spécifiques (production de certaines enzymes ou facteurs de croissance), des interactions microbiennes (production de peroxyde d'hydrogène, acides organiques et peptides antibactériens), des interactions avec l'épithélium intestinal (concurrence pour les récepteurs situés sur l'épithélium intestinal) et des interactions avec le système immunitaire (Vuyst et al., 1994).

Les bactéries lactiques comptent parmi les principaux probiotiques. Leur nom générique vient du fait qu'elles produisent de l'acide lactique. Elles sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales, font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (Klaenhammer et al., 2005).

Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (Klaenhammer et al., 2005). Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*,

Enterococcus, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (**Abee, 1995 ; Hugenholtz et al., 1999**).

Les bactéries lactiques ont été traditionnellement utilisées dans la conservation de nombreux aliments sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité. Ces bactéries jouent un rôle important dans la fabrication des fromages et des produits fermentés. Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques (**Labioui et al., 2005**).

En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines. Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens inhibant la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes (**Rodgers, 2001 ; 2003**).

Une bactérie est considérée probiotique si elle exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte qui la consomme (**Salminen et al., 1998**). Plusieurs genres et espèces bactériennes sont considérés comme probiotiques, mais les bactéries lactiques comme les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium* représentent les groupes bactériens les plus associés au terme probiotique (**Fooks et Gibson, 2002**). Ces bactéries ont démontré leur activité contre de nombreux pathogènes alimentaires (ex : *E. coli*) *in vitro* et *in vivo* à l'aide de modèles animaux (**Servin et Coconnier, 2003**).

Dans ce contexte ce travail consiste à rechercher l'activité antagoniste de la souche *Lactobacillus helveticus* et un composé de six bactéries lactiques (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium spp* et *Streptococcus thermophilus*) vis à vis des bactéries pathogènes (*Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus*).

À travers cette étude nous contribuons à :

- ✚ Tester le pouvoir antibactérien dans le but de sélectionner un ou deux produits lactiques probiotiques possédant un pouvoir inhibiteur contre les germes pathogènes.
- ✚ Recherche des agents antibactériens.

Chapitre I

Matériel et méthodes



I.1.Objectifs du travail

Les objectifs de cette étude s'articulent autour des points suivants :

- Tester le pouvoir antimicrobien dans le but de sélectionner un ou les deux produits probiotiques commercialisés possédant un pouvoir inhibiteur contre les souches pathogènes.
- Recherche d'agents antibactériens (acide lactique et bactériocine like).

I.2. Lieu et période du travail

Notre étude a été réalisée au niveau des laboratoires de microbiologie, de technologie alimentaire et de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université Ibn Khaldoun -Tiaret) pendant une période qui s'étale de 6 Mars jusqu'au 31 Mai 2017.

I.3. Matériel

I.3.1.MatérielBiologique

Deux produits probiotiques lyophilisés commercialisés en France ont été analysés pour la recherche de leur effet probiotique qui sont:

- ✚ **SUPER DIET** : contenant de *Lactobacillus helveticus* modifié génétiquement. Sous forme microencapsulé et 5g de fibre (**Fig.1**)
- ✚ **BENEFLORE** : composé de six bactéries lactiques qui sont : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* , *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium* spp et *Streptococcus thermophilus*. Il contient un pourcentage de 12% de souches lactiques et des fibres bifidogènes (**Fig.2**).

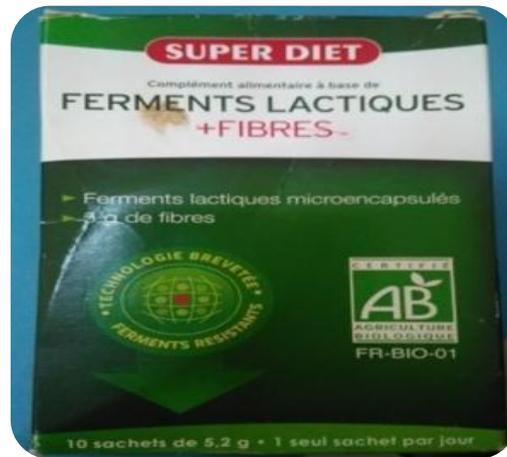


Figure n°1 :Produit probiotique composé de *Lactobacillus helveticus* « PUPER DIET »



Figure n°2:Produit probiotique composé de Six ferments lactiques « BENEFLORÉ »

✚ Trois bactéries pathogènes *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae*, elles ont été isolées et identifiées à partir des urines au Laboratoire d'analyses médicales de Maâchi à Tiaret ; et *Bacillus cereus* provenant du laboratoire de notre faculté.

I.3.2. Matériels de laboratoire

Le tableau 1 représente les principaux matériels utilisés pour réaliser cette étude.

Tableau n°1: Principaux matériels

Type	Matériel	
Milieux de culture	<ul style="list-style-type: none"> • Gélose Cétrimide (Brown and Oxbury, 1965) • Gélose Hektoen (Joffin et Leyral, 2006) • Gélose Mueller Hinton (Muller et Hinton, 1941) • Gélose et bouillon Nutritif (Singleton, 1999) • Gélose et bouillon MRS (Man, Rogosa et Sharpe, 1960) • Gélose et bouillon M17 (Trezaghi et Sandine, 1975) • Lait écrémé commercialisé « Candia » 	<p style="text-align: center;">Composition</p> <p style="text-align: center;">Voir annexe I</p>
Appareillages	<ul style="list-style-type: none"> • Agitateur (Stuart SB162) • Centrifugeuse (Sigma 203) • Microscope optique • Spectrophotomètre : Pharmacia Biotech type : Novaspec II • Réfrigérateur Condor • Congélateur : Maxtor • Autoclave : Wolf • Etuve : Memmert • pH mètre : Hanna instruments type : EC214 • Balance : Sartorius type BL 1500 • Vortex électrique : techno kartell type : TK3S 	

Verreries	<ul style="list-style-type: none"> • Tubes à essai • Boîtes de Pétri • Pipettes pasteur • Béchers • Lames • Dessiccateur
Produits chimiques et réactifs	<ul style="list-style-type: none"> • Eau distillée • Eau oxygénée • Eau physiologique à 0,9 % • Solution de soude NaOH 0,1N • Ethanol 95% • Solution méthanolique de phénophtaléine à 1 % • HCl 1N • Lugol • Violet de gentiane • Fuschine • Glycérol 99%
Autres	<ul style="list-style-type: none"> • Anse de platine • Disques d'antibiotiques • Galeries API 20E • Huile de paraffine • Huile d'immersion • Papier aluminium • Papier joseph • Pince métallique • Pince à bois • Burette de Mohr à robinet • Bec bunsen • Barreau magnétique

I.4.Méthodes

I.4.1. Protocole expérimental

Les principales étapes d'analyse effectuées dans notre étude expérimentale sont résumées dans la figure 3.

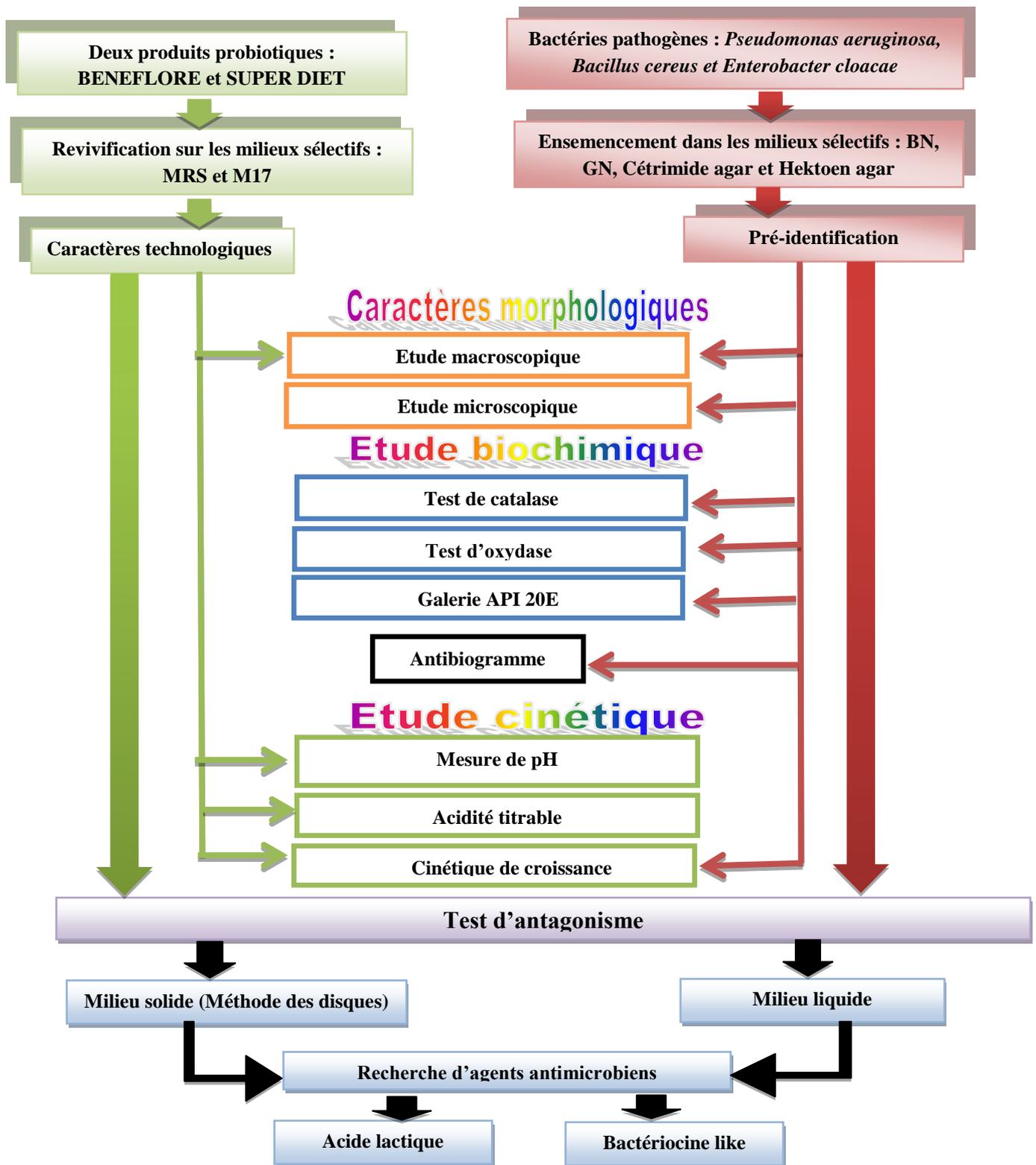


Figure n°3 : Schéma de protocole expérimental

I.4.2. Caractéristiques des souches pathogènes

I.4.2.1. Purification

La purification des souches pathogènes est réalisée par repiquage successif alternant sur milieux sélectifs (par la méthode des stries), et incubation à 37°C pendant 24h. La pureté des souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur (couleur, taille et forme) (Guiraud, 1998).

I.4.2.2. Conservation

La conservation des souches pures a été faite dans une solution contenant un volume égal de glycérol 99% puis gardées dans un congélateur domestique (Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Leclerc et al., 1977).

I.4.2.3. Pré-identification

L'identification est établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : catalase et oxydase.

I.4.2.3.1. Étude morphologiques

a. Aspect macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des souches sur milieu solide et liquide ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies sur milieu solide et le trouble dans le milieu liquide (Badis et al, 2004). Chaque souche pure est repiquée etensemencée sur GN en boîte de façon à obtenir des colonies isolées. Une incubation à 37°C durant 24h est entreprise pour tous les germes, les caractéristiques des colonies comme la taille, la forme, le chromogénèse, et le relief seront analysés (Leclerc et al., 1994 ; Larpent, et Larpent-Gourgaud, 1990).

b. Aspect microscopique

L'étude microscopique par l'intermédiaire de la coloration de Gram, nous a permis d'examiner la forme, le mode d'association et le Gram de ces bactéries. La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par Joffin et Leyral (2006). (Annexe II). Cette coloration permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement.

I.4.2.3.2. Etude biochimique

a. Production de la catalase

Cette activité a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par **Joffin et Leyral (2006)**. Ce test consiste à ajouter quelques gouttes d'eau oxygénée sur les colonies bactériennes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester. La catalase permet la décomposition de l'eau oxygénée selon la réaction :



b. Test d'oxydase

L'activité oxydase a été déterminée selon le protocole décrit par **Joffin et Leyral (2006)**. Une colonie pure prise du milieu gélosé est mise sur disque imbibé de réactif oxydase. Le développement d'une couleur violette signifie que le test est positif ce qui indique que la souche possède l'enzyme oxydase. Ce test a pour but de voir si la bactérie possède un cytochrome sur lequel elle fixe l'oxygène.

c. Galerie API 20E (Bio Mérieux)

La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne (prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé, et homogénéiser dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique). Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture. L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (**Delarras, 2007**) (**Annexe III**).

NB : on a utilisé la galerie API 20E juste pour compléter et confirmer les tests de la galerie classique sachant que cette dernière est destinée à l'identification des entérobactéries.

d. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ou antibiogramme selon la technique d'écouvillonnage de **Kirby Bauer** du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (**Soussy et al., 2002**). Le milieu utilisé a été la gélose Mueller Hinton (MH) et l'inoculum

a été préparé selon les recommandations du CA-SFM. C'est un milieu utilisé pour tester la sensibilité des bactéries aux antibiotiques (**Denis et al., 2007**).

Les boîtes de Pétri sontensemencées par une suspension bactérienne contenant 10^4 UFC/ml, ajustée à 0.5 de Mc Farland, (**Fig.4**) sur lesquelles sont disposés les disques d'antibiotiques (6mm de diamètre). L'incubation s'effectue à 37°C pendant 24 h en micro aérobiose .La lecture des résultats s'effectue par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition apparue. (**Lamouliatte et al., 1992 ; Mégraud, 1994**).

Les disques Bio Mériex d'antibiotiques testés sont les suivants :

- Ampicilline (AM): 10 μg
- Oxacilline (OX) : 5 μg
- Gentamicine (GN) :10 UI
- Polymixine (PB) :10 UI
- Ciprofloxacine (CIP) :30 μg
- Lincomycine (L) : 15 μg
- Rifampicine (RA) : 30 μg
- Ddoxycycline (DO) : 30 μg
- (AMC)Amoxycilline 20 μg (AM) + 10 μg acideClavulanique (C)
- Erythromycine (E) : 15 μg
- Cephalexine (CL) : 30 μg

La lecture des diamètres des zones d'inhibition, après 24h d'incubation, a permis l'interprétation en catégorie **S** (sensible), **I** (intermédiaire), **R** (résistant) selon les recommandations du CA-SFM2002. La catégorie **I** a été incluse dans celle **R**.



Figure 4 n° : Suspension bactérienne de *Bacillus cereus* ajustée à 0.5Mc Farland

I.4.3.2.3. Etude de la cinétique

Cette étude consiste à mesurer la cinétique de croissance de trois souches pathogènes. Des cultures jeunes de 18h ont étéensemencées dans le bouillon nutritif afin de préparer des suspensions équivalent au standard 0.5 McF, puis les souches sont incubées à 37°C. Des prélèvements stériles sont effectués périodiquement après différents temps (2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 26h et 28h) afin d'évaluer la croissance (DO) à 600 nm.

I.5. Caractères technologiques de deux produits probiotiques

I.5.1. Revivification

Les deux produits lactiques probiotiques lyophilisés commercialisés sont été mis en culture sur le milieu MRS solide et liquide (**Man et al., 1960**) et le milieu M17 (**Terzagli et sandine, 1975**). Les cultures sont incubées de 24 à 72 heures à 37°C dans des boîtes de Pétri et dans des tubes à essai à l'obscurité.

I.5.2. Mesure du pH et cinétique d'acidité

L'un des caractères technologiques essentiels des bactéries lactiques est leur aptitude à l'acidification du lait qui dépend de l'aptitude à la fermentation du lactose et de la résistance à l'acide développé dans le lait écrémé stérile. La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité totale par la soude (**Guiraud, 1998**).

Le pH est déterminé à l'aide d'un pH-mètre étalonné. La valeur initiale et la valeur finale sont lues directement sur l'écran de l'appareil (**AFNOR, 1986**).

L'acide lactique produit par les ferments lactiques est mesuré à l'aide d'un pH mètre puis titré par le **NaOH** 1/9 N en présence d'un indicateur de pH (phénolphtaléine 1%) (**Accolas et al., 1977**). Cette acidité est exprimée en degré Dornic (°D). Un °D correspond à l'acidité apporté par 0,1g d'acide lactique dans un litre de lait. Chaque ferment estensemencé dans un tube à 10 ml de lait écrémé stérile puis incubé à 30°C pendant 24h. Dès que le lait coagule, on mesure le pH. Dans flacon contenant 100ml de lait écrémé stérile, on transfère 3ml de lait coagulé de chaque tube sélectionnés puis on homogénéise.

Le flacon est réparti dans des tubes stériles à raison de 10ml de lait par tube puis qui sont incubés à 30°. La quantité d'acide lactique est calculée après différents temps (2h, 4h, 6h, 8h et 24h) (**Fig.5**) (**Chamba et Prost, 2010**).

L'acidité est déterminée par la formule :

$$\text{Acidité (°D)} = V_{\text{NaOH}} \times 10.$$

V_{NaOH} : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.

$10D^\circ$ \longrightarrow **1g/l d'acide lactique (Lucas et Reyrolle, 1989).**

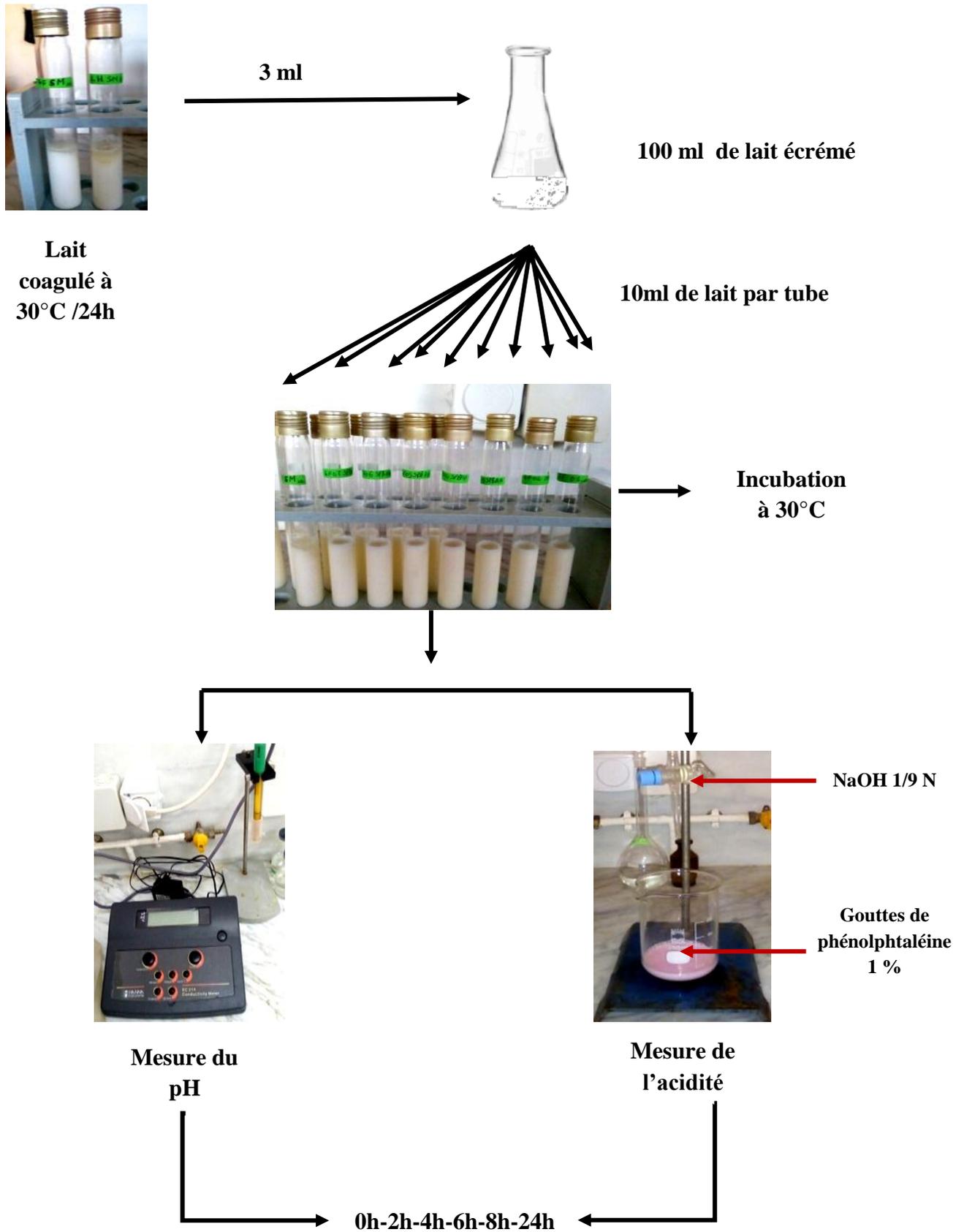


Figure n°5 : Protocole de mesure du pH et de l'acidité des deux produits lactiques probiotiques

I.5.3. Mesure de la cinétique de croissance

L'étude de l'évolution de la croissance des deux ferments lactiques est effectuée dans le milieu MRS à pH 6.8 incubation à 37 °C en anaérobiose (**Allouche et al., 2010**).

La croissance bactérienne est suivie par la mesure de la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (**Gun.Loux-Benatie et al., 1993**).

Pour réaliser cette mesure, les deux produits lactiques probiotiques ont étéensemencés dans le milieu MRS liquide afin de préparer des suspensions équivalent au standard 0.5 McF, puis toutes les souches sont incubées à 37°C. Des prélèvements stériles sont effectués périodiquement chaque 2h après différents temps (2h, 4h, 6h ,8h, 24h et 26h) afin d'évaluer la croissance (DO) à 600 nm.

I.6. Test d'antagonisme

I.6.1. Milieu solide

Pour réaliser le test d'antagonisme, il faut avoir des pré-cultures des souches lactiques et pré-cultures des souches indicatrices (pathogènes). Nous avonsensemencé chacune des deux ferments lactiques dans des tubes à essai contenant 5 ml du bouillon approprié (bouillon MRS). Les tubes sont incubés à 37°C pendant 18 h en anaérobiose. Alors que les souches indicatrice sont étéensemencées dans des boites de Pétri écoulées par le milieu sélectif puis incubées à 37°C pendant 18 h (**Tabak et Bensoltane, 2012**).

Un volume 20 ml du milieu Mueller-Hinton agar est coulé dans des boites de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les boites sontensemencées en surface par la suspension des souches pathogènes, puis les disques wattman de diamètre 6mm sont remplis par 6 à 8µl de surnageant, obtenu après centrifugation à 4 000 tours / min pendant 15 min d'une culture de la souche lactique appropriée (*L. helveticus* et le mélange de six ferments dans le bouillon MRS) (**Labioui et al., 2005**) et d'autres sont remplis d'HCl et comme témoin par l'eau distillée.

Les disques sont ensuite déposés sur le milieu de culture, la diffusion des agents antibactériens dans le milieu gélosé est améliorée par une incubation des boites à 37°C pendant 24 h. L'activité antibactérienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques (**Fig.6**) (**Achemchem et Abrini, 2005**).

Les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des disques seront mesurés, le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 2mm. La mesure de diamètre d'inhibition DZI est effectuée selon la formule suivante :

$$\text{DZI (mm)} = \text{diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm)} - \text{diamètre des disques (6 mm)}$$

✚ Identification des substances responsables de l'activité antibactérienne

Les bactéries lactiques sont connues par leur capacité à produire deux catégories de substances antibactériennes (l'acide lactique et les bactériocines). Afin d'étudier l'effet de chaque substance sur les espèces pathogènes, une méthode basée sur l'élimination d'un constituant au profit de l'autre est adaptée. Dans notre étude on a éliminé l'effet de l'acide lactique qui s'effectue comme suit :

✚ Elimination de l'effet de l'acide lactique

Cette centrifugation à 4 000 tours / min pendant 15 min d'une culture de la souche lactique appropriée (*L. helveticus* et le mélange de six ferments dans le bouillon MRS) est suivie par un ajustement du pH à 6.8 par la soude (NaOH) 0.1N afin d'éliminer l'effet de l'acide lactique (**Fig.6**) (Metlef et Dilmi-Bouras, 2009).

L'effet inhibiteur probable des bactériocines sur les espèces pathogènes est testé par la méthode des disques indiquée préalablement.

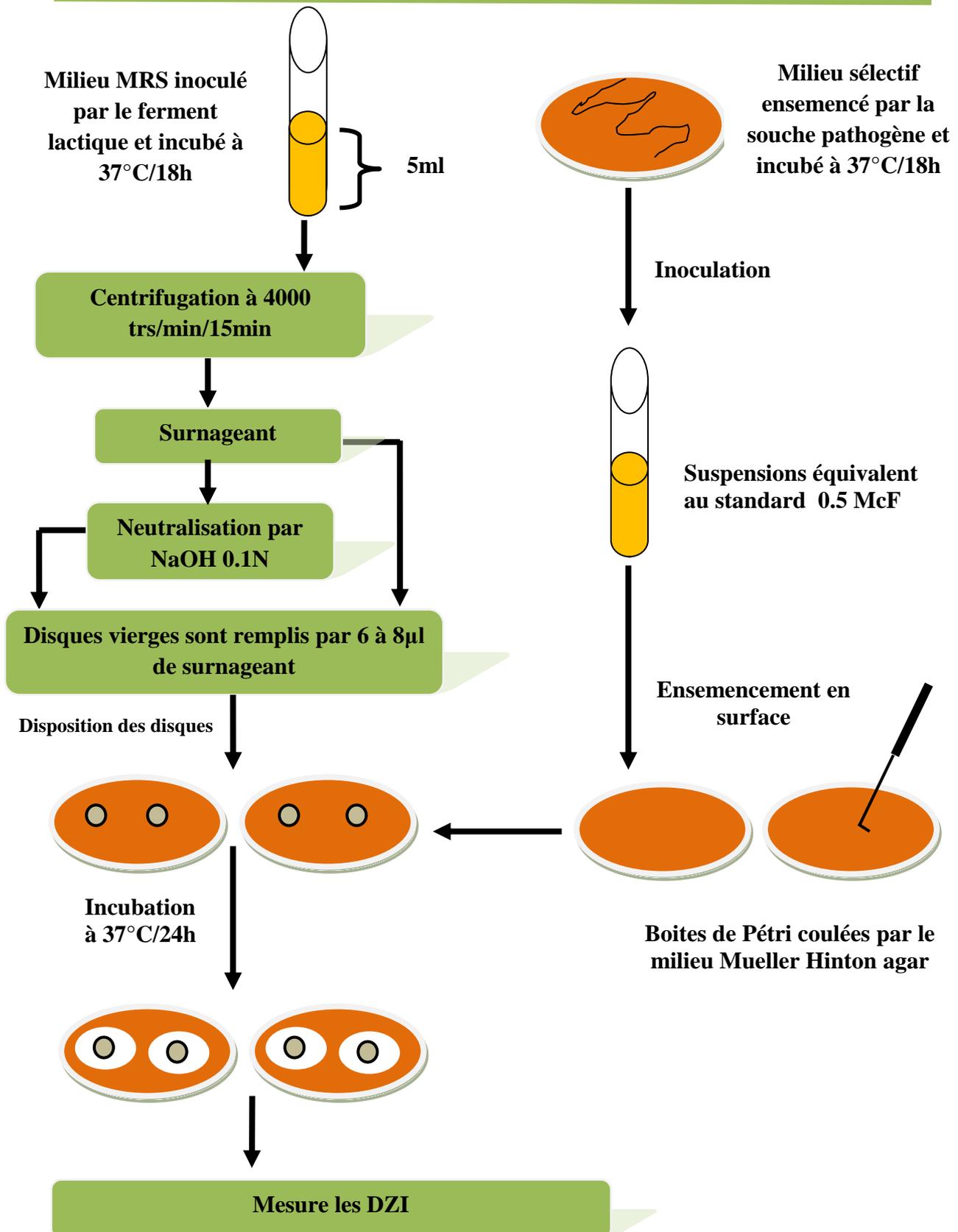


Figure n° 6 : Schéma illustrant les différentes étapes de l'étude de l'activité Antibactérienne des deux produits lactiques probiotiques

I.6.2. Milieu liquide

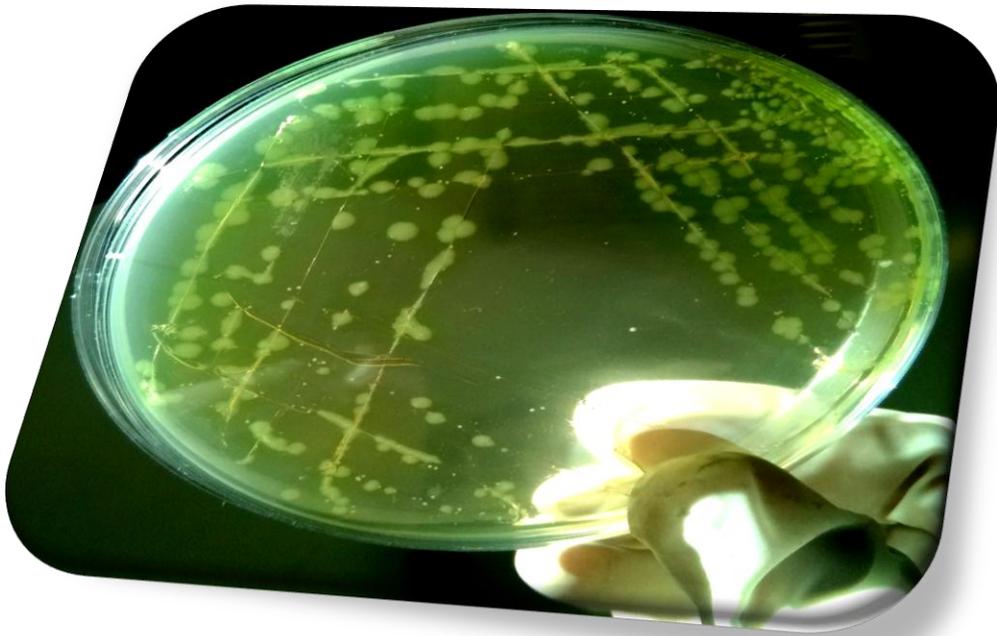
Les bactéries lactiques peuvent produire des substances inhibitrices. Pour s'assurer de la présence de ces dernières, nous avons pris une culture jeune, de deux produits lactiques probiotiques qui ont été cultivés dans 5 ml de bouillon MRS et incubés à 37°C pendant 18 h. Après l'incubation, les tubes ont été centrifugés à 4 000 trs / min pendant 15 min afin de récupérer le surnageant. Pour éliminer l'effet des acides organiques notamment des acides lactique et acétique, le surnageant a été neutralisé (pH = 6.5) 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 dépourvue de catalase (**Labioui et al., 2005**).

Des tubes de pré-culture des souches pathogènes sontensemencées dans le bouillon nutritif et incubées à 37°C pendant 18h qui ont été préparées avant (à raison de 6 tubes pour chaque bactérie pathogène). La mesure de la croissance bactérienne des souches pathogènes est réalisée par la mesure de la densité optique toutes les 2h.

Après la 6^{ème} h, 1ml du surnageant neutralisée et ajouté dans les tubes, et 1ml du surnageant non neutralisé est ajouté dans autres tubes et enfin 1ml du HCl est ajouté dans les tubes restés puis on détermine la mesure de la DO jusqu'à 12 h. Ainsi, la courbe $DO = f(t)$ peut être tracée (**Tabak et Bensoltane, 2012**).

Chapitre II

Résultats et discussion



II.1. Caractéristiques des bactéries pathogènes

II.1.1. Purification

La purification des souches pathogènes effectuée par plusieurs repiquages successifs sur leurs milieux sélectifs donnés des colonies d'aspect (couleur, taille et forme) typique et homogène.

II.1.2. Pré-identification

II.1.2.1. Étude morphologique

II.1.2.1. 1. Aspect macroscopique

a. Sur milieu solide

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 *P. aeruginosa* sont apparues sur la gélose Cétrimide de grande taille, de forme circulaire irrégulière, de centre bombé avec une couleur verte-jaune (**Fig.7**).
- Les colonies de *B. cereus* sont de très grandes tailles, larges et plates, de forme circulaire irrégulière, avec une couleur crème (**Fig.8**).
- Les colonies d'*E. cloacae* sont apparues brillantes de taille moyenne, de forme circulaire régulière bombée, avec une couleur jaune saumon opaque (**Fig.9**).

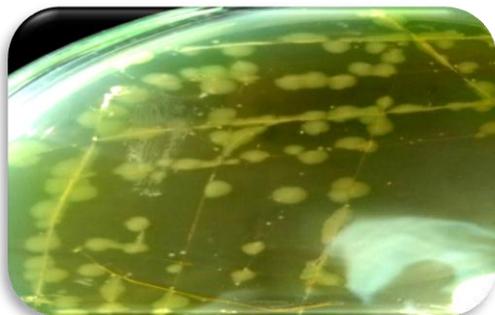


Figure n°7: Aspect macroscopique des colonies de *P. aeruginosa*



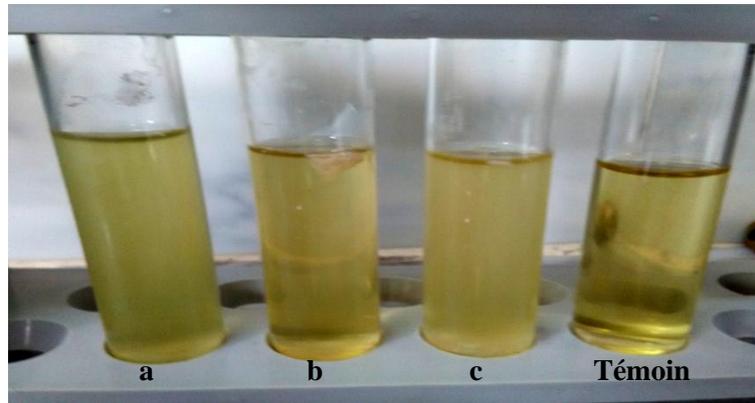
Figure n° 8: Aspect macroscopique des colonies de *B. cereus*



Figure n°9: Aspect macroscopique des colonies d'*E. cloacae*

b. Sur milieu liquide

La croissance des bactéries pathogènes apparaît sous forme de trouble homogène fumeux dans le milieu liquide (**Fig.10**).



a. *P. aeruginosa*

b. *E. cloacae*

c. *B. cereus*

Figure n°10: Aspect des trois cultures pathogènes pures sur milieu liquide

II.1.2.1.2. Aspect microscopique

L'étude microscopique est basée sur la coloration de Gram, les résultats de l'examen microscopique de trois souches pathogènes étudié sont illustrés dans le **tableau 2**

Tableau n°2 : Résultats de l'examen microscopique des souches pathogènes

Souches	Coloration de Gram	Aspect	
		Forme	Regroupement
<i>P. aeruginosa</i>	-	Petit bacille (Fig.11)	En paire ou en courtes chaînettes
<i>E. cloacae</i>	-	Bacille (Fig.12)	En amas
<i>B. Cereus</i>	+	Grand bacille (Fig.13)	En Chainette

- : Négatif

+ : Positif

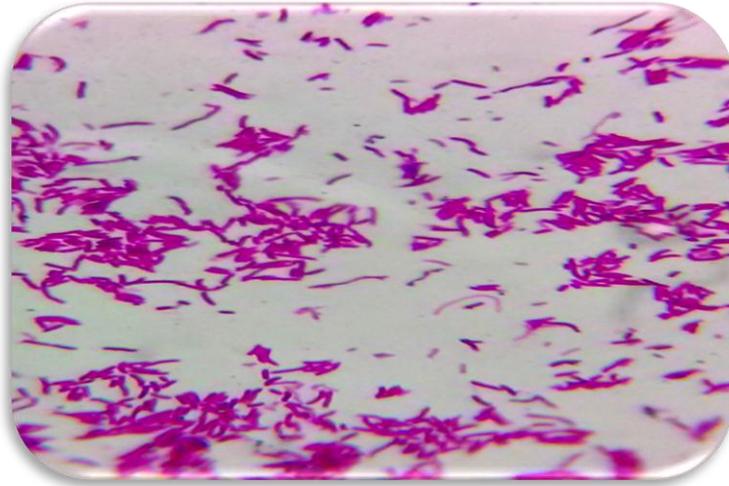
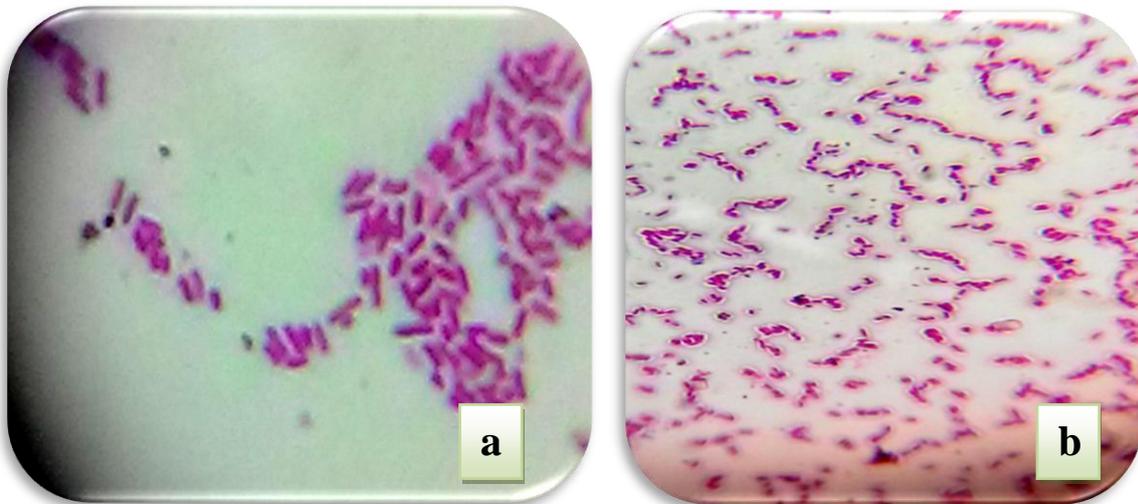


Figure n°11: Observation microscopique de *P. aeruginosa*
(G x400)



a. sans capsule

b. avec capsule

Figure n°12: Observation microscopique d'*E. cloacae* (Gx400)

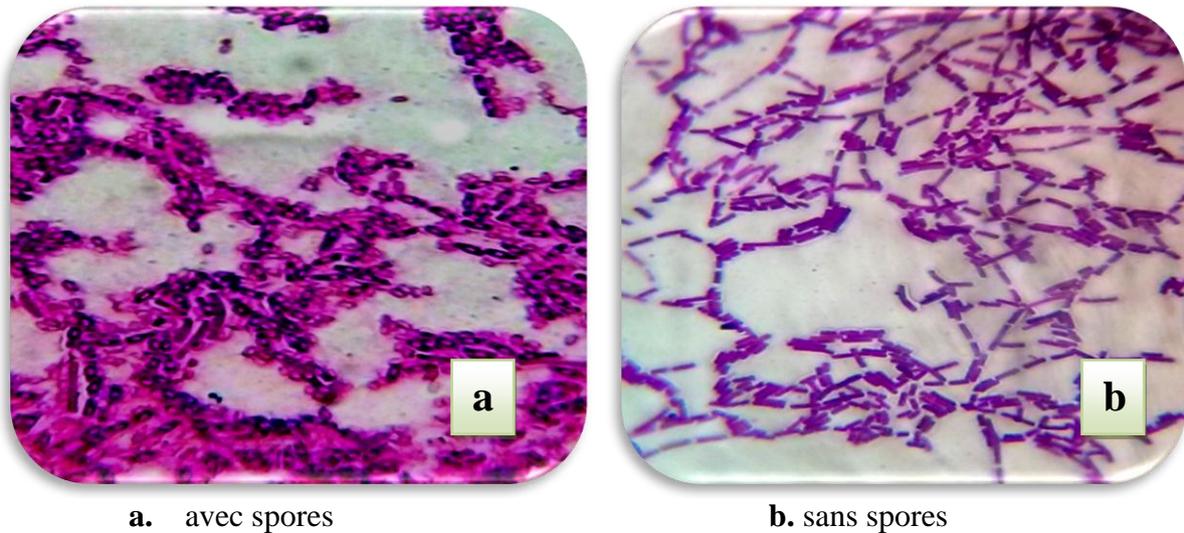


Figure n°13 : Observation microscopique de *B. cereus* (G x400)

II.1.2.2. Etude biochimique

a. Tests de la catalase et d'oxydase

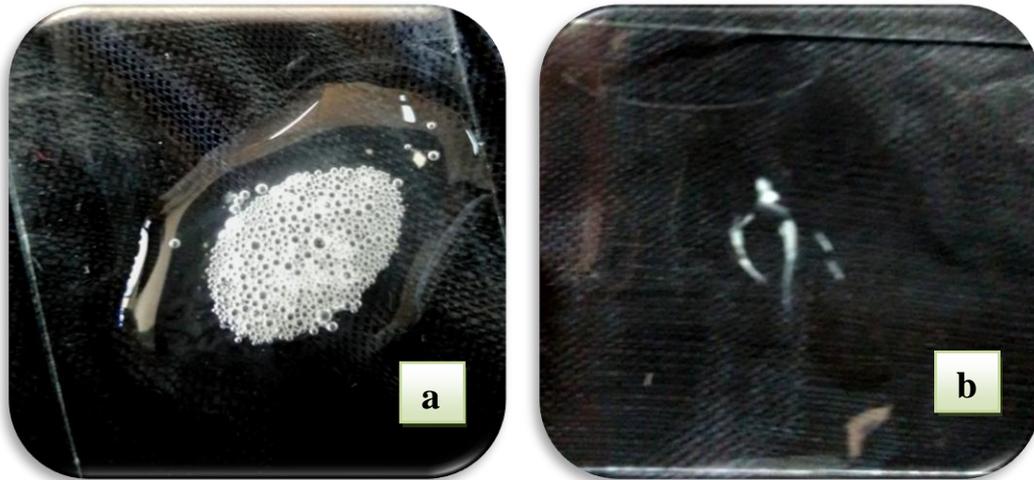
Les résultats des tests de la catalase (**Fig.14**) et d'oxydase sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau n°3: Résultats des tests de la catalase et d'oxydase des souches pathogènes

Souches	Catalase	Oxydase
<i>P. aeruginosa</i>	+	+
<i>B. Cereus</i>	+	-
<i>E. Cloacae</i>	+	-

+ : Positif

- : Négatif



a. Test positif

b. Test négatif

Figure n°14: Résultat de test de la catalase

b. Galerie API 20E (Bio Mérieux)

Après inoculation des galeries par les suspensions bactériennes et après incubation durant 24 h à 37°C (Fig.15), la lecture des réactions produites a été réalisée à l'aide du tableau de lecture. L'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique.

La compilation des résultats de l'utilisation des substrats par la bactérie à identifier permet de déterminer un code de 7 chiffres (à l'exception de *B. cereus*)

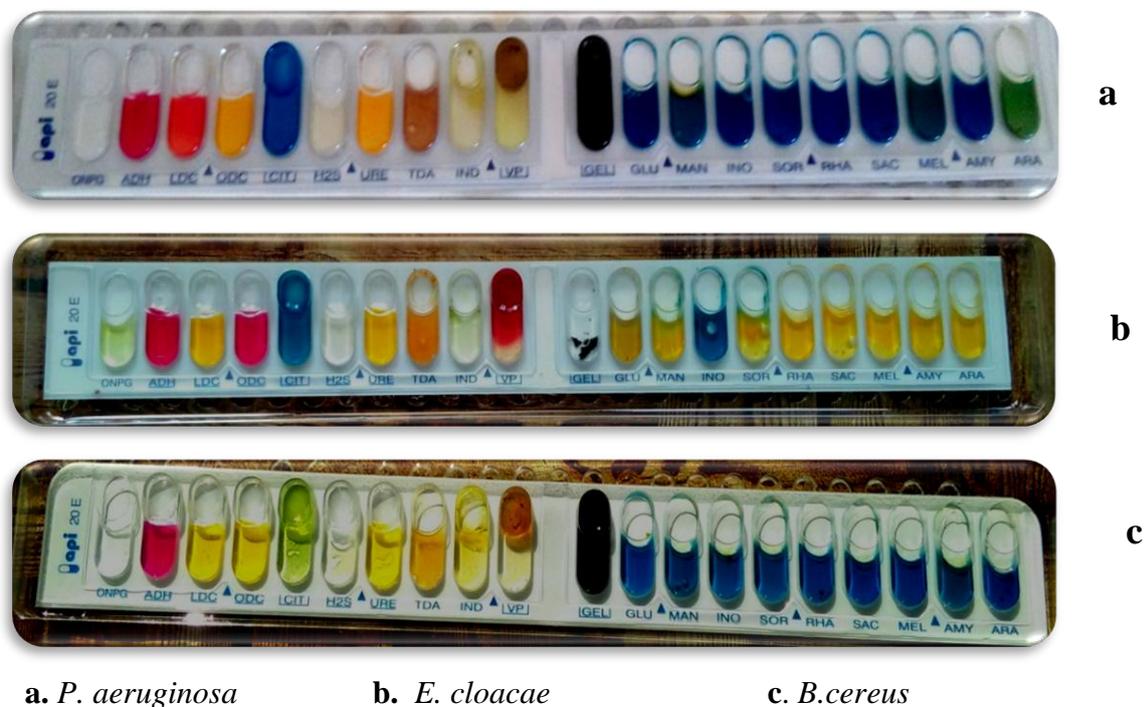
a. *P. aeruginosa*b. *E. cloacae*c. *B. cereus*

Figure n° 15: Résultats de la Galerie API20 E des trois souches pathogènes

Le tableau 4 représente les différents résultats de la galerie API 20E des trois souches pathogènes.

Tableau n°4: Identification des bactéries pathogènes par les galeries API20E

N°	Test	Substrat	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>B. cereus</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 ₂ 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	-	+	-

+ : Test positif

- : Test négatif

D'après les résultats présentés dans le tableau 4 et d'après l'utilisation des tests d'identification morphologique et le logiciel API Web 20E, nos souches bactériennes isolées peuvent être apparentées probablement aux genres et espèces suivants:

- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Enterobacter cloacae*.
- *Bacillus cereus*.

c. Caractérisation de la sensibilité aux antibiotiques des trois souches pathogènes

Les trois souches de bactéries pathogènes ont été testées en présence de onze antibiotiques selon le test d'antibiogramme sur le milieu Mueller Hinton. Le tableau 5 résume les résultats de ce test.

Tableau n°5: DZI des trois souches pathogènes

Antibiotiques	DZI en mm		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. cloacae</i>
Oxacilline (OX)	00	00	00
Gentamicine (GM)	14	19	09
Ampicilline (AM)	00	00	00
Polymixine (PB)	04	05	03
Ciprofloxacine (CIP)	20	23	16
Lincomycine (L)	00	24	00
Rifampicine (RA)	06	13	03
Doxycycline (DO)	00	11	07
Erythromycine (E)	13	23	00
Cephalexine (CL)	00	14	00
AMC	00	00	00

Le tableau 5 montre les résultats d'antibiogramme des souches pathogènes exprimés en DZI. Toutes les bactéries sont sensibles aux deux antibiotiques : Ciprofloxacine et Gentamicine et sont résistantes aux antibiotiques suivants : AMC, Ampicilline et Oxacilline. La bactérie *B. cereus*, est sensible aux antibiotiques suivants : Lincomycine, Rifampicine, Doxycycline, Erythromycine et Cephalexine mais résiste aux Oxacilline, Ampicilline, Polymixine et AMC (Fig.16).

Pour *P. aeruginosa* est aussi sensible au Erythromycine (Fig.17), mais *E. cloacae* est sensible au Doxycycline (Fig.18) et ces deux souches sont résistantes aux autres antibiotiques testés.

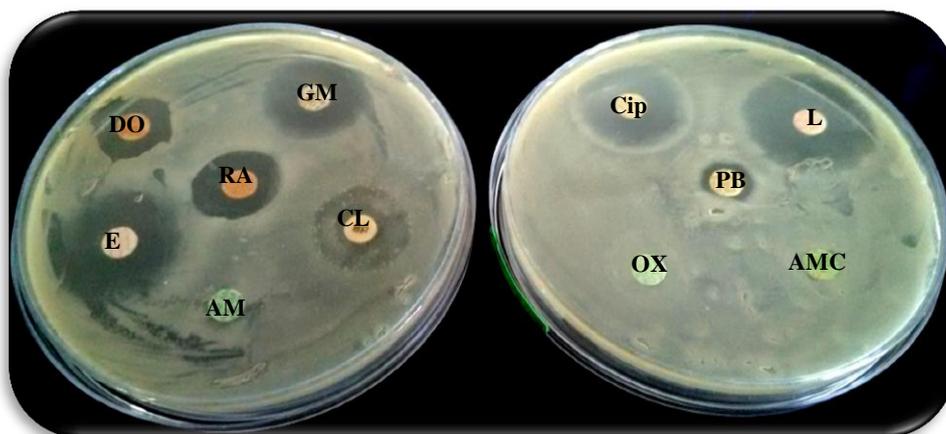


Figure n°16: Résultat d'antibiogramme de *B. cereus*

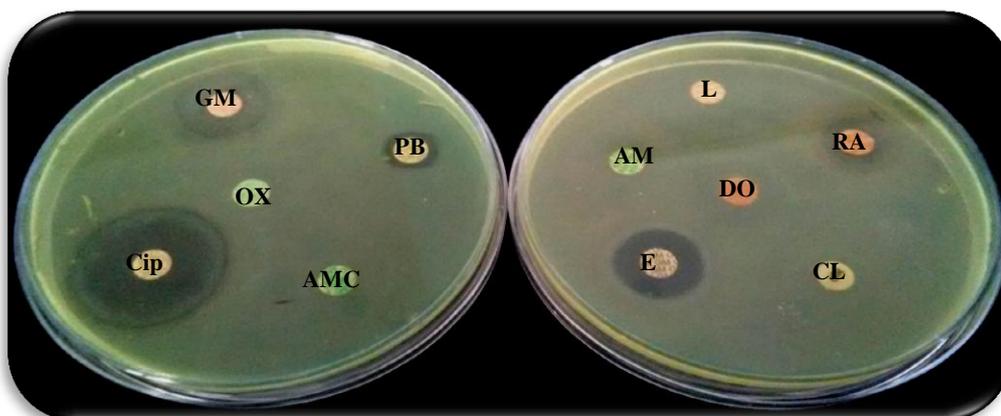


Figure n°17: Résultat d'antibiogramme de *P. aeruginosa*

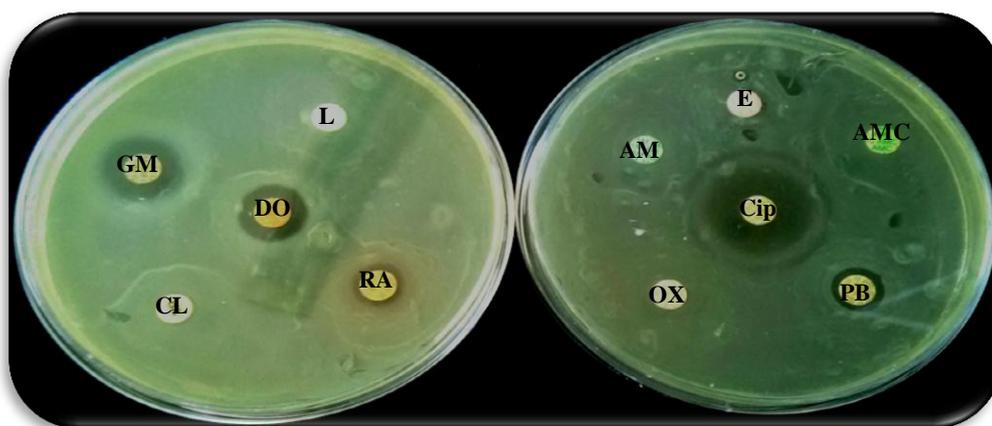


Figure n°18 : Résultat d'antibiogramme d'*E. cloacae*

II.1.2.3. Etude de la cinétique

A partir de l'analyse de la cinétique de croissance, il est intéressant de relever que les souches pathogènes : *B. cereus* et *E. cloacae* présentent le même profil cinétique au début de la phase exponentielle, la cinétique de croissance est représentée respectivement dans les figures (19 et 20) et avec des DO variables selon l'espèce. Il a été remarqué que pour ces deux bactéries pathogènes après 4h d'incubation la croissance est très rapide de 6h à 8h, les valeurs du taux de croissance diminuent à partir de 8 h. Sauf *P. aeruginosa*, sa croissance est très rapide de 4h à 24h (Fig.21).

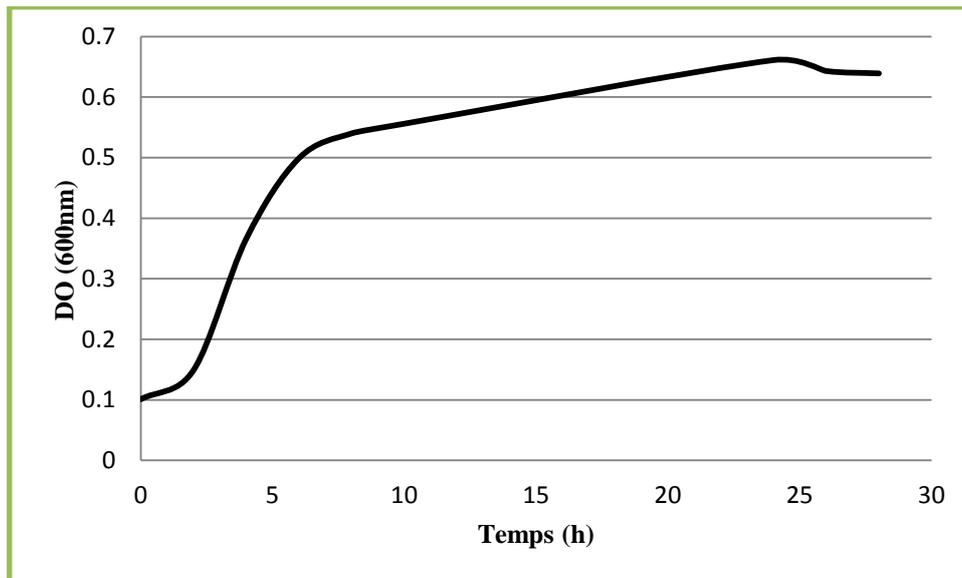


Figure n°19: Cinétique de croissance de *B. cereus* dans le BN incubé à 37°C

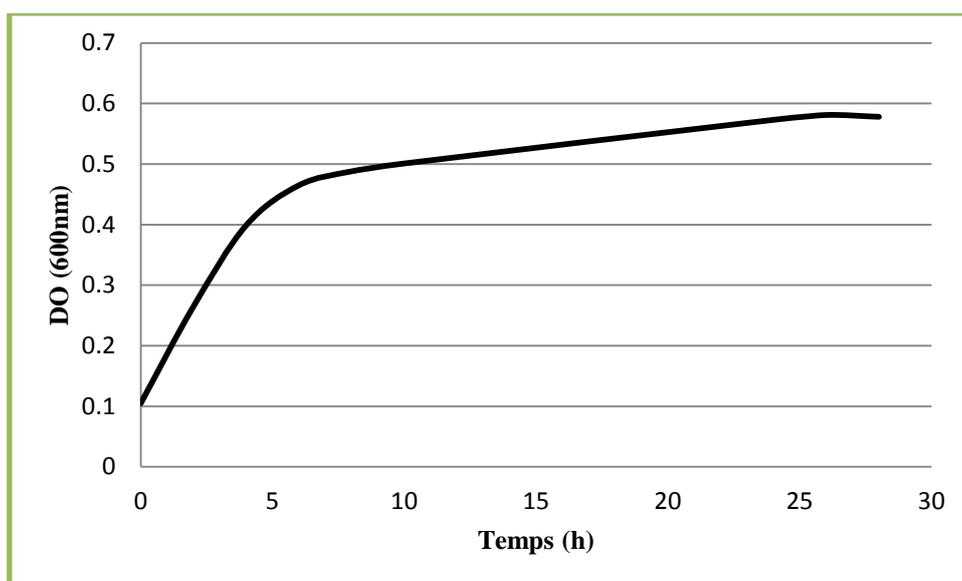


Figure n°20: Cinétique de croissance d'*E. cloacae* dans le BN incubé à 37°C

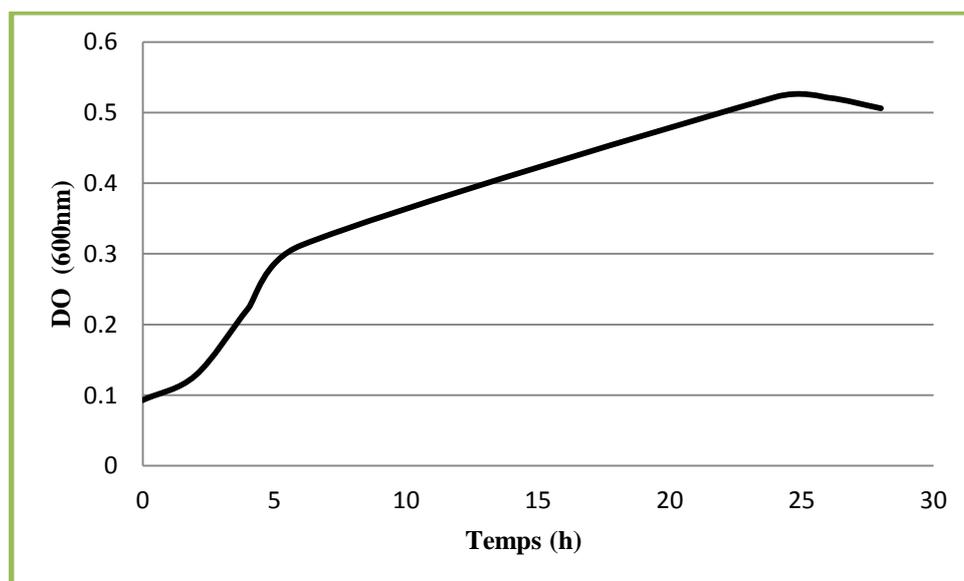


Figure n°21: Cinétique de croissance de *P. aeruginosa* dans le BN incubé à 37°C

II.3. Caractères technologiques des deux produits lactiques probiotiques

II.3.1. Revivification des ferments lactiques

Des étalements des deux produits probiotiques (Beneflore et Super diet) sur boîtes de Pétri contenant le milieu MRS et M17 dans des conditions de culture en anaérobiose et à l'obscurité à 37°C ont été choisis de manière à sélectionner les bactéries lactiques. La. Après 72h d'incubation, les colonies de *L.helveticus* apparaissent de petite taille, blanchâtre-crème, lisses, rondes et bombées (Fig.22) (Carr et al., 2002) et les colonies de six ferments sont apparues blanchâtre de taille différente, de surface lisse plus ou moins bombées à contour régulier (Fig. 23).

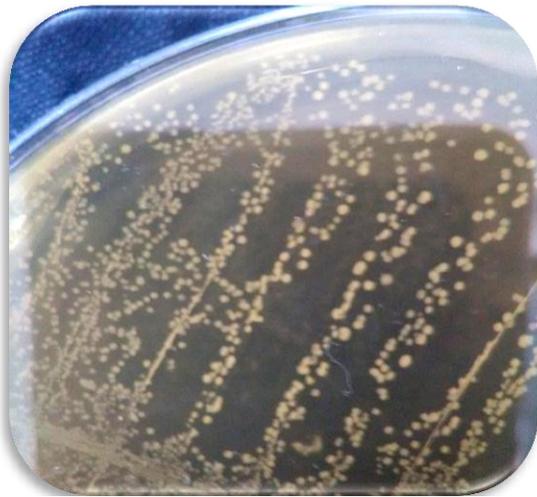


Figure n°22: Aspect macroscopique des colonies de *L. helveticus*



Figure n°23: Aspect macroscopique des colonies de six ferments

II.3.2. Mesure du pH et cinétique d'acidité

La figure 24 permet la mesure du pH et l'acidité titrable de la souche *L. helveticus*.

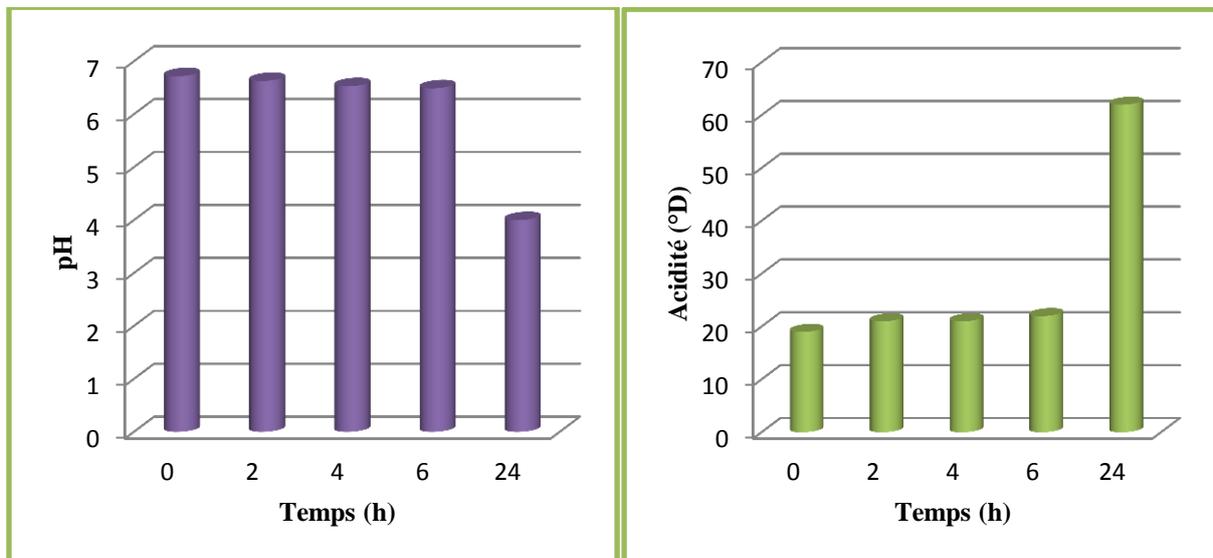


Figure n° 24 : pH et acidité de *L. helveticus* cultivé dans le lait écrémé à 30°C à l'obscurité

La figure 25 permet la mesure du pH et l'acidité titrable de mélange de six ferments lactiques.

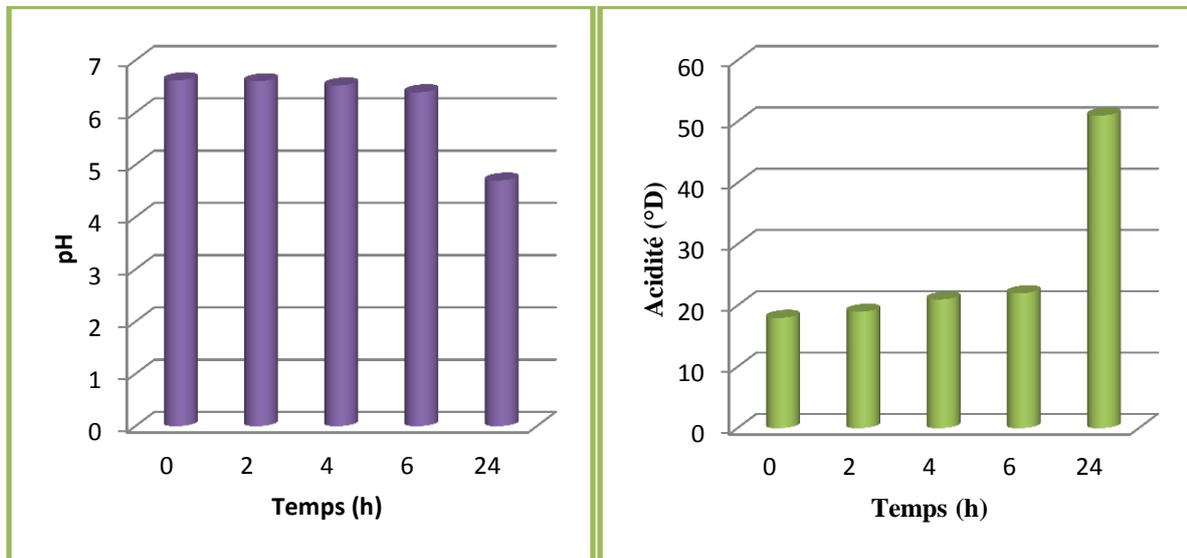


Figure n°25: pH et acidité de mélange de six ferments lactiques cultivés dans le lait écrémé à 30°C à l'obscurité

On remarque qu'il y a pas de différence significative entre les deux souches en ce qui concerne l'évolution du pH. Les valeurs de pH après 24 h de fermentation sont 4.0 pour le lait inoculé avec la souche *L. helveticus* et 4.7 pour le lait inoculé avec le mélange de six ferments lactiques.

Mais la mesure de l'acidité titrable vérifie cette différence et montre que l'acidification du milieu est légèrement plus forte avec la souche *L. helveticus* qu'avec celle du mélange soit 62°D pour la souche *L. helveticus* et 51°D d'acide lactique pour le mélange de six ferments.

II.3.3. Cinétique de croissance

L. helveticus et le mélange de six ferments lactiques présentent le même profil cinétique au début de la phase exponentielle. Il a été remarqué que pour ces deux probiotiques après 4h d'incubation la croissance est très rapide de 6h à 8h, les valeurs du taux de croissance diminuent à partir de 8 h. La cinétique de croissance est représentée respectivement dans les figures 26 et 27 et avec des DO variables selon la composition de produit.

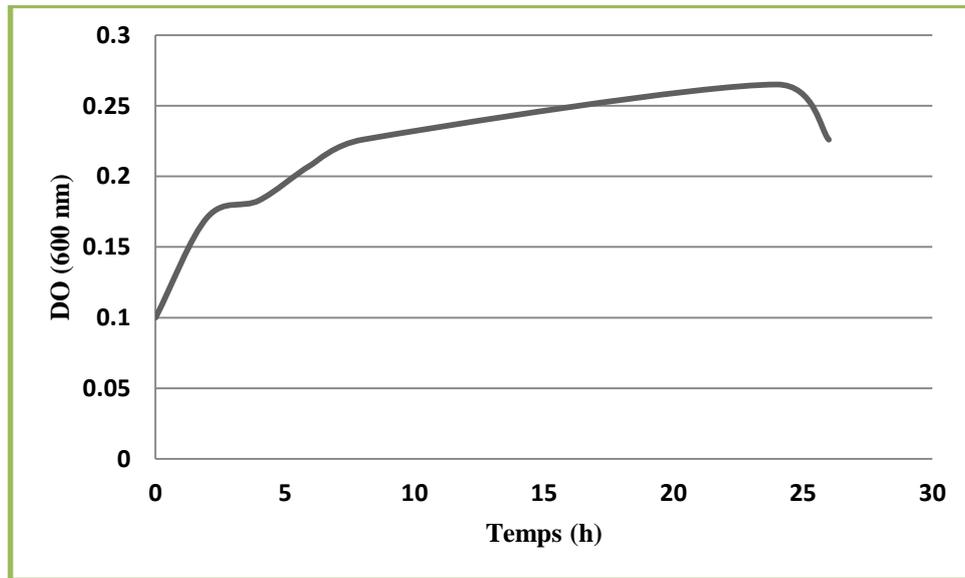


Figure n°26 : Cinétique de croissance de *L. helveticus* au cours de la fermentation

en bouillon MRS incubé à 37°C

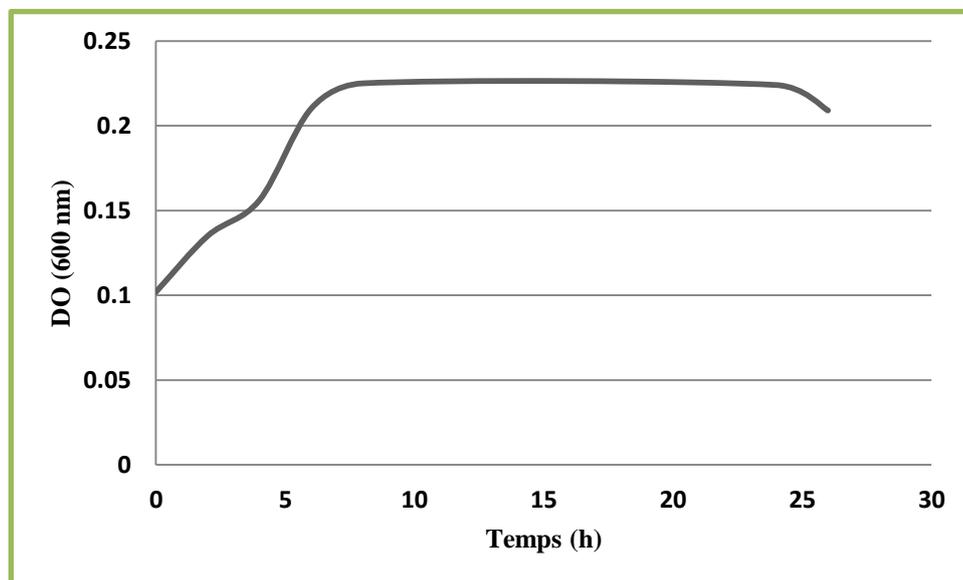


Figure n°27 : Cinétique de croissance de mélange de six ferments au cours de la fermentation

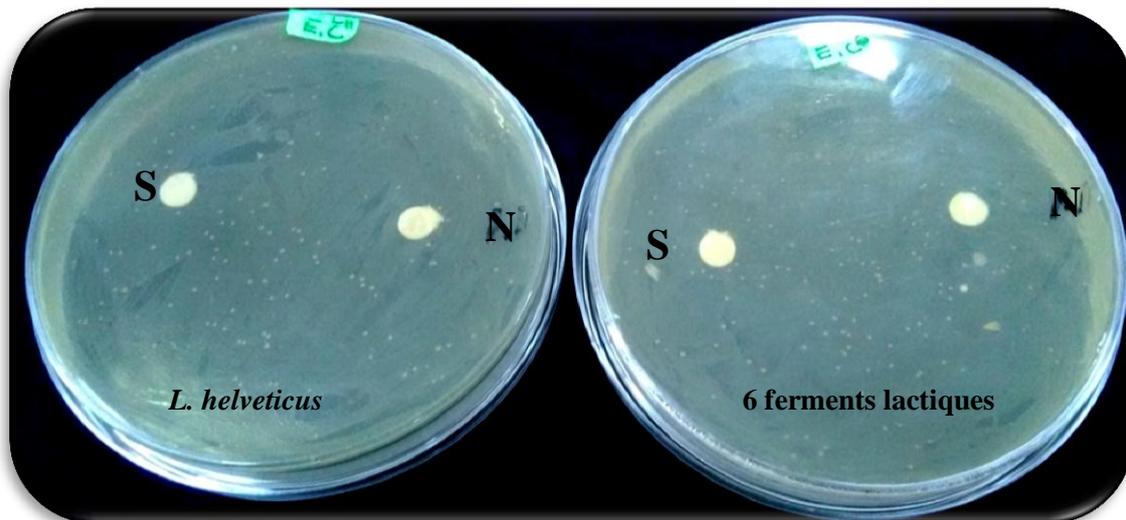
en bouillon MRS incubé à 37°C

I.4. Test d'antagonisme

II.4.1. Sur milieu solide

a. Antagonisme des deux produits lactiques probiotiques / *E. cloacae*

Selon la figure 28, les deux produits lactiques probiotiques n'inhibent pas la croissance d'*E. cloacae* dont le DZI est 00mm.



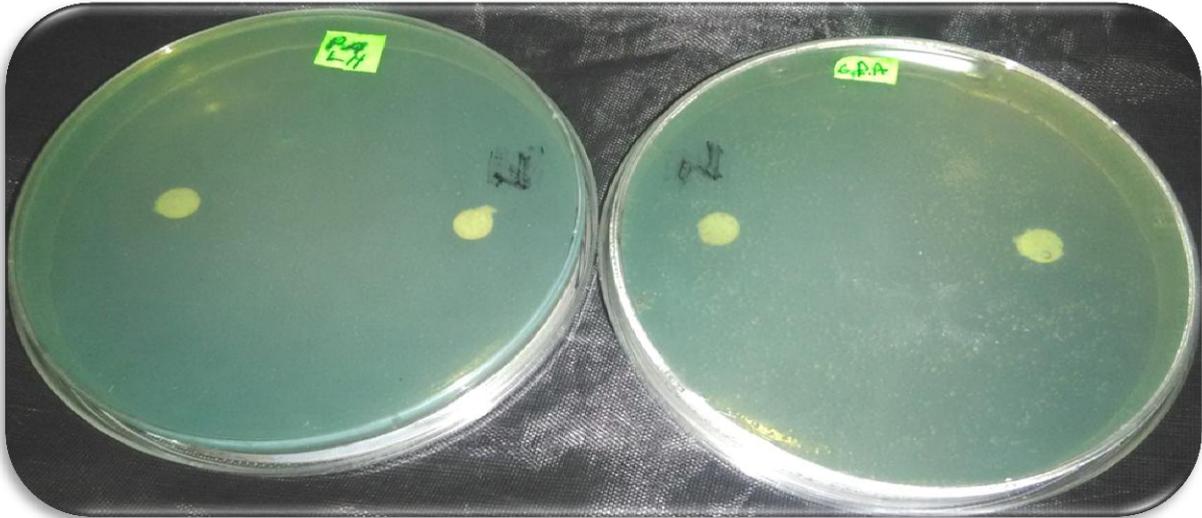
S : Surnageant non neutralisé

N : Surnageant neutralisé

Figure n°28 : Résultats des interactions entre les deux produits lactiques et *E. cloacae*

b. Antagonisme des deux produits lactiques probiotiques / *P. aeruginosa*

L'absence de zone d'inhibition pour le surnageant neutralisé avec une inhibition négligeable causée par le surnageant non neutralisé signifie que le mélange de six ferments lactiques inhibe très légèrement *P. aeruginosa* dont le diamètre de zone d'inhibition est 2mm, mais il ya absence de zone d'inhibition pour les deux types de surnageant de *L. helveticus* (**Fig.29**).



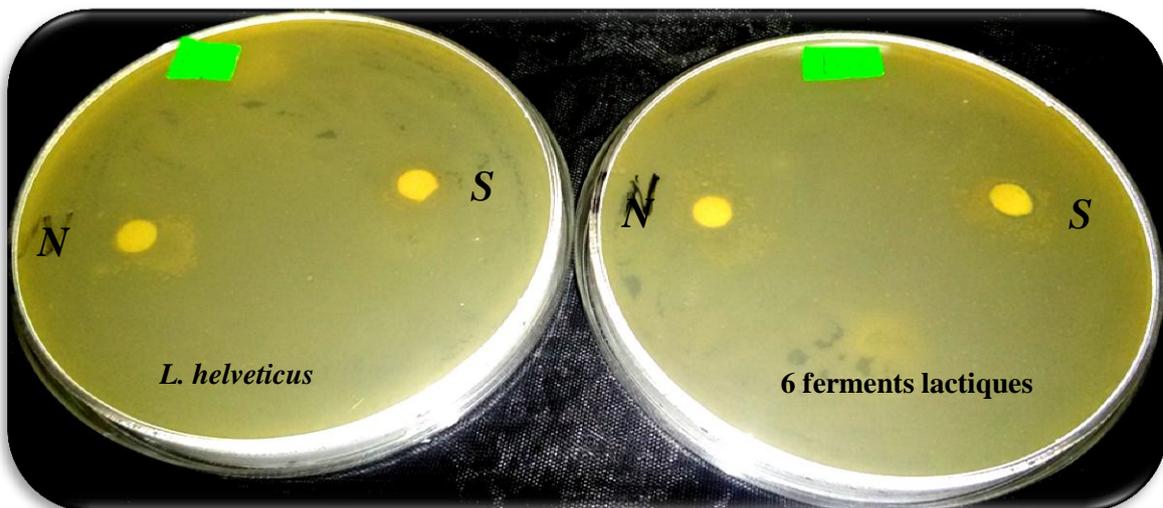
S : Surnageant non neutralisé

N : Surnageant neutralisé

Figure n°29 : Résultats des interactions entre les deux produits lactiques et *P. aeruginosa*

c. Antagonisme des deux produits lactiques probiotiques / *B. cereus*

Le surnageant non neutralisé de mélange de six ferments lactiques inhibe *B. cereus* dont le DZI est 3mm ; mais il y a absence de zone d'inhibition pour les deux de surnageant de *L. helveticus* et le surnageant neutralisé de six ferments (**Fig.30**).



S : Surnageant non neutralisé

N : Surnageant neutralisé

Figure n°30: Résultats des interactions entre les deux produits lactiques et *B. cereus*

d. Interactions entre les bactéries pathogènes et HCl

L'HCl inhibe la croissance de *P. aeruginosa*, *E. cloacae* et *B. cereus* par des DZI respectivement: 11mm, 12mm, 13mm (**Fig. 31**).

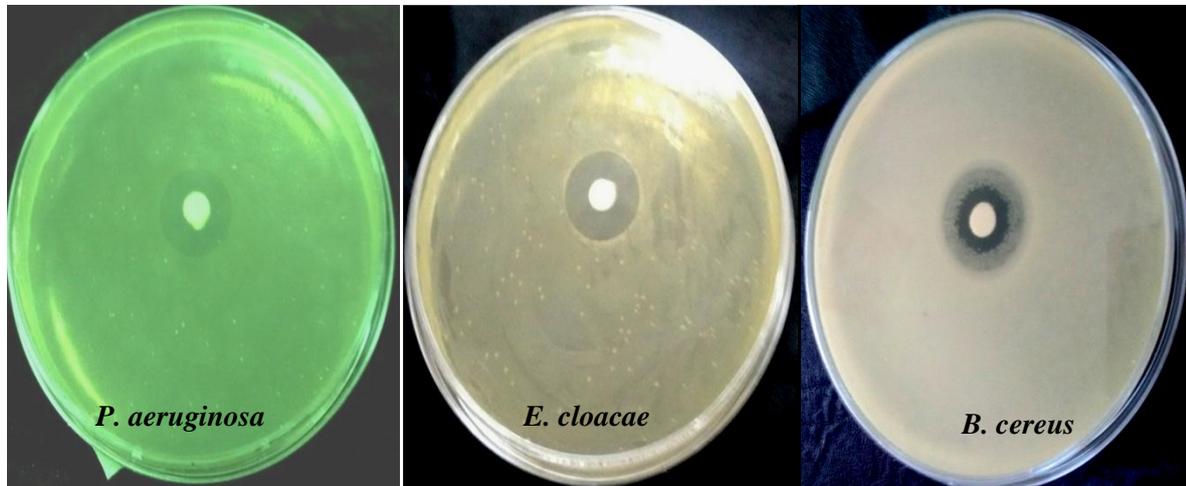


Figure n°31 : Résultats des interactions entre les bactéries pathogènes et HCl

II.4.2. Milieu liquide

Après une incubation à 37°C des deux produits lactiques probiotiques pendant 24 h en micro aérobiose et l'obtention de surnageant neutralisé et non neutralisé, la croissance bactérienne est suivie par la mesure de la DO. Nous avons calculé la croissance bactérienne à l'aide des valeurs de la (DO) chaque 2h afin de connaître l'existence de bactériocine et son effet sur la croissance de trois souches pathogènes. Les résultats sont traduits par des courbes dans les figures 32, 33, 34 et 35. L'effet de HCl est illustré dans la figure 36.

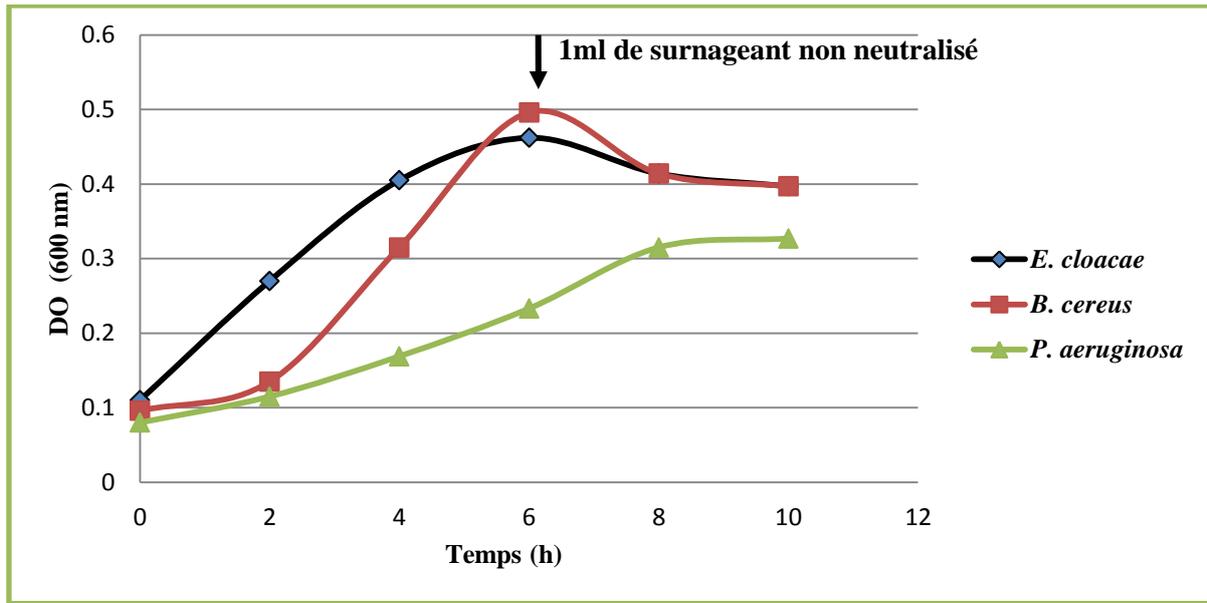


Figure n°32: Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes en présence de surnageant non neutralisé de mélange de six ferments lactiques dans le milieu liquide

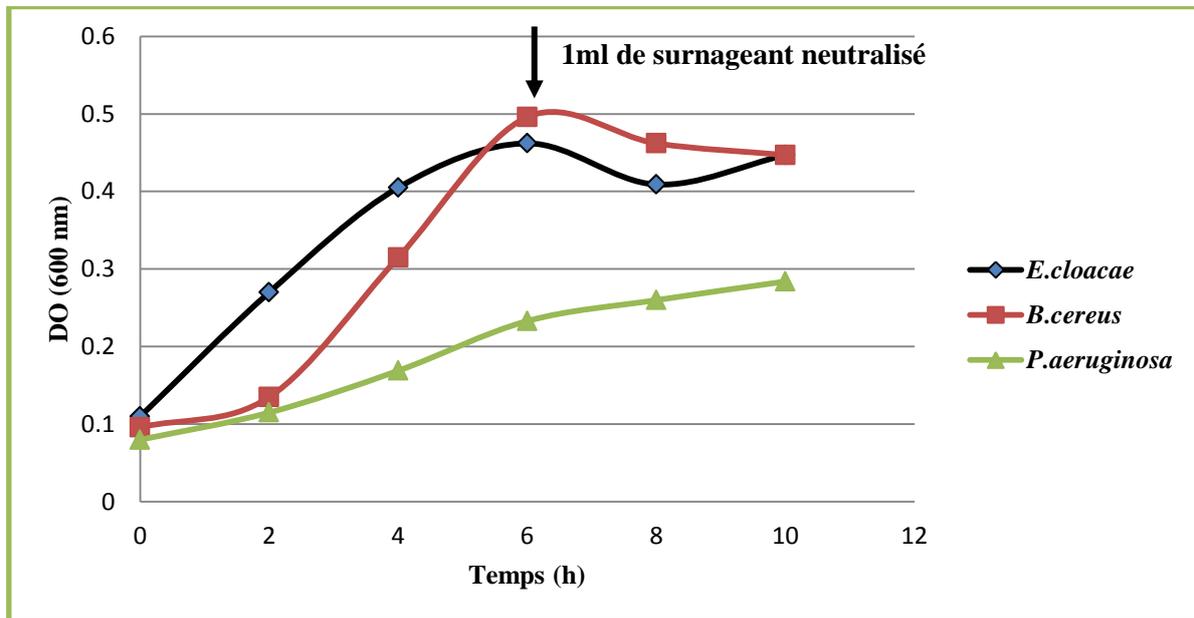


Figure n°33: Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes en présence de surnageant neutralisé de mélange de six ferments lactiques dans le milieu liquide

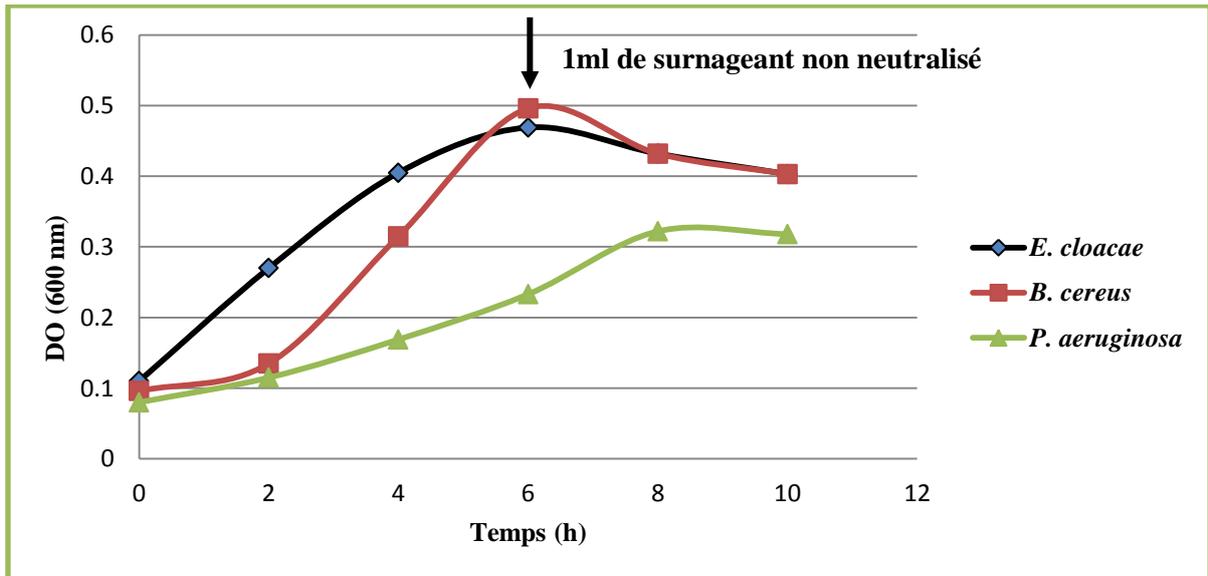


Figure n°34 : Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes en présence de surnageant non neutralisé de *L. helveticus* dans le milieu liquide

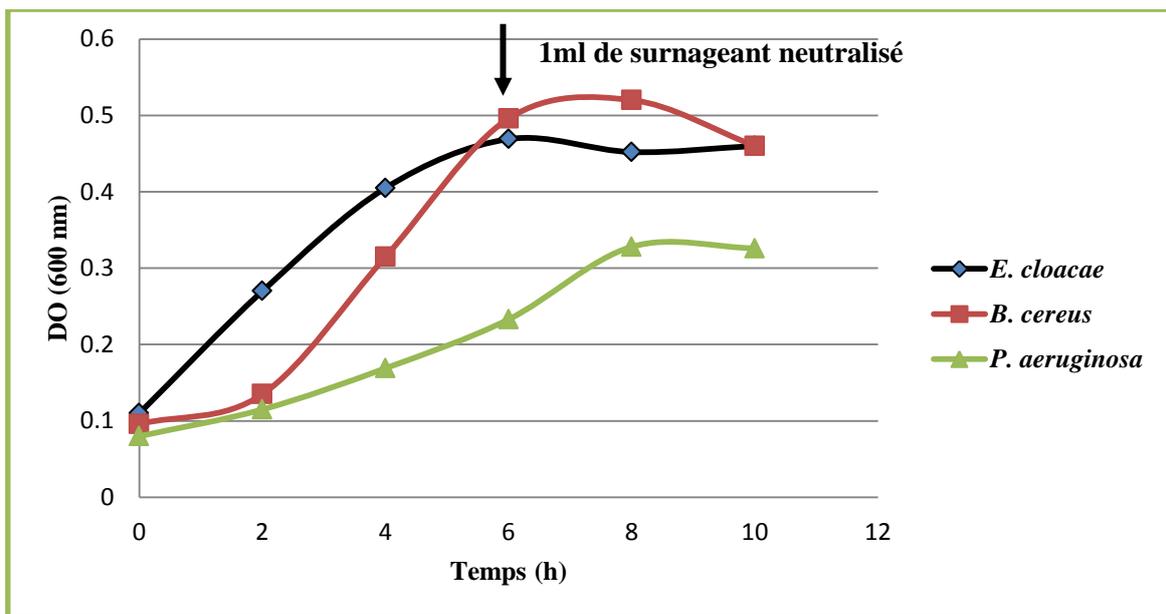


Figure n°35: Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes en présence de surnageant neutralisé de *L. helveticus* dans le milieu liquide

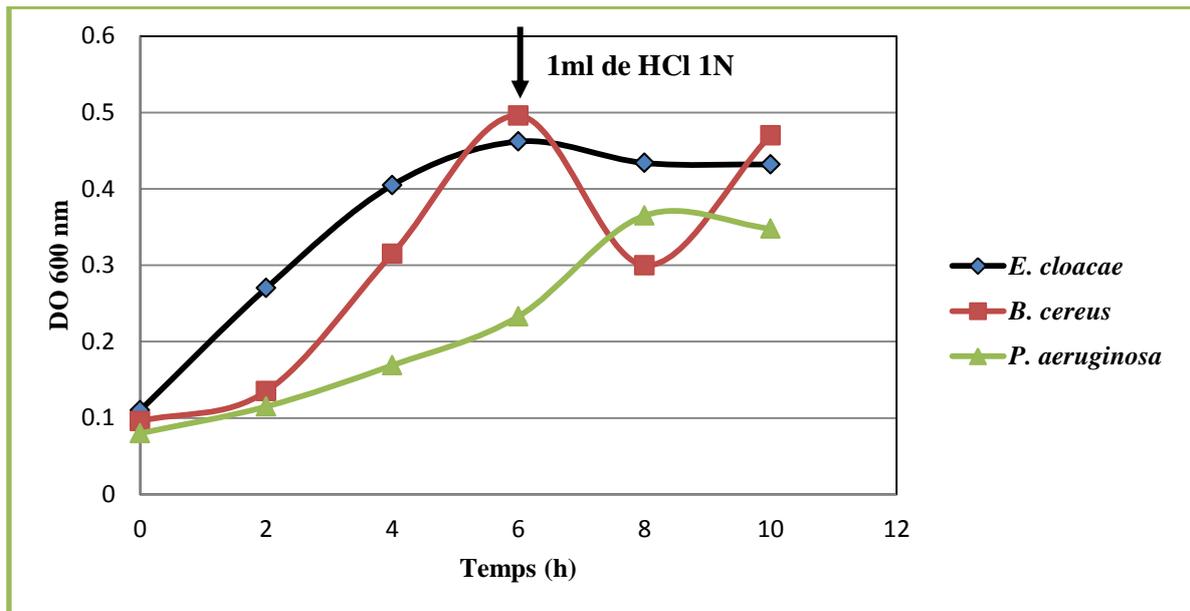


Figure n°36 : Cinétique de croissance des trois bactéries pathogènes en présence de HCl dans le milieu liquide

II.5. Discussion

II.5.1 Caractéristiques des bactéries pathogènes

a. Purification et pré-identification

Dans la présente étude, afin de vérifier les propriétés antibactériennes des deux produits lactiques probiotiques « Beneflore et Super diet » par la méthode des disques et dans le milieu liquide, nous avons purifié et identifié trois souches pathogènes qui sont :

Enterobacter cloacae, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

L'étude morphologique par les observations macroscopique et microscopique et l'identification par Galerie API 20E montrent que :

- *Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif, aérobic strict et oxydase positive, croit très facilement sur des milieux ordinaires, (milieu sélectif au Cétrimide); les colonies sont de grande taille à bords irréguliers et de petites tailles lisses régulières, bombées et pigmentées en vert. Ces résultats sont similaires à ceux mentionnés par **Berche (1991)**.

Berche (1991) a ajouté que *P. aeruginosa*, ubiquitaire très répandu dans l'environnement, saprophyte et généralement mobile. Il contamine les produits alimentaires et exceptionnellement l'agent des infections : dermatologiques, urinaires, pulmonaires, digestives et oculaires. Il sécrète de nombreuses enzymes (élastases, protéases...) et des exotoxines protéiques.

- *Bacillus cereus* sont des bacilles de grande taille, généralement disposés en chaînes, Gram positive, catalase positive avec aptitude à se développer en conditions aérobies. Les spores sont en position centrale ou para centrale (**Nguyen et al., 2005**).

Nos résultats sont identiques à ceux décrits par **Granum (1997)**; **Kramer et Gilbert (1989)**.

B. cereus est en fait l'agent de deux types de syndrome d'intoxication alimentaire : un syndrome diarrhéique et un syndrome émétique, largement présent dans l'environnement et capable de résister aux agressions environnementales et à certaines procédés industriels grâce à la production d'endospores (**Kramer et Gilbert, 1989**).

- *Enterobacter cloacae* cultivés sur le milieu Hektoen sont apparus sous forme bacilles à Gram négatifs ; capsulés, catalase positive et oxydase négative, ces résultats obtenus sont identiques à ceux cités par **Berche (1991)**, il décrit que *E. cloacae* est mobile, opportuniste, et très répandus dans la nature : le sol, l'eau, les végétaux et divers aliments. Il fait partie de la flore commensale de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux où il existe toujours en faible quantité, en particulier dans le tube digestif et les voies respiratoires. Ces microorganismes sont aéro-anaérobies à métabolisme fermentatif et cultivés facilement sur des milieux simples ou des milieux sélectifs ; et responsables d'une série d'infections nosocomiales secondaires.

b. Caractérisation de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité de trois souches pathogènes aux antibiotiques a montré d'excellents résultats par rapport à l'activité de la plupart des antibiotiques utilisés. Nos résultats ont montré que ces souches sont sensibles à la Ciprofloxacine et Gentamycine. En revanche, elles montrent une résistance remarquable vis-à-vis aux antibiotiques comme l'Oxacilline, l'ampicilline, la Polymixine et l'AMC.

Une sensibilité au Lincomycine, Rifampicine, Erythromycine, Cephalexine et au oxacycline a été observé chez la souche *B.cereus*, et une résistance trouvée chez *P. aeruginosa* et *E. cloacae* au Lincomycine, Rifampicine, Doxycycline et au Cephalexine.

Il est noté que *P. aeruginosa* et *E. cloacae* sont des bactéries plus résistantes aux antibiotiques (**Berche, 1991**). Les résistances observées chez ces deux souches ont été décrites par plusieurs (**Aujar,1987 ; Thabaut et Meyran, 1985**).

Donc il est important dans toute infection de tester la sensibilité des souches pathogènes vis-à-vis de ces antibiotiques pour justifier leurs utilisations dans le domaine thérapeutique (**Bardhan et al., 2000 ; Bigard et al., 1995 ; Cayla et al., 1996; Bell et al., 1993**).

II.5.2. Caractères technologiques des deux produits lactiques probiotiques

➤ Etude cinétique

Pour les deux produits lactiques probiotiques, et selon la cinétique de croissance et la mesure du pH et de l'acidité, on a observé une évolution constante de l'acidité titrable même pendant la phase stationnaire montrant un découplage entre la multiplication cellulaire et l'acidification. Ainsi la croissance de mélange de six ferments s'arrête au pH 4.7 lorsque la l'acidité titrable est de 51°D (5.1 g/l d'acide lactique). La croissance est donc inhibée par

l'épuisement du milieu de culture. Pour la souche *L. helveticus*, la croissance s'arrête au pH 4.0 avec une acidité titrable de 62°D (6.2g/l d'acide lactique). La possibilité de découpler la multiplication cellulaire et la synthèse d'acide lactique est une propriété de nombreuses bactéries lactiques. Nos résultats confirment les travaux de **Scriban (1999)** qui montre que les cinétiques de croissance et de production sont étroitement découplées lors de la production de composés intermédiaires du métabolisme appelés métabolites primaires. Il s'agit de molécules telles que les acides aminés et les vitamines nécessaires aux synthèses cellulaires.

Ce découplage partiel entre la production d'acide lactique et la croissance a été trouvé par **Amrane et Prigent (1997)** ; **Kulozik et Wilde (1999)** qui ont travaillé sur une bactérie lactique thermophile *Lactobacillus bulgaricus* cultivée sur lactosérum enrichi.

Les résultats obtenus par **Boudjema et al (2009)** ont montré que la croissance et la production d'acide lactique sont étroitement découplées après l'étude de fermentation lactique par *Streptococcus thermophilus*S13 sur lactosérum doux déprotéiné et stérilisé à pH libre.

Ainsi que les études de **Bergère et al (1968)** ont montré que la quantité d'acide lactique produite croît en fonction du temps de culture de façon exponentielle puis présente un ralentissement en même temps que la croissance, mais elle continue à augmenter bien après l'arrêt de celle-ci.

Dans notre présence étude l'abaissement du pH dans le milieu MRS liquide signifie que chaque un des deux ferments lactiques possède un effet acidifiant, en produisant des acides organiques, les principaux facteurs d'inhibition (**Ait Abdelouahab, 2001** ; **Choisy et al., 1997** ; **Mathot et al., 1996**).

La comparaison entre nos résultats obtenus du pH et celui de l'acidité montre que le taux d'acidité augmente avec la diminution du pH.

II .5.3. Test d'antagonisme

II.5.3.1. Milieu solide

L'effet inhibiteur des deux produits lactiques probiotiques testés a été déterminé par la mesure des zones d'inhibition, les résultats de l'étude de leur activité antibactérienne ont montré l'absence de l'activité antagoniste de *L. helveticus* contre les souches étudiées. En revanche, le surnageant non neutralisé de produit de six ferments était capable d'inhiber légèrement une bactérie Gram-négatif et une Gram-positif. Ceci suggère que l'activité antagoniste du mélange de six ferments lactiques contre *P. aeruginosa* et *B. cereus* est due à l'action du pH bas ou une action synergétique entre les substances antibactériennes synthétisées par l'ensemble des bactéries lactiques de ce mélange.

Il est important de relever que les résultats obtenus dans notre étude se rapprochent de ceux cités par **Vignolo et al(2000)** qu'ils ont indiqué que la combinaison de différentes bactériocines permet d'augmenter l'activité et le spectre d'action, tout particulièrement en combinant des bactériocines appartenant à des classes différentes .

En effet ; les bactéries Gram+ sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques (**Onda et al., 2003**). Les bactériocines sont surtout actives sur les pathogènes à Gram+ et agissent en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires (**Biswas et al., 1991**). **Song et Richard(1997)** ont montré chez *Listeria*, bactéries à Gram positif, que les cellules résistantes aux bactériocines ont une membrane de composition différente de celle des cellules sensibles. Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites ont une activité dirigée contre les bactéries Gram positif Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques ayant une activité contre des bactéries Gram- n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram- ne permet pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne ; siège de leur activité (**Dortu et Thonart, 2009**).

Dans notre étude le diamètre de la zone d'inhibition de produit de six ferments lactiques probiotiques (3mm) contre la bactérie Gram positif *B. cereus* est faible par rapport aux résultats obtenus par **Dubois et al (1979)** montrant que les bactéries Gram positif étaient en général plus inhibées que les bactéries Gram négatif, quelle que soit la bactérie lactique utilisée.

Notre produit est composé de six bactérie lactiques et il est évident que la capacité des microorganismes à entrer en compétition pour limiter les nutriments disponibles est un facteur non négligeable, donc et on peut dire qu'il y a une possibilité de l'absence de développement de certaines souches lactiques , les travaux de **Juillard et al (1987)** ont montré que lorsque plusieurs souches sont mises en culture dans un même milieu, elles entrent nécessairement en compétition, si elles utilisent le même substrat. C'est ce qui se passe avec les bactéries lactiques utilisant le lactose.

Ce type d'inhibition par compétition a été également analysé dans le cas de l'association de *S. thermophilus* avec *L. bulgaricus* (**Moon et Reinbold, 1976**). Dans les conditions optimales de stimulation de la production d'acide, c'est-à-dire à 37°C, *S. thermophilus* croît plus rapidement que *L. bulgaricus*, ce dernier se développant moins activement en culture mixte que lorsqu'il est cultivé seul. Cette inhibition du lactobacille a été interprétée, par des auteurs, comme le résultat d'une utilisation rapide de quelques nutriments essentiels par *S.thermophilus*, aux dépend du lactobacille (**Juillard et al., 1987**), ainsi si le pH n'est pas

régulé, *L. bulgaricus* continue à croître après arrêt de la croissance de *S. thermophilus* (Accolas et al., 1977).

Et selon la composition de milieu de culture, les bifidobactéries se développent sur milieu MRS par l'ajout de cystéine, de pyruvate (Roy, 2001), on peut conclure avec ces conditions que le milieu de culture utilisé ne favorise pas le développement de la souche *Bf. Longum* l'une de six bactéries de produit probiotique « BENEFLORE » et par conséquent on a l'absence de ses métabolites dans le milieu.

En effet, l'étude entreprise par Yang et Ray (1992), a montré que la production de bactériocine par les bactéries lactiques est fortement dépendante : des souches, de la composition du milieu de culture, du pH final du milieu, du temps d'incubation, de la température optimale de croissance et surtout elle nécessite l'utilisation des milieux simples et économiques.

Pour *P. aeruginosa*, l'effet inhibiteur exercé par le mélange de six ferments lactiques probiotiques est négligeable mais on peut prendre en considération ce résultat puisque *P. aeruginosa* est une bactérie plus résistante aux antibiotiques (Berche, 1991) parce qu'il est nécessaire de mentionner l'étude de l'activité antibactérienne de souches de *S. lactis* subsp. *Diacetylactis* et de *Leuconostoc cremoris* (Branen et al., 1975) qui a montré que certaines souches de *Pseudomonas* étaient inhibées, et que les acides organiques issus du métabolisme de ces deux bactéries lactiques étaient des agents inhibiteurs. Cependant, l'action de ces acides sur les souches de bactéries lactiques n'a malheureusement pas été recherchée. Il y a donc une possibilité d'inhibition qui serait à confirmer.

II.5.3.2. Milieu liquide

Par contre, le test d'antagonisme de deux produits lactiques probiotiques et les trois bactéries pathogènes dans le milieu liquide a révélé des nouveaux résultats qui diffèrent à ceux trouvés par la méthode des disques. Le surnageant neutralisé et non neutralisé de *L. helveticus* inhibent légèrement la croissance de *P. aeruginosa* et *E. cloacae* mais une inhibition un peu importante chez *B. cereus*. Les travaux de Dubois et al (1982) ont montré aussi que *L. helveticus* inhibe plus fortement *B. cereus* que *P. aeruginosa* et *E. cloacae* et que *L. helveticus* produirait une substance ayant un pouvoir inhibiteur plus faible.

Le surnageant de mélange de six ferments lactiques ajouté aux cultures nuisibles à la sixième heure, engendre une diminution légère de la croissance de *B. cereus* et une diminution un peu plus légère de croissance de *P. aeruginosa* et *E. cloacae*.

D'après les résultats obtenus on a constaté que l'effet inhibiteur de deux Produits lactiques probiotiques commercialisés dans la plus part du temps est dû à la synergie entre les bactériocines et l'acide lactique, lors d'expériences, *in vitro*, certains auteurs ont proposé une action synergétique entre les substances protéiques antimicrobiennes et les acides organiques pour expliquer l'action inhibitrice des bactéries probiotiques. **Gopalet *al* (2001)** ont suggéré que les substances protéiques antibactériennes inhibe *E. coli* en agissant en combine avec le ou les acide(s) produit(s). Selon **Alakomiet *al* (2000)** ; **Servin et Coconnier (2003)**, cette inhibition s'expliquerait par une diminution du pH qui provoque une perméabilisations de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif facilitant ainsi la pénétration d'autres substances antimicrobiennes telles que les bactériocines.

Certaines études ont montré que l'effet antagoniste de l'acide lactique est provoqué par l'acide L (-) ou D (+). Dans ce cadre, les travaux de **Sutra et *al*(1998)** confirment que l'inhibition des bactéries pathogènes ne dépend pas de la quantité d'acide lactique produite par les bactéries lactiques, mais elle est liée au type (L (-), D (+) ou les deux) et à la forme dissociée ou non de l'acide lactique.

Les acides organiques sont par leur effet inhibiteur, sous leur forme dissociée ou non dissociée, agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en perturbant le maintien du potentiel de membrane et en inhibant les systèmes membranaires de transport actif (**Alakomietal., 2000**).

Les bactériocines, sont produites puis excrétés à l'extérieur des cellules productrices pour présenter une activité bactéricide ou bactériostatique (**Chen et *al.*, 2003**). Dans ce travail les bactériocines et autres facteurs inhibiteurs produites par les deux produits lactiques probiotiques ont un effet bactériostatique vis-à-vis les bactéries indésirables étudiées.

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

L'acide chlorhydrique HCl est un produit chimique couramment utilisé pour réguler l'acidité (pH) de solutions, l'utilisation de cet acide dans notre étude est pour déterminer l'effet du pH bas sur la croissance bactérienne.

L'ajout de HCl aux cultures nuisibles à la sixième heure, engendre une diminution légère de la croissance d'*E. cloacae* puis une augmentation aussi légère et une inhibition faible contre *P. aeruginosa* mais une diminution remarquable de la croissance de *B. cereus* suivie par son retour au nombre initial. Cette inhibition courte est due d'une part à l'acidité et à la diminution du pH engendrés par le HCl et d'autre part à l'adaptation de nos souches aux modifications du milieu de culture, ceci est confirmé par les travaux de **Oulkheir et *al* (2006)** qui montrent que la résistance de deux souches d'*E. coli* à pH 2.5 est plus importante lorsque

les bactéries sont adaptées à pH 4.8. En outre, la présence du chloramphénicol lors de la préadaptation diminue la viabilité des deux souches, ceci est en accord avec les travaux de **Jordan et al (1999)**. Ces auteurs ont rapporté que l'addition de chloramphénicol au cours de la préadaptation réduit significativement la survie bactérienne. Ces résultats soulignent que les populations résistantes à l'acidité ont la capacité de synthétiser des protéines restaurant les fonctions cellulaires après exposition au stress acide.

Ces résultats suggèrent fortement que lors de l'adaptation à pH intermédiaire 4.8 des synthèses protéiques sont induites et sont responsables de l'amélioration de la tolérance au stress acide (**Guillouard et al., 2004 ; Heyde et al., 1990**).

Et selon **Brudzinski et Harrison (2004)**, la survie d'*E. coli* dans un environnement acide est liée à une résistance à l'acidité inductible, dépendante du pH du milieu. Ces auteurs ne soulignent que la préadaptation des cellules d'*E. coli* à des conditions acides (pH 5) favorise leur survie dans une solution d'acide lactique à pH 3.85 ainsi que dans le jus de pomme à pH 3.4.

Cette résistance à l'acidité implique non seulement la survie prolongée du microorganisme dans les aliments acides, mais favorise également le transit de la bactérie dans l'estomac.

Conclusion

Les bactéries lactiques sont connues par leur capacité de produire lors de leur croissance des composés actifs à savoir les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et des substances naturelles de nature protéique douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes pathogènes.

Deux produits probiotiques lyophilisés et commercialisés ont fait l'objet de cette étude, l'un est un mélange de six ferments lactiques (Beneflore) et l'autre est composé de *L. helveticus* (Super diet).

Dans la première partie de notre expérimentation, trois bactéries pathogènes sont purifiées et selon les tests biochimiques classiques d'identification des bactéries réalisés à l'aide des galeries biochimiques API 20E, nos souches appartenant au genre et espèces suivants : *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, et *Enterobacter cloacae*.

La sensibilité aux antibiotiques a montré que les trois souches sont sensibles aux Ciprofloxacine et Gentamicine et par contre sont résistantes aux oxacilline, ampicilline, Polymixine et AMC

L'étude de la cinétique de croissance a révélé que *Bacillus cereus*, et *Enterobacter cloacae* ont le même profil cinétique au début de la phase exponentielle, la croissance est très rapide de 6h à 8h, avec des densités optiques variables selon l'espèce, les valeurs du taux de croissance diminuent à partir de 8 heures mais la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* est très rapide de 4h à 24h.

Dans la deuxième partie, la revivification des ferments lactiques probiotiques réalisée sur les milieux de culture MRS et M17, nous a permis d'avoir le développement de ces bactéries lactiques. L'étude de l'évolution du pH et de l'acidité titrable a montré que les deux produits probiotiques possèdent un pouvoir acidifiant élevé dont Les valeurs de l'acidité titrable des cultures pures sont 51°D pour le mélange de 6 ferments et 62°D pour *L. helveticus* et celles du pH sont respectivement 4.7 et 4.0 après 24 h d'incubation à 30 °C.

L'étude de cinétique de croissance de ces deux produits lactiques probiotiques montre un découplage entre la multiplication cellulaire et l'acidification.

Le test des interactions entre les deux ferments lactiques probiotiques par la méthode des disques sur milieu solide et les souches pathogènes a révélé des zones d'inhibition dont les diamètres sont faibles, 02mm pour *Pseudomonas aeruginosa* et 03mm pour *Bacillus cereus* mais aucun effet inhibiteur remarqué chez *Enterobacter cloacae*.

L'étude des dénombrements des souches pathogènes par mesure de la densité optique, après une interaction dans le milieu liquide; par l'étude du pouvoir antibactérien des surnageant neutralisés et non neutralisé des cultures de deux produits lactiques probiotiques

retenues ; a montré que le nombre de *Enterobacter cloacae* et *Pseudomonas aeruginosa* a diminué légèrement, et une inhibition un peu importante chez *Bacillus cereus*, cela est dû à l'effet inhibiteur des deux produits lactiques probiotiques. On peut déduire que les bactéries pathogènes Gram positif sont plus sensibles à l'effet des souches lactiques.

Nos résultats montrent qu'il y a une action synergétique entre les substances protéiques antimicrobiennes et les acides organiques.

Enfin on conclue que dans ce travail, les bactériocines et autres facteurs inhibiteurs produites par les deux produits lactiques probiotiques ont un effet bactériostatique vis-à-vis des bactéries nuisibles étudiées.

Nos résultats laissent entrevoir différentes perspectives notamment :

- ✚ Isolement et purification et identification physiologique et biochimique des différentes souches contenues dans le produit « Beneflore » (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium* spp et *Streptococcus thermophilus*)
- ✚ Etudier l'effet inhibiteur de chaque souche isolée et de l'association entre les souches qui ont les mêmes conditions de culture.
- ✚ Etudier l'effet de ces deux produits lactiques probiotiques sur les champignons.
- ✚ Etudier l'effet de ces deux produits lactiques probiotiques sur autres bactéries pathogènes.
- ✚ Etudier autre produit probiotique commercialisé.

Références bibliographiques

- Abee, T. (1995). Pore-forming bacteriocins of Gram+ bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 129 : 1-9.
- Accolas, J.P., Bloquel, R., Didiene, R., Regnier, J. (1977). Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yoghourt. *Lait*, 57 : 1-23.
- AFNOR. (1986). Guide de bonne pratique pour le choix, le stockage, l'utilisation et l'entretien. DOC/06-98/CL.
- Ait Abdelouahab, N. (2001). Microbiologie alimentaire. Ed. Office des publications universitaires, Alger. Pp : 23.
- Alakomi, H.I., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., Helander, I.M. (2000). Lactic acid permeabilized gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane, *Appl Environ. Microbiol.*, 66 : 2001-2005.
- Allouche, F.N., Hellal, A., Laraba, A. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière, *Nature et Technologie*, 03 :13-20
- Amrane, A., Prigent, Y. (1997). Growth and lactic acid production coupling for *Lactobacillus helveticus* cultivated on supplemented whey: influence of peptidic nitrogen deficiency, *J. Biotechnol.*, 55 : 1-8.
- Aujar, Y. (1987). Traitement des infections néonatales: place des céphalosporines Press. Méd., 43 (16): 2176 – 2179.
- Badis, A., Guetarni, D., MoussaBoudjemaa, 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.
- Béal, C., Marin, M., Fontaine, E., Fonseca, F., Obert, J.P. (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Ed. Corrieu, G. Luquet, F.M), Ed. Tec et Doc-Lavoisier ; Paris, Pp : 667-670
- Berche, P. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* et espèces proches. In *Bactériologie les bactéries des infections humaines*. (Ed. Berche, P., Gaillard, J-L., Simonet, M), Ed. Médecine-sciences flammariion ; Paris. Pp : 230-237
- Bergère, J.L., Hermier, J., Lacourt, A. (1968). La production massive de cellules de streptocoques lactiques. II. Croissance de " *Streptococcus lactis*" dans un milieu a pH constant. *Le Lait*, 48 (471- 472) : 13-30.

- Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C., Ray, B. (1991). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocinAcH, by *Pediococcus acidilactici*H. *Appl. Environ. Microbiol*, 57 (4) : 1265-1267.
- Boudjema, K., Fazouane-Naimi, F., Hellal, A., Mechakra, A. (2009). Optimisation et modèle de production d'acide lactique par *Streptococcus thermophilus* sur lactosérum, *Sciences et Technologie*, 29 : 80-90.
- Branen, A.L., Go, H.C., Gensker, P. (1975). Purification and properties of antimicrobial substances produced by *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Food. Sci.*, 40 : 446-450.
- Brown ande, V.I., Lowbury, J.L. (1965). Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. clin. Path.*, 18 : 752-756.
- Brudzinski, L., Harrison, M.A. (1998). Influence of incubation conditions on survival and acid tolerance response of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates exposed to acetic acid. *J. Food Prot.*, 61(5) : 542-546.
- Carr, F.J., Hill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria : A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, 28 : 281-370.
- Chamba, J.F., Prost, F. (1989). Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles utilisées pour la fabrication des fromages à pâte cuite, *Lait*, 69 : 417- 431.
- Choisy, C., Desmazeaud, M., Gueguen, M., Lenoir, J., Schmidt, J., Tourneur, C. (1997). Les phénomènes microbiens. In *Le fromage : De la science à l'assurance-qualité* .(Ed. Eck, A., Gillis, J.C) 3^{ème} Edition, Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Pp : (381-429).
- 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.
- Delarras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire, Ed. Tec et Doc-Lavoisier ; Paris, Pp : 92-94 ; 287-289.
- Dortu, C., Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13 (1) : 143-154

- Dubois, G., Beaumier, H., Charbonnea, R.U. (1979). Inhibition of bacteria isolated from ground meat by *Streptococcaceae* and *Lactobacillaceae*. *J. Food. Sci.*, 44 : 1649-1652.
- Dubois, G., Charbonnea, U.W.S.R., Gagnon, M. (1982). Inhibition de quelques bactéries pathogènes et potentiellement pathogènes par *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus helveticus*. *Le Lait*, 62 : 681-687.
- FAO/WHO. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria .Cordoba, Argentina, 1-4 October.
- FAO/WHO. (2002). Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. In Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, pp.1-11.
- Fooks, L.J., Gibson, G.R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora, *The British Journal of Nutrition*, 88 (1): 39-49.
- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 120 (1-2) : 51-70.
- Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., Gill, H.S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.*, 67, 207–216.
- Granum, P.E., Lund, T. (1997). Microbiology letters, *FEMS*, 8: 157-223.
- Guillouard, I., Lim, E.M., Van de Guchte, M., Grimaldi, C., Penaud, S., Maguin, E. (2004). Tolérance et réponse adaptative au stress acide chez *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*. *Lait*, 84 : 1- 6.
- Guiraud, J.P. (2012). Microbiologie Alimentaire. Ed. Dunod ; Paris, Pp : 541 - 594.
- Guiraud, J-P. (2003). Microbiologie Alimentaire. Pouvoir pathogène- notion 'immunologie. Relation microorganismes êtres vivants. Ed. Dunod ; Paris, Pp : 37-38.
- Gun.Loux-Benatier, M., Son, H. S., Bouhier, S., Feuulat, M. (1993). Activités enzymatiques: glycosidases et peptidase chez *Leuconostoc oenos* au cours de la croissance bactérienne. Influence des macromolécules de levures. *Vitis*, 32 : 51-57.

- Hen, H., Hoover, d.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *ComprehensiveReviews in Food Science and Food Safety*, 2 : 82-100.
- Heyde, M., Portalier, R. (1990). Acid shock proteins of *Escherichia coli*. -*FEMS Microbiol. Lett.*, 69 (1-2) : 19-26.
- Hugenholtz, J., Kleerebezem, M. (1999). Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10 (5) : 92-497.
- Joffin, N.J., Leyral, G. (2006). Microbiologie Technique Tome1, Dictionnaire des techniques conidin de Biologie Technique. Ed. Canopé –CRDP d'Aquitaine-Bordeaux, Pp : 102, 226, 239, 257.
- Jordan, K.N., Oxford, L., O'Byrne, C.P. (1999). Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: Correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. - *Appl. Environ.Microbiol.*, 65 (7): 3048-3055.
- Juillard, V., Spinnler, H.E., Des mazeaud, M.J., Boquien, C.V. (1987). Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière, *Le Lait*, 67 (2) : 149-172
- Juillard, V., Spinnler, H.E., Des mazeaud, M.J., Boquien, C.V. (1987). Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Le Lait*, 67 (2), 149-172
- Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Logan Buck, B., Azcarate-Peril, M.A. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29 : 393-409.
- Kramer, J.M ., Gilbert, R.J .(1989) . *Bacillus cereus*and other*Bacillus* species. In Food borne BacterialPathogens. (Ed : Doyle, M.P) Ed. Marcel Dekker Inc., New York, Pp : 21-70.
- Kramer, J.M., Gilbert, R.J. (1989). Food borne bacterialpathogens. *Marcel Dekker Inc.*, NewYork, USA.
- Kulozik, N., Wilde, J. (1999). Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* Enzyme. *Microbiol. Tech.*, 24 : 297-302.
- Labioui, H., Laaroussi, E., El yachioui, M., Ouhssine, M. (2005), Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm.*, 144 : 237-250.

- Lamouliatte, H., Mégrand, F., Cayla, R. (1992). *Helicobacter pylori* et pathologie gastroduodénale. Encyclopédie Médico-chirurgicale. Ed. Techniques. EMC.
- Larpent, J.P., Larpent, G.M. (1990). Mémento technique de microbiologie 2^{ème} Ed. Ed. Tec et Doc Lavoisier, Paris, P: 417.
- Leclerc, H., Buttiaux, R., Guillaume, J., Watre, P. (1977). Microbiologie appliquée. Ed. Doin ; paris, Pp : 184.
- Leclerc, H., Gaillard, F L., Simonet, M. (1994). Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. Ed. Doin, Paris, Pp : 445.
- Lucas, S., Reyrolle, J. (1989). Etude d'un lot de ferments lactiques mésophiles. Equilibre des flores au cours de la première étape de la fabrication du levain. *Lait*, 69 (2) : 121-130.
- Man, J. C., Rogosa, M., Sharp M. E. (1960). A médium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23: 130-135.
- Man, Rogosa, Sharpe. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. ApplBacteriol.*, 23:130-135.
- Mandimbisolofu, N., Marson, R., Daniel, R. (2013). Propriétés biologiques, *Seneciofaujasioïdes*. *J Int Santé Trav.*, 1: 33- 40.
- Mathot, A.G., Beliard, E., Thuault, D. (1996). Microbiologie alimentaire tome 2. Ed. Tec et Doc-Lavoisier ; Paris, Pp : 432-447.
- Mégraud, F. (1994). Méthodes diagnostiques directes et indirectes de *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 18: 217-222.
- Messens, W., Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs-a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 72 : 31-43.
- Metlef, S., Dilmi-Bouras, A. (2009). Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Nature et Technologie*, 01 : 33 – 44.
- Moonn, J., Reinboldg, W. (1976). Commensalism and competition in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, *J. Milk Food Technol.*, 39: 337-341.
- Morisset, D., Berjeaud, J.M., Frère, J., Héchard, Y. (2005). Bactériocines de bactéries lactiques In *Bactéries lactiques et probiotiques*(Ed. Corrieu, G., Luquet, F.M). Ed. Tec et Doc-Lavoisier ; Paris Pp : 113-173

- Nguyen-the, C., Carlin, F. (2005). *Bacillus cereus*, In *Bactériologie alimentaire*. (Ed. by Federighi, M), Ed. Economia ; Paris, Pp : 128-144 .
- Onda, T., Yanagida, F., Tsuji, M., Shinohara, T., Yokotsuka, K. (2003). Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste. *Int. J. Food Microbiol.*, 87 (1-2) : 153-159.
- Oulkheir, S., Ounine, K., Elhaloui, N., Attarassi, B. (2006). Survie d'*Escherichia Coli* dans des conditions acides. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 145 : 41-52.
- Rodgers, S. (2003). Potential applications of protective cultures in cook-chill catering. *Food Control*, 14 (1) : 35-42.
- Rodgers, S. (2004). Novel approaches in controlling safety of cook-chill meals. *Trends Food Sci. Technol.*, 15: 366- 372.
- Roy, D. (2001). Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Int. J. F. Microbiol.*, 69 (3) : 167-182.
- Salminen, S., Von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., Vos, W.M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics - a review. *Int. J. F. Microbiol.*, 44 (1-2): 93-106.
- Scriban, R. (1999). *Biotechnologie*, 5ème édition. Ed. Tec et Doc ; Paris, 1042p.
- Servin, A.L., Coconnier, M.H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best practice research clinical gastroenterology*, 17 (5) : 741-54.
- Singleton, P. (1999). *Bactériologie*. Ed. Dunod ; Paris, Pp : 304.
- Song, H.J., Richard, J. (1997). Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *Int. J. Food Microbiol.*, 36 (2) : 155-161.
- Stiles, M.E., Holzappel, W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36 (1) : 1-29.
- Sutra, L., Federighi, M., Jouve, J.L. (1998). *Manuel de bactériologie alimentaire*. Ed : *Polytechnica* ; Paris, Pp : 31-249.
- Tabak, S., Bensoltane, A. (2012). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastro-duodénales, *Nature et Technologie*, 06 : 71-79.

- Terzaghi, B. E., Sandine, W. E. (1975). Improved media for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 29 : 807 – 813.
- Thabaut, A., Meyran, M. (1985). Nouvelles Bêta lactamines : Essai de classification. Relation structure - Activité. *Path. Biol.*, 33 (5 bis) : 469 - 472.
- Vignolo, G., Palacios, J., Farias, M.E., Sesma, F., Schillinger, U., Holzapfel, W. Guillermo Oliver1 (2000). Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.*, 41 : 410-416.
- Vuyst, L., Vandamme, E.J. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria London: academic and professional. Pp.91-146.
- Yang, R., Johnson, M.C., Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 3355–335.
- Yao, A.A., Egounlety, M., Kouame, L.P., Thonart, P. (2009). Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l’Afrique de l’Ouest : leur utilisation actuelle. *Ann. Méd. Vét.*, 153 : 54-65.
- Yateem, A., Balba, M.T., AL-Surrayai, T., Al-Mutairi, B. and Al-Daher, R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Science*, 3 (4): 194-99.

Annexes

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

➤ Milieux solides

Milieu	Composition
MRS (Man, Rogosa et Sharpe, 1960)	Peptone.....10.0 g
	Extrait de viande.....8.0 g
	Extrait de levure..... 4.0 g
	Glucose.....20.0 g
	Acétate de sodium5.0 g
	Citrate d'ammonium.....2.0 g
	Tween 80.....1.0 cm ³
	KH ₂ PO ₄2.0 g
	MgSO ₄0.2g
	MnSO ₄0.05g
	Agar.....10.0 g
	Eau distillée.....1000ml
	pH=6.2
Autoclavage : 121°C /15min	

Milieu	Composition
Mueller-Hinton (Muller et Hinton, 1941)	Extrait de viande.....2 g
	Hydrolysate acide de caséine.....17.5 g
	Amidon.....1.5 g
	Gélose.....10 g
	Agar.....17g
	Eau distillée.....1000ml
	pH=7,4
	Autoclavage :115°C /15 min

Milieu	Composition
M17 (Trezaghi et Sandine, 1975)	Extrait de levure 2.5g
	Extrait de viande5g
	Peptone de caséine2.5g
	Peptone de viande 2.5g
	Lactose.....5g
	Peptone de soja5g
	Acide ascorbique0.5g
	B-glycérophosphate de sodium19g
	Agar20 g
	Sulfate de magnésium 0.25g
	Eau distillée1000 ml
	pH=7.2
	Autoclavage : 121°C /15min.

Milieu	Composition
Gélose nutritive (Singleton, 1999)	Peptone10 g
	Extrait de viande5 g
	Chlorure de sodium.....5 g
	Gélose.....15 g
	Eau distillée.....1000ml
	pH=7,2
Autoclavage : 120°C / 20 min	

Milieu	Composition
Hektoen (Joffin et Leyral,2006)	Protéose-peptone.....12 g
	Extrait de levure.....3 g
	Chlorure de sodium.....5 g
	Thiosulfate de sodium.....5 g
	Sels biliaires.....9 g
	Citrate de fer ammoniacal.....1.5 g
	Salicine......2 g
	Lactose.....12 g
	Saccharose.....12 g
	Fuschine acide.....0.1 g
	Bleu de bromothymol.....65 mg
	Gélose.....13 mg
	Eau distillée.....1000ml
	pH=7.6
	Stériliser par 5 min d'ébullition (ne pas autoclaver)

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

➤ Milieux liquides

Milieu	Composition
MRS (Man, Rogosa et Sharpe, 1960)	Peptone.....10.0 g
	Extrait de viande.....8.0 g
	Extrait de levure.....4.0 g
	Glucose.....20.0 g
	Acétate de sodium5.0 g
	Citrate d'ammonium.....2.0 g
	Tween 80.....1.0 cm ³
	KH ₂ PO ₄2.0 g
	MgSO ₄0.2g
	MnSO ₄0.05g
	Eau distillée.....1000ml
	pH=6.2
	Autoclavage : 121°C /15minutes

Milieu	Composition
M17 (Trezaghi et Sandine, 1975)	Extrait de levure2.5g
	Extrait de viande 5g
	Peptone de caséine2.5g
	Peptone de viande2.5g
	Peptone de soja5g
	Acide ascorbique0.5g
	B-glycérophosphate de sodium 19g
	Sulfate de magnésium 0.25g
	Eau distillée1000 ml
	pH=7.1
	Autoclavage : 121°C /15min.

Milieu	Composition
Bouillon nutritif (Singleton, 1999)	Peptone.....10 g
	Extrait de viande5 g
	Chlorure de sodium.....5 g
	Eau distillée.....1000ml
	pH=7.2
	Autoclavage : 120°C / 20 min

Milieu	Composition
lait (Candia)	- Eau
	- poudre de lait écrémé
	- Matière grasse laitière

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

Coloration de Gram	
Technique	Résultats
-Réaliser le frottis et le fixer. -Colorer au violet de gentiane (cristal) phénolé durant environ 1 min. -Laver à l'eau distillée (ou du 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 du 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 (objectifx100) et à pleine lumière.	Les bactéries à Gram positif apparaissent violettes et les bactéries Gram négatif sont roses .

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).

Tests	Résultats	
	Négatif	Positif
ONPG	Incolore	Jaune(et coloration jaune légère)
ADH	Jaune	Rouge /Orange ²
LDC		
ODC		
CIT	Vert pale/Jaune	Bleu-Vert/ bleu (dans la cupule)
H₂S	Incolore/ grisâtre	Dépôt noir /fin liseré
URE	Jaune	Rouge/Orange
TDA¹	Jaune	Marron-rougeâtre
IND¹	Incolore Vert pale/jaune	Rose
VP¹	Incolore	Rose/rouge (après 10 min, noter négatif)

¹. Ajout de réactifs pour la lecture de ces tests ; ² Une couleur orange après 36 à 48 heures 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
GEL	Pas de diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Bleu/ bleu-vert Jaune ²	Jaune ²
MAN		
INO		
SOR		
PHA		
SAC		
MEL		
AMY		
ARA		
OX		

1. Tests GLU à ARA :réactions de fermentation/oxydation des sucres.
2. La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, L'oxydation commence dans la cupule.

Annexe IV: Standardisation 0.5 Mac Farland

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 précipitent pour former une solution de turbidité reproductible (**Forbes et al., 1998**).

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.

Formule approximative par 100 ml d'eau purifiée

BaCl₂ (0.048M).....0.5ml

H₂SO₄ (0.18M).....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 6×10^7 à 6×10^8 UFC/ml.
- Longueur d'onde: 625 nm

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

➤ Cinétique de croissance des bactéries pathogènes

Temps (h)	<i>E. cloacae</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
0	0.105	0.101	0.093
2	0.265	0.149	0.128
4	0.399	0.366	0.223
6	0.465	0.499	0.312
24	0.573	0.661	0.522
26	0.581	0.643	0.521
28	0.578	0.639	0.506

➤ Résultats de pH et l'acidité de six ferments lactiques

Temps (h)	0	2	4	6	24
Acidité (D°)	18	19	21	22	51
pH	6.62	6.60	6.52	6.39	4

➤ Résultats de pH et l'acidité de *Lactobacillus helveticus*

Temps (h)	0	2	4	6	24
Acidité (D°)	19	21	21	22	62
pH	6.72	6.63	6.53	6.49	4.7

➤ Cinétique de croissance des bactéries lactiques

Temps (h)	0	2	4	6	8	24	26
Six ferments lactiques	0.102	0.135	0.156	0.210	0.225	0.224	0.209
<i>L. helveticus</i>	0.100	0.171	0.183	0.208	0.226	0.265	0.284

➤ Zone d'inhibition en (mm) de l'antagonisme sur milieu solide

Bactéries lactiques		Bactéries pathogènes	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. cloacae</i>
Six ferments lactiques	Surnageant non neutralisé		2	3	0
	Surnageant neutralisé		0	0	0
<i>L. helveticus</i>	Surnageant non neutralisé		0	0	0
	Surnageant neutralisé		0	0	0
Acide	HCl		11	13	12
Témoin	Eau distillée		0	0	0

➤ Antagonisme des deux produits lactiques probiotiques vis à vis des bactéries pathogènes

Temps (h)		Bactéries pathogènes	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E. cloacae</i>
0			0.08	0.96	0.110
2			0.115	0.135	0.270
4			0.169	0.315	0.405
6			0.233	0.496	0.462
8	Surnageant de Six ferments		0.315	0.487	0.414
	surnageant neutralisé de Six ferments		0.260	0.441	0.409
	surnageant de <i>L. helveticus</i>		0.332	0.464	0.432
	surnageant neutralisé de <i>L. helveticus</i>		0.328	0.435	0.452
	HCl		0.365	0.300	0.434
10	Surnageant de Six ferments		0.327	0.497	0.397
	surnageant neutralisé de Six ferments		0.244	0.451	0.447
	surnageant de <i>L. helveticus</i>		0.318	0.462	0.403
	surnageant neutralisé de <i>L. helveticus</i>		0.326	0.460	0.460
	HCl		0.348	0.470	0.432

Résumé

Ce travail consiste à montrer l'existence de l'effet antagoniste entre deux ferments lactiques probiotiques lyophilisés commercialisés, (l'un est un mélange de six bactéries lactiques et l'autre est composé de *Lactobacillus helveticus*) et des espèces pathogènes en recherchant les facteurs inhibiteurs produits par ces bactéries lactiques ; qui peuvent être des acides organiques, ou des bactériocines.

Trois bactéries pathogènes ont été purifiées et identifiées, qui appartiennent aux espèces suivantes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Enterobacter cloacae*.

L'effet antagoniste est réalisée par deux méthodes : la méthode de diffusion par des disques a conduit à l'apparition des zones d'inhibition dont le diamètre est de 03 mm pour *Bacillus cereus* et 02 mm pour *Pseudomonas aeruginosa*, et 00mm pour *Enterobacter cloacae* et la méthode d'interaction dans le milieu liquide par mesure de la densité optique. Les résultats obtenus montrent que les deux produits lactiques probiotiques ont un effet bactériostatique sur les bactéries pathogènes.

Mots clés : Ferments lactiques probiotiques, souches pathogènes, activité antagoniste, bactériocine.

Summary

This work has shown the existence of the antagonistic effect between two freeze-dried probiotic lactic products,(one is a mixture of six lactic acid bacteria and the other is composed of *Lactobacillus helveticus*) and pathogenic species by searching for the inhibiting factors produced by these lactic acid bacteria; which may be organic acids, or bacteriocins.

Three pathogenic bacteria were purified and identified, which belong to the following species: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* and *Enterobacter cloacae*.

The antagonistic effect was realized by two methods: the disc diffusion method which led to the appearance of zones of inhibition with a diameter of 03 mm for *Bacillus cereus* and (02 mm) for *Pseudomonas aeruginosa* and 00mm for *Enterobacter cloacae* and the method of interaction in the liquid medium by measurement of optical density. The results obtained show that the two probiotic lactic products have a bacteriostatic effect on the pathogenic bacteria.

Key words: Probiotic lactic fermenting, pathogenic strains, antagonistic activity, bacteriocin.

ملخص

يتمثل هذا العمل في تبيين وجود تأثير فعل تضادي لمنتوجين تجاريين لبنيين و معززات حيوية مجففين (أحدهما خليط من ستة بكتريا لبنية والآخر يتكون من *Lactobacillus helveticus*) و البكتريا المسببة للأمراض من خلال البحث عن وجود العوامل المثبطة المنتجة من طرف هذه البكتريا اللبنية. والتي قد تكون الأحماض العضوية، أو المواد مضادة للبكتيريا.

تم تنقية وتحديد ثلاث سلالات بكتيرية المسببة للأمراض و التي تنتمي إلى الأنواع التالية: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* و *Enterobacter cloacae*.

تم تحقيق تأثير الفعل التضادي بطريقتين: طريقة الانتشار بواسطة الأقراص التي أدت إلى ظهور مناطق تثبيط التي يبلغ قطرها 03 ملم ل *Bacillus cereus* و 02 ملم ل *Pseudomonas aeruginosa* و 00 ملم ل *Enterobacter cloacae* ، وطريقة التداخل في الوسط السائل عن طريق قياس الكثافة الضوئية. وأظهرت النتائج أن كلا المنتوجين التجاريين اللبنيين له تأثير كابح لنمو البكتيريا.

كلمات البحث: مخمرات لبنية ، بكتيريا مسببة للأمراض ، الفعل التضادي، بكتيريوسين.