



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريش

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi- B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Intitulé :

**Impact des fructo-oligosaccharides (FOS) sur l'activité
antibactérienne des souches *Leuconostoc*, isolées du lait cru d'espèce
Cameline**

Présenté par : ABBAS Imen

AMARA Chahra

Soutenu publiquement le : 17/ 09/ 2019

Devant le jury :

Président :	M ^f SADRATI Nouari	MA A	(Université de BBA)
Encadrant :	M ^{me} BOUGUERRA Asma	MA A	(Université de BBA)
Examineur :	M ^f MERIBAI Abdelmalek	MC B	(Université de BBA)

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Allah qui nous avons a donné la patience, la volonté et le courage pour finir ce mémoire.

Nous tenons à exprimer nos plus chers et vifs remerciements à:

M^m.BOUGUERRA Asma Pour nous avoir encadrées, en nous faisant bénéficier de ses connaissances, de son aide et de ses conseils.

Mr. SADRATI Nouari de nous faire l'honneur de présider le jury.

Dr. MERIBAI Abdelmalek pour avoir accepté de participer au jugement de ce mémoire.

Nos remerciements s'adressent aussi

A tous les membres du Laboratoire de Microbiologie Appliquée.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à

Ma mère

Mon père

Mes chers frères et sœurs

À toute ma famille surtout à mes amies qui ce

Reconnaitrons

Mon binôme

Tous les étudiants de la promotion Microbiologie Appliqué

2018/2019

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A mes parents que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A mes frères et leurs familles, mes sœurs ; Nabila et ses enfants ; Sabira.

A mes deux méces Amira et Khaoula, mon petit frère Walid.

Sans oublié ma grande mère Baya et à toute la famille « ABBAS »

*A mes chères amis Chocho , Chaima , Ibtissem , Zouina , Houda , Zohra , Fouzia, et Hanen
et à l'exception « Zohir et Mohamed ».*

A mon binôme plutôt ma sœur « Chahra AMARA »

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

IMANE

Résumé

L'impact des fructo-oligosaccharides sur l'antagonisme des souches appartenant au genre *Leuconostoc* vis-à-vis des bactéries pathogènes : (*Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Escherichia coli* ATCC: 25922, et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC : 27853) a été exploré en appliquant le test des spots sur agar. L'activité antibactérienne a été déterminée après culture des bactéries sur un milieu contenant 2% de dextrose (bouillon MRS) et sur un autre supplémenté de 2% de FOS. Dans les deux milieux, les souches étaient plus actives contre *E. coli* suivi de *P. aeruginosa*. Tandis que l'effet inhibiteur a été moindre contre *S. aureus*.

L'inhibition d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* a diminué très significativement lorsque les bactéries sont développées dans un milieu contenant le FOS avec des diamètres de 18.25 ± 2.48 mm et 14.33 ± 4.59 mm respectivement. Par ailleurs, aucun changement de l'effet inhibiteur est noté contre *S. aureus* soit en absence ou en présence de FOS (10.14 ± 2.99 mm et 9.70 ± 2.70 mm respectivement).

On conclue qu'en suivant la méthode des spots sur agar, les fructo-oligosaccharides n'améliore pas les propriétés inhibitrices des leuconostocs.

Mots clés : Activité antibactérienne, FOS, *Leuconostoc*, Prébiotiques, Probiotiques.

Abstract

The impact of fructo-oligosaccharides on the antagonism of strains belonging to the genus *Leuconostoc* against pathogenic bacteria: (*Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Escherichia coli* ATCC: 25922, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC: 27853) was studied by applying the spot test on agar. Antibacterial activity was determined after bacterial culturing on a medium containing 2% dextrose (MRS broth) and on another supplemented with 2% FOS. In both media, strains were more active against *E. coli* followed by *P. aeruginosa*. While the inhibitory effect was less against *S. aureus*.

Inhibition of *E. coli* and *P. aeruginosa* has decreased very significantly where bacteria are developed in a medium containing FOS with diameters of 18.25 ± 2.48 mm and 14.33 ± 4.59 mm respectively. However, no change in the inhibitory effect is noted against *S. aureus* either in the absence or presence of FOS (10.14 ± 2.99 mm and 9.70 ± 2.70 mm respectively).

It is concluded that by following the spot method on agar, fructo-oligosaccharides do not improve the inhibitory properties of leuconostocs.

Keywords: Antibacterial activity, FOS, *Leuconostoc*, Prebiotics, Probiotics.

تم دراسة تأثير الفركتو-أليغوساكريد (FOS) على الخصائص التثبيطية لبكتيريا ممرضة (*Staphylococcus aureus* ATCC :25923) من طرف سلالات تنتمي إلى جنس *leuconostoc* (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC :27853، و *Escherichia coli* ATCC:25922) باستعمال تطبيق اختبار البقعة على الأجار، بعد زراعتها في وسطين مختلفين الأول يحتوي الأول على الغلوكوز بنسبة 2 % (MRS مرق) والآخر على 2% من FOS. أثبتت النتائج أن النشاطية المضادة للبكتيريا الممرضة كانت متماثلة في الوسطين، حيث أن التثبيط كان عاليا ضد *E.coli* متبوعا بـ *P.aeruginosa*. بينما التأثير المثبط أقل ضد *S.aureus*. تثبيط *E.coli* و *P.aeruginosa* تأثر بشكل كبير للغاية عندما نمت البكتيريا في وسط FOS بأقطار تثبيط : 2.48 ± 18.25 ملم و 4.59 ± 14.33 ملم على الترتيب في حين، لم يلاحظ أي تأثير في التأثير المثبط ضد *S.aureus* سواء في غياب أو في وجود FOS (2.99 ± 10.14 ملم و 2.70 ± 9.70 ملم). خلصت هذه الدراسة إلى أنه واتباع طريقة البقع على الأجار الفركتو-أليغوساكريد (FOS) لتحسن الخصائص المثبطة للـ *leuconostoc*

الكلمات المفتاح: نشاط مضادات البكتيريا، FOS، *Leuconostoc*، البروبيوتيك، البروبيوتيك.

Sommaire

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Les prébiotiques	2
1.1. Définition	2
1.2. Classes des prébiotiques	2
1.3. Critères de sélection	4
1.4. Mode d'action	5
1.5. Effets des prébiotiques	6
1.5.1. Effets positifs	6
1.5.2. Effets indésirables	6
Chapitre II : Les probiotiques	8
2.1. Historique	8
2.2. Définition	8
2.3. Les microorganismes à potentiel probiotique	8
2.4. Critères de sélection des souches probiotiques	9
2.5. Effets des probiotiques	10
Chapitre III : <i>Leuconostoc</i>	12
3.1. Définition	12
3.2. Habitat	13
3.3. Classification	13
3.4. Métabolisme	13
3.5. Rôles	14
3.6. <i>Leuconostoc</i> comme agent d'altération	16
3.7. L'activité antimicrobienne de <i>Leuconostoc</i>	16
Partie expérimentale	
Matériels et Méthodes	17
1. Matériels	17
1.1. Appareillage	17
1.2. Produits chimiques	17
1.3. Matériel biologique	17
2. Méthodes	18
2.1. Revivification des souches	18
2.2. Vérification de la pureté des souches	18
2.3. Conservation des souches	18
2.4. Recherche in vitro de l'activité antibactérienne des souches lactiques en absence du prébiotique (FOS)	18
2.5. Recherche in vitro de l'activité antibactérienne des souches lactiques en présence du prébiotique (FOS)	19
Traitement statistiques des résultats	19
3. Résultats et discussion	20
1. Examen de la pureté des souches testées	20
2. Détermination de l'activité antibactérienne des souches de <i>Leuconostoc</i> en absence de FOS	21
3. Détermination de l'activité antibactérienne des souches de <i>Leuconostoc</i> en présence de FOS	24
4. Comparaison entre l'inhibition des bactéries pathogènes par les souches lactiques cultivées en absence ou en présence de FOS	26
Conclusion	27
Références bibliographiques	28

Liste des tableaux

Tableau 1: Microorganismes probiotiques les plus importants à usage humain (Huys et <i>al.</i> , 2013)	9
Tableau 2: Critères de sélection d'organismes probiotiques (Markowiak et Śliżewska, 2017).	10
Tableau 3: Inhibition des bactéries pathogènes par les souches lactiques en absence de FOS.	23
Tableau 4: Inhibition des bactéries pathogènes par les souches lactiques en présence du FOS.	25

Liste des figures

Figure 1: Structure des fructooligosaccharides (Guimarães Luis Henrique, 2012)	3
Figure 2: Structure chimique de l'inuline (Atia, 2016)	3
Figure 3: Structure du galacto-oligosaccharides (Recart-Conort , 2015)	4
Figure 4: Aspect macroscopique des colonies de <i>Leuconostoc</i> cultivées sur le milieu MRS.....	20
Figure 5: observation microscopique des cellules de <i>Leuconostoc</i> grossissement (× 100) après une coloration de Gram.	20
Figure 6: Activité antagoniste de certaines souches de <i>Leuconostoc</i> en absence de FOS vis-à-vis des bactéries pathogènes.....	21
Figure 7: Moyennes des diamètres d'inhibition obtenus par des souches de <i>Leuconostoc</i> contre les trois bactéries pathogènes en absence de FOS.....	22
Figure 8: Activité antagoniste de certaines souches de <i>Leuconostoc</i> en présence du FOS contre les bactéries pathogènes	24
Figure 9: Moyennes des diamètres d'inhibition obtenus par des souches de <i>Leuconostoc</i> contre les trois bactéries pathogènes en présence du FOS	25

Abréviations

ATCC	American type culture collection
BHI	Brain Heart Infusion
FAO	Food and Agriculture Organization
FOS	Fructo-oligosaccharides
IgA	Immunoglobuline A
IMO	Isomaltooligosaccharides
GOS	Galactooligosaccharides
L.	<i>Lactobacillus</i>
Ln.	<i>Leuconostoc</i>
m /v	masse /volume
MRS	Man Rogosa Sharp
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pH	Potentiel d'hydrogène
SCFA	Short chain fatty acids
sp.	Espèce non précisée
TOS	Transgalactooligosaccharides
U.F.C	Unité Formant Colonie
W.	<i>Weisella</i>

Introduction

Il y a un siècle, Elie Metchnikoff a affirmé que les bactéries lactiques offraient des bénéfices pour la santé conduisant à une plus grande longévité, dans le but de restaurer la microflore intestinale *via* la consommation des laits fermentés. Ces organismes microscopiques bénéfiques sont appelés aujourd'hui ; les probiotiques.

Ces derniers sont des microorganismes vivants qui peuvent être intégrés dans différents types de produits alimentaires et pharmaceutiques, et qui sont capables de contribuer positivement à l'activité de la microflore intestinale et, par conséquent, à la santé du consommateur (Benguier et *al.*, 2015).

Parmi les microorganismes utilisés comme probiotiques chez l'homme, les bactéries lactiques qui jouent un rôle très important dans l'industrie alimentaire et dans le domaine thérapeutique, et possèdent une capacité inhibitrice vis-à-vis de nombreuses bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Ababsa,2012).

En réalité, ces microorganismes ne doivent pas seulement être vivants au moment de l'ingestion, mais aussi être capables de survivre dans le tractus digestif. La maintenance de cette viabilité au niveau intestinal fait appel à des substances de nature polysaccharidiques qui sont considérées eux même comme additifs alimentaires et qui sont agréés sous le nom de prébiotiques. Parmi les prébiotiques les plus utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, il y a les fructanes (FOS), l'inuline et l'oligofructose (Kirtzalidou et *al.*,2011).

Les Fructo-oligosaccharides sont des oligomères, sont produits par hydrolyse d'inuline ou par synthèse à partir de sucrose ou de lactose, qui font partie des substances dites prébiotiques, c'est-à-dire qui favorisaient la prolifération des bactéries probiotiques. (Larouci ,2013).

Dans ce contexte, se situe l'objectif de la présente étude, qui s'intéresse à l'évaluation de l'effet des fructooligosaccharides sur l'activité antibactérienne d'un exemple de souches probiotiques appartenant au genre *Leuconostoc* préalablement isolées du lait cru d'espèce Cameline..

Chapitre I : Les prébiotiques

1.1. Définition

Le terme prébiotique a été récemment introduit par Gibson et Roberfroid en 1995. Il désigne un ingrédient alimentaire non digestible par l'hôte qui, après sa métabolisation par des microorganismes dans l'intestin, module la composition et /ou l'activité du microbiote intestinal, conférant ainsi un effet physiologique bénéfique sur l'hôte, en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité de certaines bactéries du côlon comme par exemple les bifidobactéries (Conway, 2001 ; Tamime, 2005).

Certains prébiotiques sont naturellement présents dans des aliments en particulier dans le blé, les oignons, l'ail, les bananes, et d'autres sont ajoutés dans des aliments à visées fonctionnelles ou dans des suppléments alimentaires (Van Loo et *al.*, 1999).

L'association des prébiotiques et probiotiques est courante et porte le nom de symbiotique (Furtado, 2009)

Selon Van Immerseel et *al.* (2003), un prébiotique doit présenter certaines caractéristiques qui sont :

- Des composantes de la ration indigestibles pour l'hôte et non-métabolisées quand elles passent le long de la partie supérieure du tractus digestif, de sorte qu'elles peuvent atteindre la flore au niveau du caecum et du côlon.
- Ces mêmes produits doivent nécessairement servir de substrat pour une ou plusieurs espèces bactériennes.
- Tout ceci doit nécessairement induire une modification de la composition de la flore, améliorant ainsi l'état de santé de l'hôte.

1.2. Classes des prébiotiques

Les prébiotiques les plus connus qui sont déjà utilisés : les fructanes (fructooligosaccharides (FOS) et inuline) et d'autres oligosides de galactose et transgalactose (GOS et TOS).

De nombreux autres glucides pourraient revendiquer l'appellation de prébiotiques (xylooligosaccharides(XOS), isomaltooligosaccharides(IMO), glucooligosaccharides...etc.) (Rambaud et *al.*, 2004).

Les prébiotiques sont classés selon la taille de la molécule ou suivant leur origine végétale, naturelle ou synthétique et selon leurs structures chimiques (Van immerseel *al.*, 2003 ; Gibson et *al.*, 2004).

α -D-Glu [-(1→2)- β -D-Fru] n, n = 2-4 Kestose Nistose Fructofuranosyl nystose

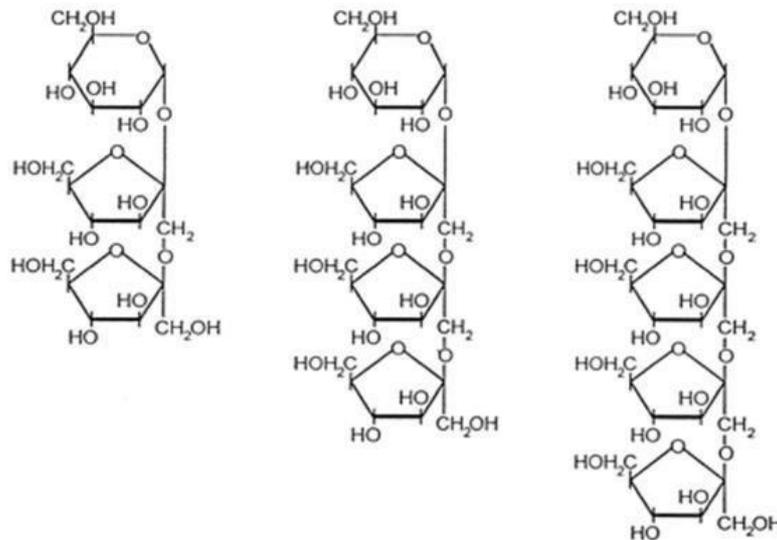


Figure 1: Structure des fructooligosaccharides (Guimarães Luis Henrique, 2012).

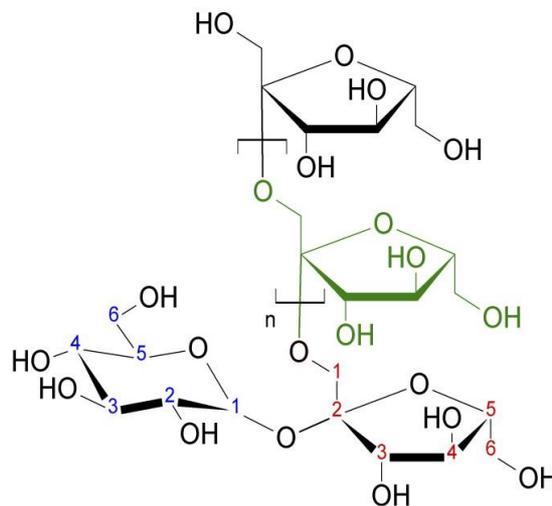


Figure 2 : Structure chimique de l'inuline (Atia, 2016)

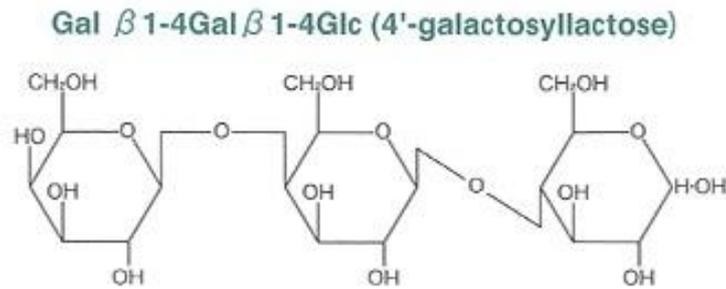


Figure 3 : Structure du galacto-oligosaccharides. (Recart-Conort, 2015).

1.3. Critères de sélection

Pour qu'un substrat diététique soit sélectionné comme étant prébiotique, il doit présenter ces trois caractéristiques :

❖ Résistance à l'acidité gastrique

Les prébiotiques doivent résister à l'hydrolyse acide dans l'estomac, aux enzymes digestives et à l'absorption intestinale afin d'être délivrés intacts dans le côlon.

❖ Fermentation par la microflore intestinale

Les substances qui sont définies comme prébiotiques doivent être métabolisés par des bactéries commensales de l'intestin.

❖ Stimulation sélective de la croissance et de l'activité métaboliques des bactéries intestinales

La dose de prébiotique ingérée quotidiennement n'induit des effets que de façon faiblement dose-dépendante. Ces effets sont plutôt liés au sujet et sont en particulier positivement corrélés à la quantité des bifidobactéries présentes dans la flore fécale avant le début de traitement (Roberfroid, 2007).

1.4. Mode d'action

Les effets prébiotiques ont été principalement dirigés vers le côlon, mais de nombreuses études démontrent que les prébiotiques exercent leur effet au-delà du tractus gastro-intestinal.

En plus de la stimulation sélective des microorganismes bénéfiques dans le microbiote intestinal, ils peuvent directement stimuler l'immunité, se protéger contre les agents pathogènes, faciliter le métabolisme et la meilleure absorption des minéraux (Delphine et *al.*, 2009).

- Stimulation sélective des bactéries bénéfiques

Les prébiotiques permettent une augmentation du nombre de bactéries intestinales bénéfiques indigènes telles que les bifidobactéries et les lactobacilles et diminuent la présence des bactéries potentiellement pathogènes (Delphine et *al.*, 2009).

- Les modifications de SCFA (Short chain fatty acids) affectent l'immunomodulation et le métabolisme de l'hôte

Une fois fermentés par les bactéries intestinales, les prébiotiques ont la capacité de baisser le pH dans la lumière intestinale et de rendre le milieu plus difficilement vivable pour les pathogènes tout en stimulant la production des mucines grâce à la production de SCFA (Delphine et *al.*, 2009).

Les prébiotiques stimulent certaines voies métaboliques en particulier celles qui mènent à la synthèse de SCFA. Ils facilitent le métabolisme des graisses et augmentent l'absorption des ions (notamment le fer, le calcium et le magnésium). Ils permettent aussi de stimuler l'immunité de l'hôte par la production de cytokines et d'IgA (Delphine et *al.*, 2009).

- Prébiotiques anti-adhésifs

Les prébiotiques empêchent sélectivement l'adhésion de certaines espèces bactériennes en limitant les sites de liaison aux cellules épithéliales. Ils peuvent agir comme une proie pour les récepteurs cellulaires de l'intestin qui se lient à l'agent pathogène (Delphine et *al.*, 2009).

1.5. Effets des prébiotiques

1.5.1. Effets positifs

La consommation régulière des prébiotiques entraîne une modulation de l'équilibre entre les populations bactériennes dominantes du microbiote colique, ce qui influe favorablement sur le fonctionnement de l'intestin.

Ils peuvent ainsi avoir des effets bénéfiques sur la prévention et le traitement des désordres gastro-intestinaux par :

- Réduction de la prévalence et de la durée des diarrhées infectieuses associées à l'utilisation des antibiotiques.
- réduction de l'inflammation et les symptômes associés aux maladies inflammatoires de l'intestin.
- exercer des effets protecteurs pour prévenir le cancer du côlon,
- améliorer la biodisponibilité et l'absorption des minéraux y compris le calcium, le magnésium et le fer.
- abaisser certains facteurs de risque cardiovasculaires,
- prévenir l'obésité.
- diminution le taux de lipides sanguins.
- immunomodulation du système immunitaire intestinal.
- contrôle glycémique et hormones intestinal.
- diminution des bactéries pathogènes.
- diminution significative de la diarrhée, vomissement et la fièvre (Gibson et *al.*, 2010; Slavin, 2013).

1.5.2. Effets indésirables

Les prébiotiques peuvent cependant provoquer des effets indésirables liés à la dose qui n'est pas été métabolisée. Ils exercent un effet osmotique dans la lumière intestinale, négativement corrélé à leur poids moléculaire, ce qui augmente le débit d'eau dans l'intestin et pouvant ainsi induire les borborygmes, des douleurs abdominales et éventuellement de la diarrhée et prendre leur origine dans l'intestin grêle ou du côlon (Rambaud, 2004).

Synthèse bibliographique

Ainsi, la fermentation des prébiotiques peut induire des émissions excessives des gaz rectaux, mais qui va par contre supprimer la diarrhée puisque cela va permettre de diminuer l'effet osmotique (Rambaud, 2004)

La dose ingérée ainsi que le mode de consommation influencent la fréquence de ces symptômes. De plus, la susceptibilité à ressentir des effets indésirables est très variable d'un sujet à l'autre. Cela pourrait s'expliquer par une sensibilité viscérale propre à chacun et par des différences de profil bactérien du microbiote intestinal. Néanmoins, la sévérité des symptômes rapportés est généralement modérée et n'entraîne aucun risque pour la santé (Rambaud, 2004).

Chapitre II : Les probiotiques

2.1. Historique

Il y a près d'un siècle, Elie Metchnikoff, scientifique, prix Nobel de 1908 et professeur à l'Institut Pasteur à Paris, était le premier à être convaincu de l'intérêt pour la santé des bactéries lactiques. Il a ainsi élaboré un régime alimentaire à base de lait fermenté par une bactérie : « Bacille bulgare ». Après ses recherches, le scientifique a affirmé que les bactéries synthétisant de l'acide lactique offraient des bénéfices pour la santé conduisant à une plus grande longévité (Anandharaj et al., 2014)

Le concept "probiotique" fut introduit en 1965 par Lilly et Stillwell; par contraste avec les antibiotiques (Arora et al., 2012)

2.2. Définition

Le terme probiotique dérive des deux mots grecs "*pros*" et "*bio*" qui signifient littéralement "pour la vie" contrairement au terme antibiotique signifiant "contre la vie". Selon la définition actuellement adoptée par la FAO et l'OMS; « les probiotiques sont des microorganismes vivants administrés en quantités adéquates et qui sont bénéfiques pour la santé de l'hôte » (Fijan, 2014).

2.3. Les microorganismes à potentiel probiotique

Les espèces probiotiques sont des principales composantes de la flore intestinale. En alimentation humaine, les genres microbiens les plus utilisés comme probiotiques sont : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Par contre, en alimentation animale de nombreux genres bactériens et fongiques sont utilisés, comme *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* et *Torulopsis*.

Les principales espèces incorporées dans les produits probiotiques sont représentées dans le tableau (01).

Synthèse bibliographique

Tableau 1: Microorganismes probiotiques les plus importants à usage humain (Huys et al., 2013).

Les bactéries lactiques		Les bactéries non lactiques		Les levures
Les lactobacilles	Les bifidobacteries	Les cocci		Saccharomyces
<i>L. acidophilus</i>	<i>Bf. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>L. brevis</i>	<i>Bf. animalis subsp. lactis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>S. cerevesiae</i>
<i>L. casei</i>	<i>Bf. bifidum</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Bc. coagulans</i>	
<i>L. crispatus</i>	<i>Bf. breve</i>	<i>Str. thermophilus</i>	<i>Bc. clausii</i>	
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>Bf. longum subsp. infantis.</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Bc. pumilus</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>Bf. longum subsp. longum</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<i>Propionibacterium</i>	
<i>L. gasseri</i>		<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Pr. acidipropionici</i>	
<i>L. helveticus</i>		<i>Ln. mesenteroides subsp. cremoris</i>	<i>Pr. Freudenreichii subsp. shermanii</i>	
<i>L. johnsonii</i>		<i>Oenococcus oenie</i>	<i>Pr. Jenseniid</i>	
<i>L. lactis</i>		<i>Pediococcus</i>	<i>Escherichia coli Nissle 1917</i>	
<i>L. paracasei</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>		
<i>L. plantarum</i>		<i>Pd. pentosaceus</i>		
<i>L. reuteri</i>				
<i>L. rhamnosus</i>				
<i>L. salivarius</i>				
<i>L. gallinarum</i>				

2.4. Critères de sélection des souches probiotiques

Pour être sélectionnées en tant que probiotiques chez l'homme, les souches microbiennes doivent posséder certaines propriétés fonctionnelles, sécuritaires et technologiques.

Les différents critères de sélection sont résumés dans le tableau (2).

Tableau 2: Critères de sélection d'organismes probiotiques (Markowiak et Ślizewska, 2017).

Critères de sécurité	Critères fonctionnels	Critères technologiques
-Identification de la souche -Innocuité -Origine	Survie au cours du transit digestif -Adhésion aux cellules intestinales et/ou au mucus -Colonisation -Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé	-Résistance aux bactériophages -Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini. -Facilité de culture -Absence de propriétés organoleptiques indésirable

2.5. Effets des probiotiques

Plusieurs effets bénéfiques, sur la microflore intestinale, le système immunitaire et la santé de l'être-vivant en général, ont été associés à la consommation des probiotiques.

- 1- Prévention et/ou réduction de la durée et des plaintes de diarrhée induite par le rotavirus ou associée à un antibiotique, ainsi que soulagement des plaintes dues à une intolérance au lactose.
- 2- Réduction de la concentration des enzymes favorisant le cancer et/ou des métabolites putréfiant dans l'intestin.
- 3- Prévention et soulagement des plaintes non spécifiques et irrégulières du tractus gastro-intestinal chez des personnes en bonne santé.
- 4- Effets bénéfiques sur les aberrances microbiennes, l'inflammation et autres troubles liés aux maladies inflammatoires du tube digestif, à l'infection d'*Helicobacter pylori* ou à la prolifération bactérienne.
- 5- Normalisation de la consistance des selles et des selles qui passent chez les sujets souffrant de constipation ou de côlon irritable.
- 6- Prévention ou atténuation des allergies et des maladies atopiques chez les nourrissons.

Synthèse bibliographique

7- Prévention des infections des voies respiratoires (rhume, grippe) et d'autres maladies infectieuses, ainsi que traitement des infections urogénitales.

Il existe des preuves insuffisantes ou tout au plus préliminaires en ce qui concerne la prévention du cancer, un effet dit hypocholestérolémiant, l'amélioration de la flore buccale et la prévention de la carie ou la prévention ou le traitement des cardiopathies ischémiques ou l'amélioration des maladies auto-immunes (telles que l'arthrite) (De Vrese et Schrezenmier, 2008).

Chapitre III : *Leuconostoc*

Les bactéries lactiques constituent le groupe le plus utilisé dans les produits probiotiques à consommation humaine. Par ailleurs, l'emploi du genre *Leuconostoc* comme probiotique reste très limité.

3.1. Définition

Le genre *Leuconostoc* a été défini par Van Thieghem en 1878; ce terme vient du mot « Nostoc » qui est une algue bleue mucilagineuse et de « Leuco » qui veut dire blanc (Devoyod et Poullain, 1988).

Les leuconostocs se présentent sous forme de cellules sphériques immobiles, non pigmentées souvent lenticulaires après culture sur gélose, regroupées par deux ou en chaînes. En milieu saccharosé, les chaînes de cocci sont entourées d'une gaine bien distincte à l'examen microscopique: gaine qui rappelle à celle des Nostocs (Devoyod et Poullain, 1988). Plusieurs milieux de culture sont utilisés pour l'enrichissement et l'isolement des leuconostocs tels que: MRS, Rogosa SL, milieu jus de tomate, glucose-extrait de levure, gélose à l'acétate, Gélose de MAYEUX, SANDINE et HELLIKER-Grosseron, etc. Le choix de tel milieu dépend de l'habitat à partir duquel leurs espèces sont isolées (De Vos et *al.*, 2009).

Les leuconostocs sont des cocci à Gram-positif, catalase-négatif, hétéro-fermentaires, aéro-anaérobies facultatives, asporulées, sphériques, mésophiles, elles ne sont pas des bactéries acidophiles, le pH optimum de croissance est compris entre (6 et 7), certaines peuvent croître à pH de 4.5.

La température optimale de croissance se situe entre 20°C et 30°C mais certaines sont capables de croître à 5°C., ils ne sont pas hémolytiques ni pathogènes (Ogier et *al.*, 2008 ; De Vos et *al.*, 2009).

Elles produisent l'acide lactique comme l'un des principaux produits finaux de la fermentation du sucre, et dans beaucoup de cas, elles produisent du dextrane à partir du sucrose (De Vos et *al.*, 2009).

La sélection de *Leuconostoc* est facilitée par l'utilisation de la vancomycine dans le milieu de croissance, puisque toutes les espèces de *Leuconostoc* sont intrinsèquement résistantes à la vancomycine (Ogier et *al.*, 2008)

3.2. Habitat

Les leuconostocs sont naturellement présents sur les végétaux, en particulier la betterave à sucre. On les retrouve dans de nombreux laits fermentés et fromages fabriqués à partir du lait cru de vache, brebis ou chèvre (Devoyod et Poullain, 1988).

Les espèces couramment trouvées dans le lait et les fromages fabriqués au lait cru sont les espèces : *Ln. mesenteroides*, avec les sous-espèces *dextranicum* et *mesenteroides*, puis *Ln. citreum* (Cibik et al., 2000).

Leuconostoc n'est généralement pas considéré comme faisant partie de la flore humaine bien que des souches ont été isolées à partir de déchets humains, des échantillons vaginaux et des échantillons de lait maternel (Hemme et Foucaud - Scheunemann, 2004).

3.3. Classification

Le genre *Leuconostoc* appartient au phylum des *Firmicutes*, la classe des *Bacilli*, l'ordre des *Lactobacillales*, la famille des *Leuconostocaceae* (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004; De Vos et al., 2009).

Il comprend, 11 espèces ; *Ln. mesenteroides* étant l'espèce type, incluant trois sous espèces pour cette dernière (*mesenteroides*, *dextranicum* et *cremoris*) (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004 ; De Vos et al., 2009).

On a utilisé les caractères phénotypiques et génotypiques pendant longtemps pour isoler et caractériser les leuconostocs et parfois pour faire la distinction entre des espèces ou sous-espèces.

3.4. Métabolisme des leuconostocs

Les leuconostocs sont les seules bactéries en forme de cocci à avoir un métabolisme hétérofermentaire : dans des conditions micro-aérophiles, le glucose est converti en des quantités équimolaires de D (-) lactate, d'éthanol et de CO₂ par l'intermédiaire d'une combinaison d'hexose-monophosphate (6-P-gluconate) et par la voie des pentoses phosphates. Toutefois, en présence d'oxygène, des souches de *Leuconostoc* utilisent NADH-oxydases et NADH-peroxydases comme mécanismes alternatifs pour régénérer le NAD. L'acétate, au lieu de l'éthanol, et le double de la quantité d'ATP

sont produits. Le fructose est fermenté par toutes les espèces de *Leuconostoc* sauf *Leuconostoc subsp. cremoris* et certaines souches de *Leuconostoc argentinum* (Timothy et Kieran, 1994 ; Hemme et Foucaud- Scheunemann, 2004 ; De Vos et al., 2009).

3.5. Rôles

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt biotechnologique. Elles sont largement utilisées dans des procédés d'élaboration des produits alimentaires. En industrie laitières, les bactéries du genre *Leuconostoc* jouent un rôle important grâce à leurs propriétés métaboliques, principalement la production de CO₂ et la synthèse des composés aromatiques tel que le diacétyl (Bourel et al., 2001)

3.5.1. Rôle dans la technologie laitière

- Amélioration de la structure du fromage par la production de CO₂

La production du CO₂ par l'espèce de *Leuconostoc mesenteroides* provient de l'hétéro-fermentation du lactose et de l'utilisation de citrate. Dans la technologie des fromages à pâtes persillées notamment le Roquefort, le CO₂ produit est à l'origine de formation des cavités dans le caillé qui seront ensuite colonisées par le *Penicillium requoforti* (Bourel et al., 2001).

- Utilisation des *Leuconostocs* comme des levains d'arôme

Le diacétyl dont le citrate est le précurseur constitue le principal composé aromatique recherché dans les produits laitiers. Cependant d'autres composés issus de l'hétéro-fermentation de deux espèces *Ln. mesenteroides* et *Ln. lactis* tels que l'acétate et éthanol contribuent à la texture et à la saveur de ces produits laitiers (Bourel et al., 2001).

- Usage de *Leuconostoc* comme exhausteur de goût

Une petite quantité d'acétaldéhyde est reconnue comme participant à l'obtention d'un bon arôme; par contre un excès ou une surproduction de ce composé qui peut être produit par les ferments dans le beurre et les laits fermentés, par rapport au diacétyl provoque un défaut dit de vert ou d'acre. Ce défaut peut être enrayé par l'emploi de souches principalement par *leuconostoc mesenteroides subsp cremoris* qui métabolisent l'acétaldéhyde (Vedamuthu, 1994; Hemme et Foucaud -Scheunemann, 2004).

3.5.2. Rôle des leuconostocs dans les aliments

Un aliment fonctionnel est un aliment qui comprend un composant bénéfique pour la santé ou aide à prévenir et lutter contre les maladies. Cela inclut l'ajout de probiotique et la production des métabolites antimicrobiens.

- Utilisation de *Leuconostoc* comme probiotique

Comme certains microorganismes qui sont actuellement proposé aux consommateurs, les leuconostocs ne colonisent pas l'intestin, donc leur effet sur l'hôte devait être faible sauf en cas d'ingestion à des concentrations cellulaires élevées. Des études montres que les leuconostocs peuvent être utilisés pour la lutte contre les diarrhées au cours de la consommation des aliments qui les contiennent (Hemme et Foucaud - Scheunmann, 2004).

- Hydrolyse de α -galactosides

Les α -galactosides comme la stachyose et le raffinose ne sont pas métabolisés par l'homme ou par l'animal à cause de l'absence de l'enzyme responsable « α -galactosidase» dans la muqueuse intestinal, entraînant par conséquent une flatulence. Afin d'éviter ces inconvénients et stimuler la consommation des produits alimentaires hautement nutritifs, plusieurs tentatives faites pour éliminer les α -galactosides en utilisant quelques méthodes comme l'addition de l'enzyme α -galactosidase.

Il a été proposé utiliser *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* qui possède l'enzyme α -galactosidase comme approche biotechnologique pour éliminer α -galactosides (Prévost et al., 1993 ; Hemme et Foucaud - Scheunmann, 2004)

-Production des vitamines

La souche de *Leuconostoc mesenteroides* productrice des quantités importantes des ménaquinones (vitamine K2) est été utilisé comme des starters dans les produits alimentaires notamment les produits laitiers ou comme des suppléments diététiques afin de prévenir et de lutter contre les maladies de cancer en vitamine K (Morishita et al., 1999). Actuellement, la production de folate (vitamine B9) a été rapporté dans *Ln. lactis* , *W. paramesenteriodes* (Sybesma et al., 2003; Hemme et Foucaud -Scheunmann, 2004).

3.6. *Leuconostoc* comme agent d'altération

Les leuconstocs ont été associés à des défauts de présentation, gonflement, de certaines variétés de fromages (Devoyod et poullain ,1988).

Leuconostoc mesenteroides et *L.citrovorum* qui peuvent produire des amines biogènes qui peuvent provoquer des intoxications alimentaires comme cela a été rapporté dans les vins (Moreno et *al.*, 2003).Elles provoquent des altérations dans les boissons sucrées et les sirops (Ogier et *al.*, 2008).

3.7. L'activité antimicrobienne de *Leuconostoc*

Pour accroître la sécurité et la durée de vie d'un produit, les bactéries lactiques sécrètent des métabolites à fin d'inhiber les microorganismes indésirables.

La capacité de *Leuconostoc spp.* à promouvoir la sécurité et la qualité des aliments est liée aux acides organiques excrétés et à la baisse du pH et beaucoup d'autres composés antimicrobiens tels que le CO₂, le diacétyl et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), et les bactériocines qui sont actuellement utilisées dans les produits alimentaires fermentés, tels que les produits laitiers, les poissons, les légumes, ou les viandes (Jeppesen et Hans,1993 ; De Vos et *al.*,2009)

1- Matériel

1.1. Appareillage

- Centrifugeuse
- Etuve
- Vortex
- pH mètre
- Loupe binoculaire
- Balance de précision
- Microscope optique
- Plaque chauffante

1.2. Produits chimiques

Colorants :

- Colorants de la réaction de Gram: (fuchsine, violet de gentiane, lugol).

Milieux de culture :

MRS (bouillon et gélose), BHI (gélose, molle, bouillon)

Autres : Alcool, Peptones, Extrait de viande, Acétate de sodium, Extrait de levure, Citrate d'ammonium, Tween 80, Sulfate de magnésium heptahydraté, Sulfate de manganèse tetrahydraté, Agar, FOS.

1.3. Matériel biologique

Neuf souches de bactéries lactiques ont été obtenues à partir du laboratoire de Microbiologie appliquée, université Ferhat Abbas -Sétif- Algérie. Ces souches appartiennent à M^{me} BOUGUERRA qui les a isolées du lait camelin et identifiées comme *Leuconostoc sp.*

Les codes suivants ont été attribués aux souches lactiques : MR3, MR4, MS4, MR5, MR6, MR7, MR8, MS11 et MS12.

Les souches de références (pathogènes) utilisées sont: *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. Ces bactéries font partie de collection ATCC importées par l'institut Pasteur d'Algérie (IPA).

2. Méthodes

1. Revivification des souches

Les souches lactiques ont été obtenues à partir du laboratoire de Microbiologie appliquée -Université de Sétif 1- dans des tubes eppendorfs contenant chacun une culture bactérienne conservée dans le bouillon MRS additionné de 30% de glycérol et maintenue à -20°C. Un volume de 100µl de chaque tube a été transféré dans le bouillon MRS puis incubé à 30°C. Après 24 à 48h, les souches lactiques se développent ce qui indique leur réactivation.

NB. Il est à noter qu'avant chaque manipulation, la réalisation d'un deuxième repiquage est nécessaire.

2. Vérification de la pureté des souches

La pureté des souches bactérienne a été vérifiée par examens macroscopique et microscopique. Tout d'abord, chaque culture bactérienne a étéensemencée par stries sur le milieu MRS solide et incubée à 30°C pendant 24h.à l'aide d'une loupe binoculaire, une observation de l'aspect des colonies a été faite. L'homogénéité des colonies a été confirmée après description de la forme, le type de Gram ainsi que l'arrangement cellulaire de chaque souche par la coloration de Gram.

3. Conservation des souches

La conservation à court terme de toutes les souches a été réalisée dans des tubes contenant la gélose MRS inclinée et maintenues à 4°C.

4. Recherche in vitro de l'activité antibactérienne des souches lactiques en absence du prébiotique (FOS)

L'activité antibactérienne de *Leuconostoc* contre les trois souches pathogènes a été mise en évidence par un test d'antagonisme direct qui est le test des spots sur agar. Il est basé sur le principe que des substances inhibitrices peuvent diffuser dans un milieu de culture solide et interférer avec la croissance d'une souche cible préalablement inoculée dans le milieu; l'action de ces substances se manifeste alors par l'apparition des zones d'inhibition.

- Les souches lactiques sont repiquées dans 5 ml de bouillon MRS et incubées à 30°C pendant 16-18h.

Matériel et Méthodes

- Des volumes d'environ 2µl de chaque culture jeune ont été déposés sur des boîtes contenant la gélose MRS et incubés à 30°C pendant 24h.
- Environ 10⁶UFC/ml de chaque souche pathogène cultivée sur bouillon BHI (37°C-16h) ont été transférés vers des tubes contenant 10 ml de la gélose BHI molle et fondue.
- Après une légère agitation, le contenu de chaque tube a été versé dans des boîtes contenant les spots des bactéries lactiques.
- Après solidification de la surcouche, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h
- L'inhibition de la souche pathogène (indicateur) se traduit par la formation des zones claires autour du spot.
- Le diamètre d'inhibition (mm)= le diamètre à partir du centre- diamètre du spot (Hernandez et *al.*, 2005; Fazeli et *al.*, 2007; Maragkoudakis et *al.*, 2006).

5. Recherche in vitro de l'activité antibactérienne des souches lactiques en présence du prébiotique (FOS)

La mise en évidence de l'effet des FOS sur l'activité antibactérienne des souches lactiques a été faite en suivant les mêmes étapes du test précédent (test du spot sur agar) seulement les souches ont été cultivées sur un bouillon MRS modifié contenant 2% de FOS au lieu de glucose et incubées pendant 16 à 18h à 30°C (Brink et *al.*, 2006).

Traitement statistique des résultats

Les résultats obtenus des tests réalisés sont exprimés en moyennes ± sd de deux répétitions et traités par l'analyse de variance (Anova) suivi par le test de Tukey. La comparaison entre les activités antibactériennes en présence ou en absence de FOS a été faite par le test de Student par le logiciel SPSS statistics 25. Le seuil de signification de 0.05 est retenu.

3. Résultats et discussion

1. Examen de la pureté des souches lactiques

Après ensemencement des cultures bactériennes sur la surface sèche de la gélose MRS et incubation à 30°C pendant 24h, toutes les colonies apparaissent homogènes, de moyennes à grandes tailles, arrondies et blanchâtres ; Ce qui indique leur pureté (fig.4).

La confirmation de la pureté des souches lactiques a été faite après coloration de Gram.

Toutes les souches sont des cocci à G+, leurs cellules sont arrangées par paire ou en chaînette (fig.5).

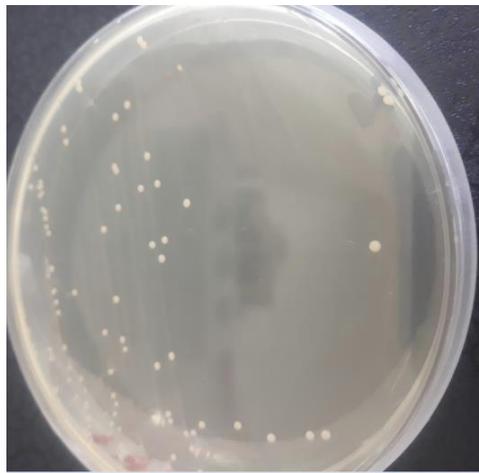


Figure 4: Aspect macroscopique des colonies *Leuconostoc* cultivées sur milieu MRS.

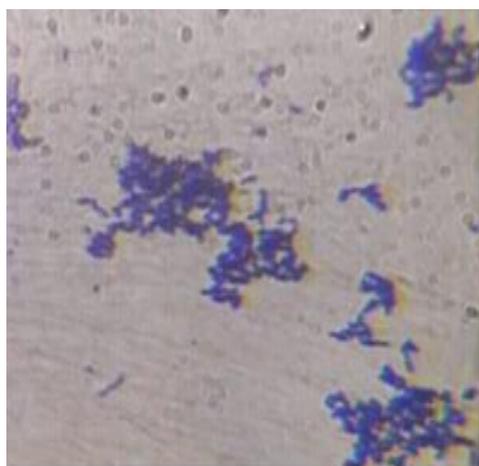


Figure 5: Aspect microscopique des *Leuconostoc* agrandissement (G×100) après coloration de Gram.

2. Détermination de l'activité antibactérienne des souches de *Leuconostoc* absence de FOS

Pour déterminer l'activité antagoniste des bactéries lactiques, plusieurs méthodes peuvent être utilisées. Dans cette étude, le test des spots sur agar a été employé car il est simple et donne l'effet antibactérien total des LAB sans exclure l'influence d'un facteur (Polak-Berecka et al., 2009).

Toutes les souches de *Leuconostoc* ont été testées pour leurs effets antibactériens contre les souches suivantes: *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.

Après application du test, tous les spots bactériens ont été entourés par une zone claire, ce qui indique la présence d'une activité inhibitrice exercée par toutes les souches de *Leuconostoc* vis-à-vis de toutes les souches indicatrices. La figure 6 montre l'activité antagoniste de certaines souches de *Leuconostoc* cultivées sur MRS vis-à-vis les bactéries indicatrices.

La figure 7 résume les moyennes des diamètres d'inhibition obtenus par les souches de *Leuconostoc* contre les trois souches pathogènes.

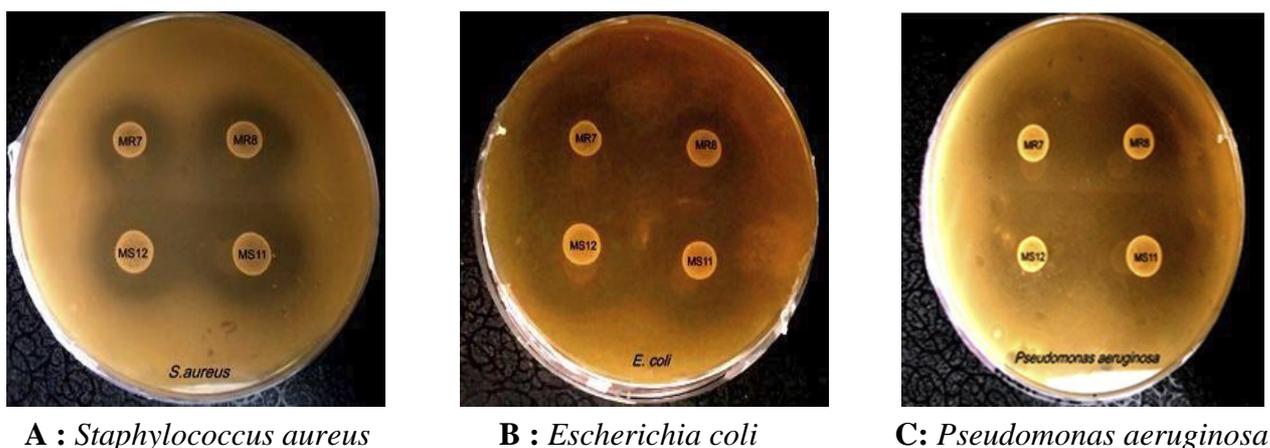


Figure 6: Activité antagoniste de certaines souches de *Leuconostoc* en absence de FOS vis-à-vis des bactéries pathogènes.

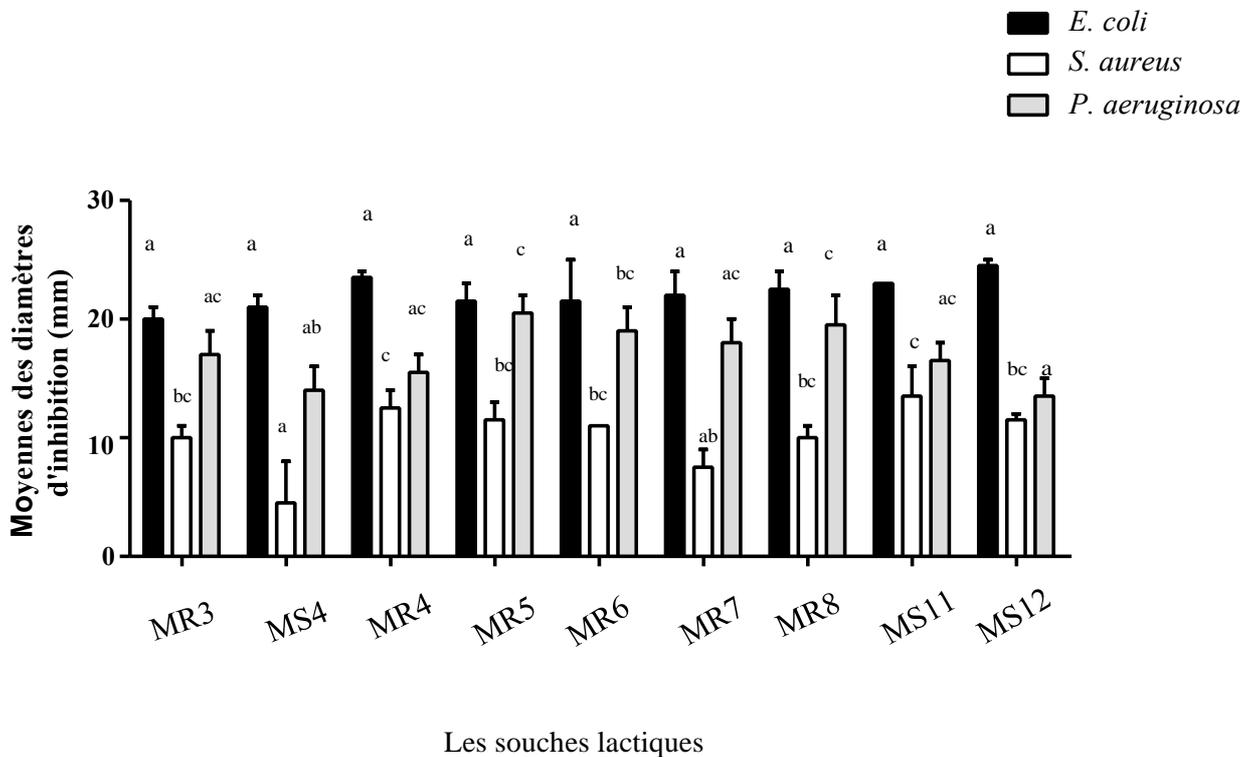


Figure 7: Moyennes des diamètres d'inhibition obtenus par des souches de *Leuconostoc* contre les trois bactéries pathogènes en absence de FOS.

Les barres d'erreur représentent les écarts-types des valeurs moyennes des résultats de deux répétitions
a, ab, ac, bc : Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0.05$) (Anova).

D'après les résultats montrés dans la figure 7, il s'avère que toutes les souches ont le même niveau d'inhibition d'*E. coli*. Les diamètres d'inhibition varient entre 20 ± 1 mm par MR3 et 24.33 ± 0.57 mm par MS12. Ces résultats sont en accord avec ceux mentionnés par Bellil (2013) qui a testé des souches de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait camélin contre *Escherichia coli* ATCC 8739 et il a trouvé que les diamètres varient entre (11 et 28 mm). Par ailleurs, Chentouf et Benmechernene (2016), ont trouvé des valeurs faibles de 3.3 ± 0.09 et 5.8 ± 0.05 mm en appliquant le même test. Les résultats obtenus sont meilleurs que ceux rapportés par Bouguerra (2012) (13 ± 2 et 16.5 ± 0.5 mm).

Il existe une différence très hautement significative ($p = 0.0002$) entre les valeurs obtenues par les souches lactiques testées contre *S. aureus* et la souche MS11 avait le diamètre le plus élevé de 13.33 ± 2.51 mm. Par ailleurs la souche MS4 n'a pas un grand effet inhibiteur avec un diamètre de 4.5 ± 3.5 mm. Ces valeurs sont comparables à celles mentionnées par Bouguerra (2012) (7 ± 00 - 13.16 ± 0.76 mm). Par ailleurs, Bellil (2013) a trouvé des valeurs plus élevées de (17 à 28 mm).

Résultats et discussion

L'effet inhibiteur vis-à-vis *P. aeruginosa*, diffère très significativement ($p=0.001$) d'une souche à un autre avec un diamètre minimum de 13.5 ± 1.5 mm obtenu par MS12 et un autre maximum de 20.5 ± 1.5 mm obtenu par MR5.

Le tableau ci-dessous montre les moyennes des diamètres d'inhibition des bactéries pathogènes par les souches testées.

Tableau 3: Inhibition des bactéries pathogènes par les souches lactiques en absence de FOS.

Souche pathogènes	Moyenne des diamètres d'inhibition \pm sd
<i>E. coli</i>	22.07 ± 1.84 ^c
<i>P. aeruginosa</i>	17.05 ± 2.80 ^b
<i>S. aureus</i>	10.14 ± 2.99 ^a

a, b, c Les moyennes avec des lettres différentes dans le même rang sont significativement différentes ($p<0.05$) (Anova).

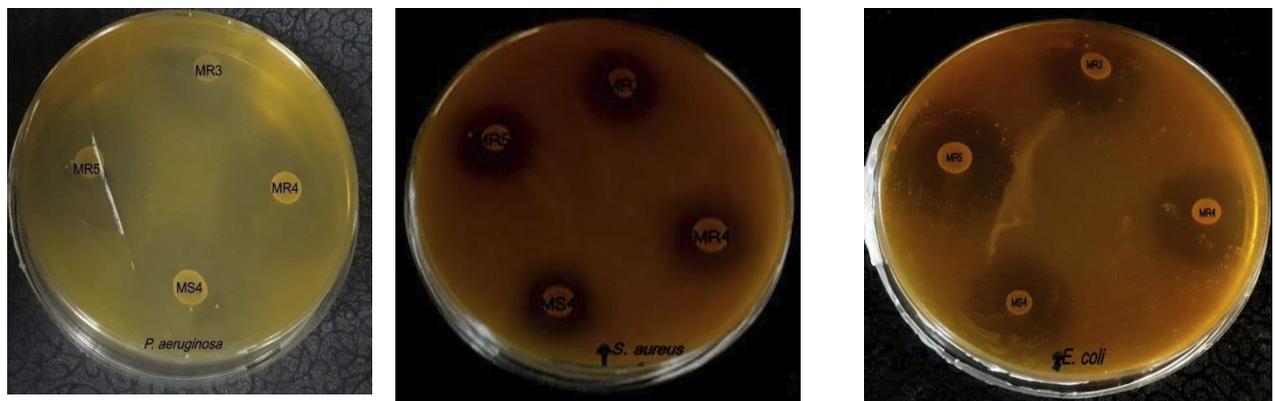
D'après le tableau, il apparaît que l'effet inhibiteur des souches lactiques diffère très significativement contre les trois souches pathogènes. Une meilleure inhibition a été obtenue contre *E. coli* suivi par *P. aeruginosa*. Tandis que l'effet a été moindre sur *S. aureus*. Fguiri et al. (2017) ont trouvé que tous les isolats lactiques du lait camelin testés ont montré une activité antibactérienne plus élevée contre *Escherichia coli* ATCC 38218.

Comme les autres bactéries lactiques, l'activité antibactérienne de *Leuconostoc* à l'encontre des bactéries pathogènes peut être associée à l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques citant par ex : (production des acides organiques, H_2O_2 , bactériocines, diacétyl...etc. (Bouguerra, 2012).

On peut noter aussi que nos souches étaient plus actives contre les bactéries à Gram négatif. Ceci concorde avec les résultats de Yateem et al. (2008), Bouguerra (2012) et Jrad et al. (2013). Il a été rapporté que les leuconostocs sont capables d'inhiber les bactéries pathogènes aérobies par la production de CO_2 qui crée un environnement anaérobie. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut perturber sa perméabilité et inhiber les enzymes de décarboxylation et les bactéries à Gram négatif sont les plus sensibles au CO_2 que les bactéries à Gram positif (Salminen et al., 2004 ; Bouguerra, 2012).

3. Détermination de l'activité antibactérienne des souches de *Leuconostoc* en présence de FOS

Après culture de 16 à 18h de toutes les souches sur un bouillon MRS-glucose supplémenté de 2% de FOS et application des mêmes étapes du test précédent, tous les spots bactériens ont été entourés par une zone claire, ce qui indique que toutes les souches de *Leuconostoc* cultivées sous ces conditions sont actives. La figure ci-dessous montre les zones d'inhibition obtenues par certaines souches et la figure 9 résume les moyennes des diamètres d'inhibition de toutes les souches testées.



A : *Pseudomonas aeruginosa*

B : *Staphylococcus aureus*

C : *Escherichia coli*

Figure 8: Activité antagoniste de certaines souches de *Leuconostoc* en présence du FOS contre les bactéries pathogènes.

Résultats et discussion

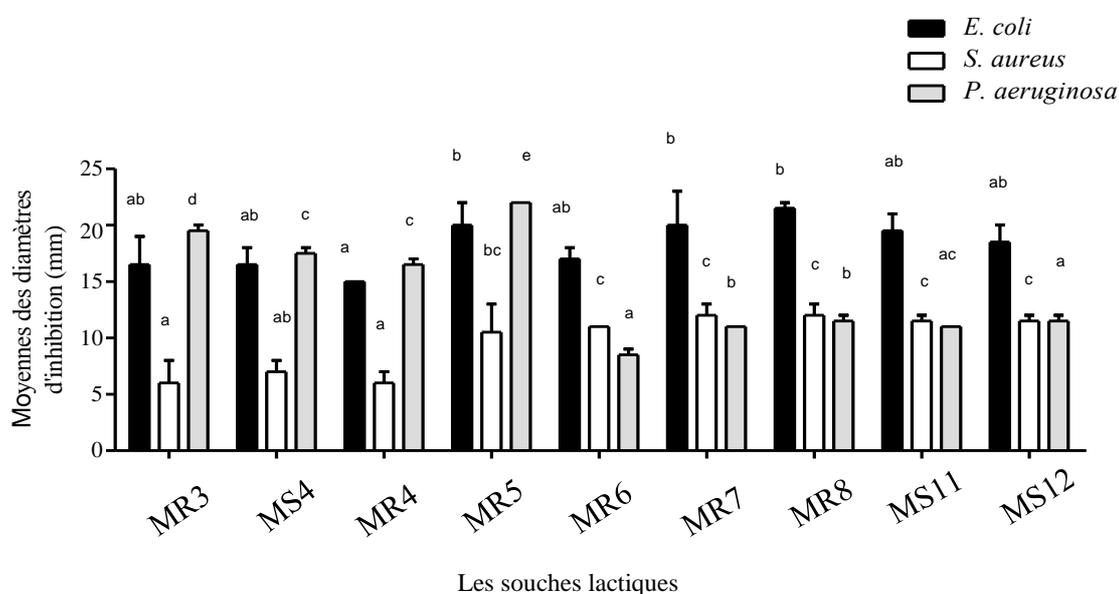


Figure 9: Moyennes des diamètres d'inhibition obtenus par des souches de *Leuconostoc* contre les trois bactéries pathogènes en présence du FOS.

Les barres d'erreur représentent les écarts-types des valeurs moyennes des résultats de deux répétitions
a, ab, ac, b, bc, d, e : Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0.05$) (Anova).

La différence entre les diamètres d'inhibition de *E. coli* est très significative ($p = 0.004$) variant de 15mm et 21.33mm obtenus par MR4 et MR8 respectivement.

Les souches inhibent différemment *S. aureus* ($p < 0.0001$). MR3, MR4 et MS4 ont des diamètres faibles (6 ± 2 mm), (6 ± 1 mm) et (7 ± 1 mm) par rapport aux autres souches qui ont des valeurs moyennes de 10.33 ± 2.51 mm par MR5 et 12 ± 1 mm par MR7 et MR8.

Il y a une différence très hautement significative ($p < 0.0001$) entre les valeurs d'inhibition de *P. aeruginosa* qui varient de (8 ± 1 et 22 mm) obtenues par les souches MR6 et MR5 respectivement.

Tableau 4: Inhibition des bactéries pathogènes par les souches lactiques en présence du FOS.

Souche pathogènes	Moyenne des diamètres d'inhibition \pm sd
<i>E. coli</i>	18.25 ± 2.48^c
<i>P. aeruginosa</i>	14.33 ± 4.59^b
<i>S. aureus</i>	9.70 ± 2.71^a

a, b, c Les moyennes avec des lettres différentes dans le même rang sont significativement différentes ($p < 0.05$) (Anova).

En comparant les résultats du tableau 4 avec ceux du tableau 3, on constate que les niveaux d'inhibition obtenus lorsque les souches sont cultivées en présence du prébiotique ne sont pas changés c-à-d, la souche la plus sensible était *E.coli* suivie par *P. aeruginosa* et enfin *S. aureus*.

4. Comparaison entre l'inhibition des bactéries pathogènes par les souches lactiques cultivées en absence ou en présence de FOS

La comparaison entre les moyennes des diamètres d'inhibition des trois souches pathogènes en présence ou en absence du FOS a été faite par le test de student (les résultats de l'analyse sont montrés dans l'annexe).

En comparant les valeurs obtenues suite au changement des conditions de culture, il apparait que le prébiotique utilisé (FOS) n'a aucun effet sur l'inhibition de *S. aureus*. Par ailleurs, une diminution très significative de l'inhibition d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* a été notée chez les cultures qui sont développées sur les bouillons contenant le FOS.

Dans la littérature, il existe peu d'études sur l'effet des prébiotiques sur l'activité antibactérienne des probiotiques *in vitro* et aucune étude sur ceux isolés du lait de chamelle. Meremäe et al. (2010) ont mentionné l'inhibition de la croissance de toutes les souches de *Campylobacter jejuni* incubées en co- culture avec *L. acidophilus* additionné de 1 % d'inuline ou 1 % d'oligofructose et les bifidobactéries combinés avec 1 % d'oligofructose.

Brink et al. (2006) ont trouvé que la culture des souches *Lactobacillus plantarum* 423, *Lactobacillus casei* LHS, *Lactobacillus salivarius* 241, *Lactobacillus curvatus*DF 38 et *Pediococcus pentosaceus*34 en présence de Raftilose® Synergy1, Raftilose® L95 et Raftiline® GR n'a pas entraîné une augmentation de l'activité antimicrobienne contre des souches à G+ et à G- par rapport à celle obtenue par les cultures bactérienne sur l'MRS.

Conclusion

Conclusion

Le prébiotique est un composé chimique notamment apparenté aux fibres alimentaires. Il peut s'agir d'oligosaccharides par exemple, des petites molécules sucrées, qui vont durant leur transit intestinal servir de source d'énergie pour les bactéries et donc stimuler l'activité et certaines populations bactériennes de nos intestins.

Pour cela, cette étude a été réalisée afin de déterminer l'effet *in vitro* des fructo-oligosaccharides qui est un prébiotique sur l'activité antibactérienne des souches probiotiques appartenant au genre *Leuconostoc* par le test des spots sur agar. Les résultats obtenus, indiquent que les FOS entraînent une diminution significative de l'activité antibactérienne des souches lactiques contre des bactéries pathogènes et d'altération à Gram négative qui sont : *Escherichia. coli* et *Pseudomonas. aeruginosa* sans affecter celle de *Staphylococcus aureus*.

La présente étude n'est qu'une contribution primordiale, très partielle, sur l'influence des FOS sur l'antagonisme des probiotiques. Le sujet, relatif à l'influence des prébiotiques (y compris les FOS), *in vitro*, sur l'antagonisme des probiotiques est mal élucidé, voir controversé. Dans la littérature, très peu de données scientifiques sont disponibles.

En perspectives, il est souhaitable de compléter l'étude par des investigations plus approfondies, notamment par réalisation des tests suivants :

- Détermination des effets, *in Vitro* et *in Vivo*, d'une gamme plus large des prébiotiques sur l'antagonisme des souches probiotiques
- Recherche de production des molécules bioactives et des bactériocines
- Optimisation des conditions de production des éventuels bactériocines
- Extraction, caractérisation de l'éventuelle molécule bioactives

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Ababsa, A. (2012). *Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait*. Mémoire de magister. Université Ferhat Abbas- Sétif.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B. et Parveen Rani, R.. (2014). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Hypercholesterolemia. *Chinese Journal of Biology*. vol. 2014, Article ID 572754, 7 pages
- Arora N., Singh Kamaljit.,Garg Tarun.(2012).Probiotic :as effective treatment of disease.*International research journal of pharmacy* 3(1):96-101.
- Atia, A. (2016). *Développement d'une matrice prébiotique pour l'encapsulation des probiotiques bactériocinogènes, destinée à l'alimentation animale*. Thèse de doctorat en sciences et technologie des aliments. Université de Laval.
- Bellil, Y. (2013). *Evaluation de l'effet des substances antimicrobiennes produites par Leuconostoc mesenteroides du lait cru de chamelle sur Listeria spp*. Thèse de doctorat, Université D'Oran Es-senia
- Benguiair R., Benaraba R., Riazi A. (2015). Effet de l'extrait de caroube sur la croissance de deux candidats probiotiques : Lactobacillus fermentum et Lactobacillus rhamnosus). *Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, n° 13, Pages 22 à 27.
- Bouguerra A. (2012). *Caractérisation des bactéries lactiques du lait de chamelle*. Mémoire de magister. Université Ferhat Abbas, Sétif.
- Bourel, G., Henini, S., Krantar, K., Oraby, M., Diviès, C., Garmyn, D. (2001). Métabolisme sucre-citrate chez Leuconostoc mesenteroides. *Le Lait*, INRA Editions, 81 (1-2), pp.75-82.
- Brink, M., Todorov, S.D., Martin, J.H., Senekal, M. et Dicks, L.M. (2006) .The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. *Journal of Applied Microbiology*. 100(4):813-20 .
- Chentouf, H. F. et Benmechene Z. (2016). Isolation and identification of *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk. *African Journal of Microbiology Research*, 7(23), 2961-2969.
- Cibik, R., Lepage, E. et Tailliez, P. (2000). Molecular Diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* Isolated from Traditional French Cheeses as Revealed by RAPD Fingerprinting, 16S rDNA Sequencing and 16S rDNA Fragment Amplification. *System. Appl. Microbiol.* 23, 267-278.
- Conway, P.L. (2001). Prebiotics and human health: The state-of-the-art and future Perspectives. *Journal homepage*: 45(1):13-21
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B. (2009). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* Second Edition Volume Three: The Firmicutes. Springer Dordrecht Heidelberg, USA.
- De vrese, M., Schrezenmeir J. (2008). Probiotics, prebiotics ,and synbiotics. *Adv biochem Engin/biotechnol* 111:1-66.
- Delphine MA Saulnier., Jennifer K Spinler., Glenn R Gibson., Jzmes Versalovic.(2009).Mechanisms of probiosis and prebiosis : considerations for enhanced functional foods. *J.copbio*.20(2):135-141.

Références bibliographiques

- Devoyod J.J., Poullain Françoise. (1988). Les Leuconostocs. Propriétés : leur rôle en technologie Laitière. *Le Lait*, INRA Editions, 68 (3), pp.249-279.
- Fazeli, M. R., Amirmozafari, N., Golbooi nejad, R., Jamalifar, H. (2007). Antagonistic action of watermelon juice probioticated using different strains of lactobacilli against Salmonella typhimurium. *Iranian J Publ Health*, 36:70-73.
- Fguiiri, I., Ziadi, M., Rekaya, K., Arroum, S., et Khorchani, T. (2017). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria Strains from Raw Camel Milk for Potential Use in the Production of Yogurt. *Food Science & Nutrition*, 3(3), 1-8.
- Fijan, S. (2014). Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11:4745-4767.
- Furtado, M. (2009). Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota, and Obesity. *Journal of Bariatric Times* 6(11):27-30.
- Gibson, G. R.; Probert, H. M.; Loo, J. V.; Rastall, R. A.; Roberfroid, M. B. (2004) Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Updating the Concept of Prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17 (2), 259.
- Gibson, G.R., Scott, K.P, Rastall, R.A, Tuohy, K.M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A. et al. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin; Functional Foods* 7(1):1-19.
- Guimarães Luis Henrique, S. (2012). Carbohydrates from biomass: sources and transformation by microbial enzymes, p.441-458.
- Hemme, D., Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods: a review. *International Dairy Journal* 14, 467-494.
- Hernandez, D., Cardell, E., Zarate, V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 77-84.
- Huys, G., Botteldoorn, N., Delvigne, F., De Vuyst, L., Heyndrickx, M., Pot, B., et al. (2013). Microbial characterization of probiotics-Advisory report of the Working Group « 8651 Probiotics » of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(8):1479-504
- Jeppesen, V.F., Huss, H.H. (1993). Characteristics and antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from chilled fish products. *Int J Food Microbiol.* 1;18(4):305-20.
- Jrad, Z., El Hatmi, H., Fguiiri, I., Arroum, S., Assadi, M. et Khorchani, T. (2013). Antibacterial activity of Lactic acid bacteria isolated from Tunisian camel milk. *African Journal of Microbiology Research Full*, 7(12), 1002-1008.
- Kirtzalidou E., Pramateftaki P., Kotsou M. et Kuriacou A. (2011). Screening for Lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe*. 17:440-443.
- Larouci S. (2013). *contribution à l'étude des probiotiques et prébiotiques comme l'alternative aux antibiotiques en aviculture*. mémoire de magister .université d'Oran.

Références bibliographiques

- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16: 189-199.
- Markowiak, P., Slizewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *nutrients* . 9:1-30.
- Meremäe, Kadrin et Elias, Priit et Tamme, Terje et Toomas, Kramarenko et Lillenberg, Merike et Karus, Avo et Hanninen, Marjaliisa et Roasto, Mati. (2010) The occurrence of *Campylobacter spp.* in Estonian broiler chicken production in 2002-2007. *Food control* . 21:272-275.
- Moreno-Arribas M.V., Polo, M.C., Jorganes, F., Munoz, R. (2003). Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International journal of food microbiology* 84:117-123.
- Morishita, T., Tamura, T., Makino, T., Kudo, S. (1999). Production of menaquinones by lactic acid bacteria. *Journal dairy science* 82, No.9, 1897-1903.
- Ogier J-C., Casala E., Farrokh C., Saihi A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The Leuconostoc genus. *International Journal of food microbiology* 126:286-290.
- Polak Berecka, M., Wasko, A., Koston, D. (2009). Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of Lactobacillus rhamnosus against some food spoilage microorganisms. *Annales. Vol. LXIV* 1.
- Prévost H., Phalip V., Huang D., and Diviés C. (1993). Metabolism and physiological behaviour of *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* growing on raffinose. *Journal Basic microbial* 33:433-441.
- Rambaud, J.C., Buts J.P., Corthier G., Bernard F. (2004). *Flore microbienne intestinale : Physiologie et pathologie digestives*, P.264. Éditions John Libbey Eurotext.
- Recart-Conort, A.T.M. (2015). *probiotiques et prebiotiques en gastroentérologie des carnivores domestiques : état des preuves*. Thèse de doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire, D'ALFORT.
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition* 137(3):830S-837S.
- Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. (2004). *Lactic acid bacteria microbiological and functional Aspects*. Marcel Dekker, Inc., U.S.A.
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Journal/Nutrients* 5(4):1417-1435.
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling L., Hoefnagel, M.H.N et Jeroen, H. (2003). Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. Vol. 69, N° 8, p. 4542-4548.
- Tamime, A. (2005). Probiotic Dairy Products. *Dairy Science and Technology Consultant*. p234.
- Timothy M. Cogan et Kieran N. Jordan. (1994). SYMPOSIUM: THE DAIRY LEUCONOSTOC. Metabolism of Leuconostoc Bacteria. *J Dairy Sci* 17:2704-2717
- Van immerseel F., De Buck J., Pasmans F., Haesebrouck F., Ducatelle R. (2003). Stratégies Nutritionnelles Pour Réduire Les Agents Pathogènes Chez La Volaille. *Cinquièmes Journées de La Recherche Avicole, Tours, 26 et 27 Mars 2003*, 1-8.
- Van Ioo Jan., Cummings John., Delzenne Nathalie., Hans Englyst. (1999). Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *British Journal of Nutrition*, 81, 121-132.
- Vedamuthu E.R. (1994). The Dairy *Leuconostoc*: Use in Dairy Products. *J Dairy Sci* 77:2725-2737

Références bibliographiques

Yateem, A., Balba, M.T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *International Journal of Dairy Science*, 3: 194-199.

Annexe

Résultats du test de Student :

Test des échantillons appariés

		Différences appariées							
		Moyenne	Ecart type	Moyenne erreur standard	Intervalle de confiance de la différence à 95 %		t	ddl	Sig. (bilatéral)
					Inférieur	Supérieur			
Paire 1	S aureus f- S aureus	-,4444	3,6197	,6966	-1,8764	,9875	-,638	26	,529

Test des échantillons appariés

		Différences appariées							
		Moyenne	Ecart type	Moyenne erreur standard	Intervalle de confiance de la différence à 95 %		t	ddl	Sig. (bilatéral)
					Inférieur	Supérieur			
Paire 1	E coli f- E coli	-,38148	2,7913	,5372	-4,9190	-2,7106	-7,101	26	,000

Test des échantillons appariés

		Différences appariées							
		Moyenne	Ecart type	Moyenne erreur standard	Intervalle de confiance de la différence à 95 %		t	ddl	Sig. (bilatéral)
					Inférieur	Supérieur			
Paire 1	Pseudof- Pseudo	-2,7222	5,3391	1,0275	-4,8343	-,6101	-2,649	26	,014

Résumé

L'impact des fructo-oligosaccharides sur l'antagonisme des souches appartenant au genre *Leuconostoc* vis-à-vis des bactéries pathogènes : (*Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Escherichia coli* ATCC: 25922, et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC : 27853) a été étudié en appliquant le test des spots sur agar. L'activité antibactérienne a été déterminée après culture des bactéries sur un milieu contenant 2% de dextrose (bouillon MRS) et sur un autre supplémenté de 2% de FOS. Dans les deux milieux, les souches étaient plus actives contre *E. coli* suivi de *P. aeruginosa*. Tandis que l'effet inhibiteur a été moindre contre *S. aureus*.

L'inhibition d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* a diminué très significativement lorsque les bactéries sont développées dans un milieu contenant le FOS avec des diamètres de 18.25 ± 2.48 mm et 14.33 ± 4.59 mm respectivement. Par ailleurs, aucun changement de l'effet inhibiteur est noté contre *S. aureus* soit en absence ou en présence de FOS (10.14 ± 2.99 mm et 9.70 ± 2.70 mm respectivement).

On conclue qu'en suivant la méthode des spots sur agar, les fructo-oligosaccharides n'améliore pas les propriétés inhibitrices des leuconostocs.

Les mots clés : Activité antibactérienne, FOS, *Leuconostoc*, Prébiotiques, Probiotiques.

Abstract

The impact of fructo-oligosaccharides on the antagonism of strains belonging to the genus *Leuconostoc* against pathogenic bacteria: (*Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Escherichia coli* ATCC: 25922, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC: 27853) was studied by applying the spot test on agar. Antibacterial activity was determined after bacterial culturing on a medium containing 2% dextrose (MRS broth) and on another supplemented with 2% FOS. In both media, strains were more active against *E. coli* followed by *P. aeruginosa*. While the inhibitory effect was less against *S. aureus*.

Inhibition of *E. coli* and *P. aeruginosa* has decreased very significantly where bacteria are developed in a medium containing FOS with diameters of 18.25 ± 2.48 mm and 14.33 ± 4.59 mm respectively. However, no change in the inhibitory effect is noted against *S. aureus* either in the absence or presence of FOS (10.14 ± 2.99 mm and 9.70 ± 2.70 mm respectively).

It is concluded that by following the spot method on agar, fructo-oligosaccharides do not improve the inhibitory properties of leuconostocs.

Keywords: Antibacterial activity, FOS, *Leuconostoc*, Prebiotics, Probiotics.

المخلص

تم دراسة تأثير الفركتو-أليغوساكريد (FOS) على الخصائص التثبيطية للبكتيريا ممرضة (*Staphylococcus aureus* ATCC:25923 و *Escherichia coli* ATCC : 25922 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC : 27853) من طرف سلالات تنتمي إلى جنس *Leuconostoc* باستعمال تطبيق اختبار البقعة على الأجار، بعد زراعتها في وسطين مختلفين الأول يحتوي على الجلوكوز بنسبة 2% (MRS مرق) والآخر على 2% من FOS. أثبتت النتائج أن النشاط المضاد للبكتيريا الممرضة كانت متماثلة في الوسطين، حيث أن التثبيط كان عالياً ضد *E. coli* متبوعاً بـ *P. aeruginosa*. بينما كان التأثير المثبط أقل ضد *S. aureus*.
تثبيط *E. coli* و *P. Aeruginosa* تأثر بشكل كبير للغاية عندما نمت البكتيريا في وسط FOS بأقطار تثبيط : 18.25 ± 2.48 ملم و 14.33 ± 4.59 ملم على الترتيب. في حين، لم يلاحظ أي تغيير في التأثير المثبط ضد *S. aureus* سواء في غياب أو في وجود FOS (10.14 ± 2.99 ملم و 9.70 ± 2.70 ملم).

خلصت هذه الدراسة إلى أنه وباتباع طريقة البقع على الأجار الفركتو-أليغوساكريد (FOS) لا تحسن الخصائص المثبطة للـ *Leuconostocs*

الكلمات المفتاحية : نشاط مضادات البكتيريا، *Leuconostoc*، FOS، البروبيوتيك، البروبيوتيك.