

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE HASSIBA BEN BOUALI CHLEF

MEMOIRE

En vue de l'obtention du **Diplôme de Magister** en

Sciences Alimentaires

Présenté et soutenu publiquement par : **Hassina GUETARNI**

Le

**ETUDE DE L'EFFET DES BACTERIES LACTIQUES SUR L'INHIBITION DES
BACTERIES IMPLIQUEES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DIGESTIVE**

IN VITRO

Sous la direction de M^r Ahmed BENSAID et M^{me} Rachida ALLEM

Devant le jury d'examen :

Présidente	: Soumia KOUADRI MOUSTEFAI	Maître de conférence, U.H.B. Chlef
Examineur	: Abdelkader DILMI-BOURAS	Maître de conférence, U.H.B. Chlef
Examineur	: Ali RIAZI	Maître de conférence, Université de Mostaganem
Promoteur	: Ahmed BENSAID.	Chargé de cours, U.H.B. Chlef
Copromotrice	: Rachida ALLEM	Chargée de cours, U.H.B. Chlef

Année universitaire : 2006- 2007.

REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie Dieu le Tous Puissant de m'avoir donné la force, le courage, la santé et la patience pour pouvoir accomplir ce modeste travail, et mes chers parents pour leur aide, leur soutien et leur patience durant mon travail.

J'exprime mes sincères remerciements à :

Monsieur Bensaïd A., Chargé de cours à U.H.B. de Chlef, pour m'avoir encadré et conseillé au cours de notre travail.

Madame Allem R., Chargé de cours à U.H.B. de Chlef, pour avoir guidé et encouragé mes avancées, ainsi que, pour avoir soutenu l'ensemble de ce travail par des moyens matériels.

M^{elle} Kouadri Moustefai S., Maître de conférence à U.H.B. de Chlef, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury.

Monsieur Dilmi -Bouras A., Maître de conférence à U.H.B. de Chlef, pour sa disponibilité durant les années de mes études, et pour l'honneur qu'il m'a fait d'accepter d'examiner ce travail.

Monsieur Riazi A., Maître de conférence à l'université de Mostaganem, pour ses aides précieuses et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Monsieur Medi, directeur des études du département d'agronomie et de biologie du centre universitaire de Khemis - Miliana ; Monsieur Karahacen, chef de département d'agronomie et de biologie du centre universitaire de Khemis- Miliana.

M^{elle} Chaabane, responsable des laboratoires de biologie du centre universitaire de Khemis - Miliana, pour ses aides et son soutien.

Monsieur Brahiti, directeur de l'hôpital de Ain Defla ; Monsieur Chaïb Eddour et Monsieur Madani, responsables à l'hôpital de Ain Defla.

Tout le personnel du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Ain Defla : Monsieur Nezar., Monsieur Selmane, Monsieur Aïssa Hine, Monsieur Mahmoudi, M^{elle} Fellah et M^{elle} Taoussa, pour leur aides et leur soutien, durant toute la durée de ce travail.

Tout le personnel du laboratoire de contrôle de qualité d'El-Harrach, Alger, surtout Madame Bourouis et Monsieur Berghout.

Monsieur Kouidri, responsable au laboratoire de contrôle de qualité de Chlef.

Un sincère remerciement à M^{elle} Thabti, M^{elle} Kouiche et M^{elle} Merzougue.

Toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin.

SOMMAIRE

RESUME

ABSTRACT

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE..... 1.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. ECOSYSTEME GASTRO-INTESTINAL..... 3.

1. Description générale..... 3.

2. Microflore intestinale..... 3.

3. Facteurs majeurs influençant la microflore gastro-intestinale..... 5.

II. BACTERIES PATHOGENES..... 7.

1. Bactérioses des voies digestives inférieures..... 7.

2. *Escherichia coli*..... 9.

2.1. Définition..... 9.

2.2. Caractères bactériologiques..... 10.

2.3. Caractères antigéniques..... 10.

2.4. Groupes pathogènes d' *E.coli*..... 11.

3. *Salmonella typhi*..... 12.

3.1. Définition..... 12.

3.2. Caractères bactériologiques..... 12.

3.3. Caractères antigéniques..... 13.

3.4. Physiopathologie et symptomatologie de *Salmonella typhi*..... 14.

4. *Helicobacter pylori*..... 14.

4.1. Historique..... 14.

4.2. Définition..... 15.

4.3. Caractères bactériologiques..... 16.

4.4. Caractères biochimiques..... 16.

4.5. Voies de transmission..... 16.

4.6. Prévalence..... 17.

4.7. Pouvoir pathogène d' *H.pylori*..... 17.

4.8. Inefficacité du système immunitaire.....	18.
4.9. Endommagement de la muqueuse gastrique.....	19.
4.10. Pathologies causées par <i>H. pylori</i>	20.
III. PROBIOTIQUES, PREBIOTIQUES ET SYMBIOTIQUES.....	21.
1. Probiotiques.....	21.
1.1. Bactéries lactiques.....	22.
1.2. Autres microorganismes probiotiques.....	23.
1.3. Probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé.....	23.
2. Prebiotiques.....	25.
3. Symbiotiques.....	26.
IV. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES BACTERIES LACTIQUES.....	27.
1. Compétition vis- à – vis d’un substrat.....	27.
2. Production des acides organiques.....	28.
2.1. Effet de la formation de l’acide.....	28.
2.2. Effets spécifiques.....	28.
3. Peroxyde d’hydrogène.....	28.
3.1. Formation du peroxyde d’hydrogène.....	28.
3.2. Action sur les microorganismes.....	29.
4. Diacétyle.....	29.
5. Acétaldéhyde.....	30.
6. Dioxyde de carbone.....	30.
7. Bacteriocines.....	30.

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS.....	31.
1. Matériel biologique.....	31.
2. Milieux de culture.....	31.
II. METHODES.....	32.
1. Dénombrement des bactéries lactiques.....	32.
1.1. Préparation du lait.....	32.
1.2. Revivification des souches de bactéries lactiques.....	32.
1.3. Dénombrement des bactéries lactiques en culture pure.....	33.

1.4. Dénombrement des bactéries lactiques en culture mixte.....	34.
1.5. Dénombrement des bactéries lactiques en culture mixte.....	34.
additionnée de <i>Bifidobacterium</i>	
2. Isolement et identification des entéropathogènes <i>E.coli</i> et <i>S.typhi</i>	35.
2.1. Prélèvement.....	35.
2.2. Examen bactériologique.....	35.
2.3. Identification des caractères biochimiques.....	35.
3. Isolement et identification d' <i>Helicobacter pylori</i>	38.
3.1. Test rapide à l'urée.....	38.
3.2. Isolement.....	38.
3.3. Enrichissement.....	38.
3.4. Culture.....	38.
3.5. Examen microscopique.....	38.
3.6. Identification des caractères biochimiques.....	38.
4. Interaction des bactéries lactiques avec des bactéries pathogènes.....	40.
4.1. Préparation des précultures des bactéries lactiques.....	40.
4.2. Préparation des précultures des bactéries pathogènes.....	40.
4.3. Antagonisme.....	40.
5. Analyse des acides organiques des bactéries lactiques sélectionnées.....	42.
5.1. Préparation des échantillons de l'analyse.....	42.
5.2. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	42.
5.3. Chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	43.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. DENOMBREMENT DES BACTERIES LACTIQUES	45.
1. Dénombrement des bactéries lactiques en culture pure.....	45.
2. Dénombrement des bactéries lactiques en culture mixte.....	45.
3. Dénombrement des bactéries lactiques en culture mixte additionnée.....	47.
de bifidobactéries	
II. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES ENTEROPATHOGENES	48.
<i>E.COLI ET S.TYPHI</i>	
1. Etude bactériologique.....	48.
2. Identification des caractères biochimiques.....	50.

III. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION D' <i>HELICOBACTER PYLORI</i>.....	51.
1. Test rapide à l'urée.....	51.
2. Etude bactériologique.....	51.
3. Identification des caractères biochimiques.....	53.
IV. INTERACTION DES BACTERIES LACTIQUES AVEC DES.....	54.
BACTERIES PATHOGENES	
1. Interaction des bactéries lactiques avec <i>E.coli</i>	54.
1.1. En culture pure.....	54.
1.2. En culture mixte ($St_x + Lb_y$).....	56.
1.3. En culture mixte additionnée de bifidobacteries ($St_x + Lb_y + Bif_z$).....	56.
2. Interaction des bactéries lactiques avec <i>S.typhi</i>	58.
2.1. En culture pure.....	58.
2.2. En culture mixte ($St_x + Lb_y$).....	59.
2.3. En culture mixte additionnée de bifidobacteries ($St_x + Lb_y + Bif_z$).....	60.
3. Interaction des bactéries lactiques avec <i>H.pylori</i>	61.
3.1. En culture pure.....	61.
3.2. En culture mixte ($St_x + Lb_y$).....	63.
3.3. En culture mixte additionnée de bifidobacteries ($St_x + Lb_y + Bif_z$).....	64.
V. ANALYSE DES ACIDES ORGANIQUES DES BACTERIES.....	65.
LACTIQUES SELECTIONNEES	
1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	65.
2. Chromatographie haute performance (CLHP).....	68.
2.1. Analyse qualitative.....	68.
2.2. Analyse quantitative.....	73.
CONCLUSION GENERALE.....	76.
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	78.
ANNEXES	

RESUME

L'impact favorable de certaines souches de bactéries lactiques sur la santé de l'homme a été démontré par des recherches effectuées au cours de ces dernières années.

Ainsi, l'objectif de ce travail est de chercher les souches des bactéries lactiques qui pourraient inhiber la croissance des bactéries pathogènes impliquées dans les maladies gastro-intestinales, *in vitro*, et analyser les acides organiques qui seraient à l'origine de cette inhibition.

Pour cela, plusieurs interactions ont été réalisées entre des bactéries lactiques en culture pure ou mixte (additionnée ou non de bifidobactéries) et des bactéries pathogènes (*E. coli*, *S. typhi* et *H. pylori*). L'effet antagonique a été évalué par la méthode de diffusion en gélose. Une inhibition importante d'*E. coli* a été constatée en présence des deux cultures *Lp* (diamètre = 10 mm) et *St*^{*} + *Lb*^{*} + *Bl* (diamètre = 10 mm) ; les combinaisons *St*₃ + *Lb*₁ + *Bl* et *St*₂ + *Lp* + *Bl* ont montré un effet inhibiteur de *S. typhi* dont les diamètres sont de 8mm et 7 mm, respectivement ; pour *H. pylori*, la souche *St*₁ et *Lb. acidophilus* (*Lb*^{*}) ont démontré des inhibitions dont les diamètres sont de 12 mm et 8 mm, respectivement.

L'analyse qualitative et quantitative des acides organiques par deux méthodes de chromatographie (CCM et CLHP) a montré la présence de l'acide lactique dans les cultures bactériennes où il y a eu inhibition.

Cette étude suggère un rôle bénéfique des bactéries lactiques dans les maladies gastro-intestinales (diarrhée et ulcère). Leur activité antibactérienne pourrait être due à la production de l'acide lactique.

Mots clés : bactéries lactiques, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, interaction, inhibition, acides organiques, CCM, CLHP.

ABSTRACT

The favourable impact of certain lactic acid bacteria strains on the man's health has been demonstrated by researches done during these last years.

Thus, the aim of this work is to investigate the inhibitory effect of lactic acid bacteria strains on the pathogen bacteria (*E. coli*, *S. typhi* and *H. pylori*) which caused gastrointestinal diseases, *in vitro* and to analysis organic acids involved in this inhibition.

Interaction experiments between lactic acid bacteria in pure and mixed (added or no of bifid bacteria) and pathogen bacteria (*E. coli*, *S. typhi* and *H. pylori*) were performed. Antagonistic effect has been valued by agar diffusion method. An important inhibition of *E. coli* has been noted in presence of both cultures *Lp* (diameter = 10 mm) and *St*^{*} + *Lb*^{*} + *Bl* (diameter = 10 mm), both combinations *St*₃+ *Lb*₁+ *Bl* and *St*₂ + *Lp*+ *Bl* presented an inhibitory effect of *S. typhi* whose diameters are respectively 8mm and 7 mm, for *H. pylori*, *St*₁ strain and *Lb. acidophilus* (*Lb*^{*}) have demonstrated an inhibitions whose diameters are 12 mm and 8 mm.

The qualitative and quantitative organic acid analysis by two methods of chromatographic (TLC and HPLC) showed the presence of the lactic acid in the bacterial cultures where there was an inhibition.

This study suggests a beneficial role for lactic acid bacteria in gastrointestinal diseases (diarrhoea and ulcer). The antibacterial properties of lactic acid bacteria may be a function through production of lactic acid.

Key words: lactic acid bacteria, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, interaction, antibacterial activity, organic acids, TLC, HPLC.

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 :	Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'homme et leurs microflores	4.
Figure 2 :	Morphologie d' <i>Escherichia coli</i> sous microscope électronique	10.
Figure 3 :	<i>Salmonella typhi</i>	13.
Figure 4 :	Morphologie d' <i>Helicobacter pylori</i> sous microscope électronique	15.
Figure 5 :	Réaction inflammatoire induite par <i>H.pylori</i> dans le tissu gastrique	20.
Figure 6 :	Principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques	25.
Figure 7 :	Phénomène de la protocoooperation des deux espèces <i>Sc. thermophilus</i> et <i>Lb. bulgaricus</i> .	27.
Figure 8 :	Schéma de la coproculture pour la recherche des entérobactéries pathogènes <i>E. coli</i> et <i>S. typhi</i>	36.
Figure 9 :	Procédure de l'interaction des bactéries lactiques avec des bactéries pathogènes	41.
Figure 10 :	Aspect macroscopique de <i>E. coli</i> après incubation à 37°C pendant 24h	48.
Figure 11 :	Aspect macroscopique de <i>S. typhi</i> après incubation à 37°C pendant 24h	48.
Figure 12 :	Observation des cellules d' <i>E. coli</i> sous microscope optique après coloration de Gram (grossissement x 100)	49.
Figure 13 :	Observation des cellules de <i>S. typhi</i> sous microscope optique après coloration de Gram (grossissement x 100)	49.
Figure 14 :	Test rapide à l'urée après incubation à 37°C pendant 24h	51.
Figure 15 :	Aspect macroscopique d' <i>H. pylori</i> après incubation à 37°C pendant 5 jours	52.
Figure 16 :	Observation des cellules d' <i>H. pylori</i> sous microscope optique après coloration de Gram (grossissement x 100)	52.
Figure 17:	Interaction d' <i>E. coli</i> avec la culture pure des bactéries lactiques	55.
Figure 18 :	Interaction d' <i>E. coli</i> avec la culture mixte des bactéries lactiques ($St_x + Lb_y + Bl$).	58.
Figure 19 :	Interaction de <i>S. typhi</i> avec la culture mixte type $St_x + Lb_y + Bl$.	61.
Figure 20 :	Interaction d' <i>H. pylori</i> avec la culture pure des bactéries lactiques type St_x .	62.

Figure 21 :	Interaction d' <i>H. pylori</i> avec la culture pure des bactéries lactiques type <i>Lb_y</i>	63.
Figure 22 :	Séparation des acides organiques par CCM	67.
Figure 23 :	Séparation du mélange acide acétique/ acide lactique	68.
Figure 24 :	Séparation des acides organiques de l'échantillon <i>H. pylori</i> + <i>St₁</i>	69.
Figure 25 :	Séparation des acides organiques de l'échantillon <i>H. pylori</i> + <i>Lb[*]</i>	69.
Figure 26 :	Séparation des acides organiques de l'échantillon <i>E. coli</i> + <i>Lp</i>	70.
Figure 27 :	Séparation des acides organiques de l'échantillon <i>E. coli</i> + (<i>St[*]</i> + <i>Lb[*]</i> + <i>Bl</i>).	70.
Figure 28 :	Séparation des acides organiques de l'échantillon <i>S. typhi</i> + (<i>St₃</i> + <i>Lb₁</i> + <i>Bl</i>).	71.
Figure 29 :	Séparation des acides organiques de l'échantillon <i>S. typhi</i> + (<i>St₂</i> + <i>Lp</i> + <i>Bl</i>)	71.

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 :	Principaux facteurs influençant la composition et la fonction de la microflore intestinale	6.
Tableau 2 :	Maladies infectieuses des voies digestives inférieures	7.
Tableau 3 :	Caractères biochimiques recherchés pour identifier <i>E. coli</i> et <i>S. typhi</i>	37.
Tableau 4 :	Caractères biochimiques recherchés pour identifier <i>H. pylori</i>	39.
Tableau 5 :	Charge des bactéries lactiques en culture pure	45.
Tableau 6 :	Dénombrement des souches des bactéries lactiques en culture mixte ($St_x + Lb_y$)	46.
Tableau 7 :	Taux de croissance des bactéries lactiques en culture mixte additionnée de <i>Bifidobacterium</i> ($St_x + Lb_y + Bif_z$)	47.
Tableau 8 :	Caractères biochimiques recherchés pour <i>E. coli</i> et <i>S. typhi</i>	50.
Tableau 9 :	Caractères biochimiques recherchés pour <i>H. pylori</i>	53.
Tableau 10 :	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) d' <i>E. coli</i> par les bactéries lactiques en culture pure	54.
Tableau 11 :	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) d' <i>E. coli</i> par les bactéries lactiques en culture mixte ($St_x + Lb_y$)	56.
Tableau 12 :	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) d' <i>E. coli</i> par les bactéries lactiques en culture mixte additionnée de <i>Bifidobacterium</i> ($St_x + Lb_y + Bif_z$)	57.
Tableau 13 :	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de <i>S. typhi</i> par les bactéries lactiques en culture pure	58.
Tableau 14 :	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de <i>S. typhi</i> par les bactéries lactiques en culture mixte ($St_x + Lb_y$)	59.
Tableau 15 :	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de <i>S. typhi</i> par les bactéries lactiques en culture mixte additionnée de <i>Bifidobacterium</i> ($St_x + Lb_y + Bif_z$)	60.
Tableau 16 :	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) d' <i>H. pylori</i> par les bactéries lactiques en culture pure	61.
Tableau 17 :	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) d' <i>H. pylori</i> par les bactéries lactiques en culture mixte ($St_x + Lb_y$)	63.

Tableau 18 :	Diamètres des zones d'inhibition (en mm) d' <i>H. pylori</i> par les bactéries lactiques en culture mixte additionnée de <i>Bifidobacterium</i> ($St_x + Lb_y + Bif_z$)	64.
Tableau 19 :	Rapports frontaux des spots de la révélation des acides organiques	66.
Tableau 20 :	Analyse qualitative de l'acide lactique	72.
Tableau 21 :	Analyse qualitative de l'acide acétique	72.
Tableau 22 :	Analyse quantitative de l'acide lactique	73.

LISTE DES TABLEAUX EN ANNEXE :

Tableau 1 :	Composition du milieu MRS bouillon (g/l).
Tableau 2 :	Composition du milieu MRS agar (g/l).
Tableau 3 :	Composition du milieu M17 bouillon (g/l).
Tableau 4 :	Composition du milieu M17 agar (g/l).
Tableau 5 :	Composition du milieu gélose chocolat (g/l).
Tableau 6 :	Séparation du mélange acide acétique / acide lactique.
Tableau 7 :	Séparation des acides organiques de l'échantillon <i>H. pylori</i> + St_1 .
Tableau 8 :	Séparation des acides organiques de l'échantillon <i>H. pylori</i> + Lb^* .
Tableau 9 :	Séparation des acides organiques de l'échantillon <i>E. coli</i> + Lp .
Tableau 10 :	Séparation des acides organiques de l'échantillon <i>E. coli</i> + ($St^* + Lb^* + Bl$).
Tableau 11 :	Séparation des acides organiques de l'échantillon <i>S. typhi</i> + ($St_3 + Lb_1 + Bl$).
Tableau 12 :	Séparation des acides organiques de l'échantillon <i>S. typhi</i> + ($St_2 + Lp + Bl$).

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les bactéries lactiques sont des microorganismes, capables d'exercer des effets bénéfiques sur la santé ; les plus connus sont les lactobacilles et les bifidobactéries largement utilisés dans les yaourts et d'autres produits de laits fermentés (Duclaux & Reimund, 2002). La croissance des bactéries lactiques génère des conditions du milieu défavorables aux autres bactéries pathogènes (Piard & Desmazeaud, 1992).

Les maladies infectieuses du système digestif se manifestent par des diarrhées aiguës ; elles représentent la première cause de mortalité infantile dans le tiers monde. Environ 1 enfant sur 10 meurt avant d'atteindre l'âge de 5 ans. La diarrhée peut être d'origine bactérienne (ex : *Escherichia coli*), parasitaire ou virale (Tortora et al., 2003).

La fièvre typhoïde causée par *Salmonella typhi* est encore une cause fréquente de mortalité. Dans les cas graves, cette infection se manifeste par une forte fièvre avoisinant les 40°C (Tortora et al., 2003).

L' *Helicobacter pylori* est à l'heure actuelle considéré comme l'agent étiologique des gastrites chroniques, des ulcères et joue un rôle important dans la genèse du cancer gastrique. L'infection à *H. pylori* est l'une des infections chroniques les plus répandues dans le monde de 20 à 90% des individus adultes sont infectés selon les pays (Sobhani et al., 2000).

Les traitements antibiotiques usuels n'étant pas toujours efficaces et souvent associés à des effets secondaires, une alternative de traitement pourrait être la consommation de probiotiques (Syndifrais, 2005).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré l'effet inhibiteur de certaines espèces de bactéries lactiques sur les bactéries pathogènes comme *Shigella dysenteriae* et *Listeria monocytogenes* (Misra & Kuila, 1995).

Ainsi, l'objectif de ce travail est d'étudier, *in vitro*, l'interaction des bactéries lactiques avec les bactéries pathogènes (*E. coli*, *S. typhi* et *H. pylori*), en culture pure, mixte additionnée ou non de bifidobactéries afin de mettre en évidence les meilleures combinaisons probiotiques, et de procéder à l'analyse des acides organiques dans les cultures bactériennes qui montrent un effet inhibiteur important.

Une étude bibliographique est réalisée sur les bactéries impliquées dans la pathologie gastro-intestinale, ainsi que sur les bactéries lactiques et leurs effets probiotiques.

Ce travail s'articule en deux parties :

1. L'interaction en milieu de culture gélosé des bactéries lactiques avec les trois bactéries pathogènes isolées ; précédée :

- du dénombrement des bactéries lactiques (*Lactobacillus* spp., *Streptococcus thermophilus* et *Bifidobacterium* spp.) en culture pure et mixte.

- de l'isolement et identification d' *E. coli*, de *S. typhi* et de *H. pylori*.

2. L'analyse des acides organiques (acide lactique et acide acétique) en utilisant la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie liquide haute performance (CLHP).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. ECOSYSTEME GASTRO-INTESTINAL

1. Description générale :

Le tractus gastro-intestinal est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes. De par sa surface totale (muqueuse) estimée à 200-300 m², il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement. L'écosystème gastro-intestinal est généré par une alliance stable entre l'épithélium gastro-intestinal, le système immunitaire et une importante flore microbienne. Ces trois composants sont continuellement liés entre eux et évoluent ensemble en assurant une fonction et une activité normales de l'écosystème. Si l'un des trois composants de l'écosystème est défaillant, l'alliance est altérée et par conséquent diverses pathologies s'y installent (Mc Cracken & Lorenz, 2001).

Il existe plusieurs compartiments constituant le tractus gastro-intestinal de l'homme (figure 1). Les interactions entre les microorganismes et l'hôte peuvent être de trois types: symbiose, commensalisme et pathogénique. L'hôte est protégé contre la microflore intestinale pathogène par les barrières chimiques et physiques formées par l'épithélium gastro-intestinal (Hooper & Gordon, 2001).

2. Microflore intestinale :

La flore intestinale normale est une collection complexe et en équilibre de microorganismes qui habitent normalement le tractus gastro-intestinal et remplissant un rôle dans la nutrition, la physiologie et le contrôle du système immunitaire de l'hôte. Après une colonisation complète, la microflore intestinale est considérée comme un organe acquis après la naissance. Il est constitué d'une grande diversité d'espèces microbiennes assurant différentes fonctions pour l'hôte. La microflore du tractus gastro-intestinal a été estimée de 10¹³ à 10¹⁴ cellules microbiennes représentant 400 à 500 espèces et sous espèces. Cette microflore représente environ 10 fois le nombre total de cellules du corps humain (Bjorksten, 2004).

La prévalence des bactéries dans le tractus gastro-intestinal dépend des conditions régnant dans le compartiment du tractus. Deux catégories de bactéries ont été identifiées : les bactéries autochtones ou indigènes se trouvant dans des niches particulières, et les bactéries allochtones ou transitoires rencontrées dans d'autres habitats du tractus. La majorité des bactéries pathogènes sont allochtones et vivent normalement en harmonie avec l'hôte, excepté lorsque l'équilibre du système est rompu (Hao & Lee, 2004).

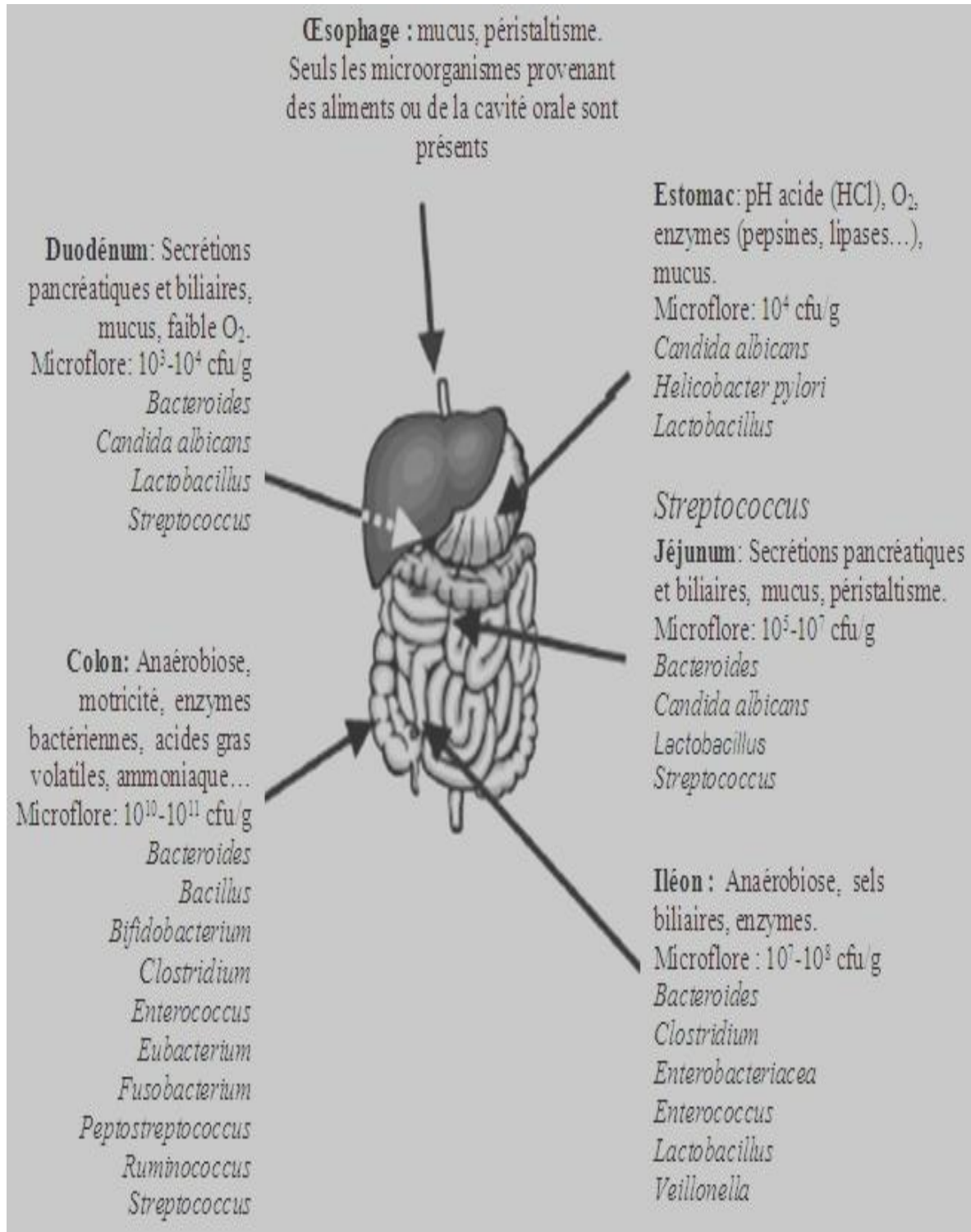


Figure 1 : Schéma simplifié décrivant les compartiments de l'appareil digestif de l'homme et leurs microflores.

Source : Ouwehand & Vesterlund, (2003).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Du point de vue microbiologique, comme le montre la figure 1, l'environnement gastro-intestinal comprend trois régions principales qui offrent des conditions très différentes pour la survie des différents microorganismes. Dans le premier compartiment (l'estomac), la prolifération microbienne est fortement réduite par la présence d'oxygène apporté par la déglutition et d'une forte acidité. De ce fait, l'estomac héberge sélectivement les microorganismes acidotolérants et anaérobies comme les lactobacilles, les streptocoques, les levures,...etc. Dans le deuxième compartiment qui est le petit intestin, la microflore est constituée essentiellement de bactéries anaérobies tels que les lactobacilles, les streptocoques et les entérobactéries, et anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridies. Dans le dernier compartiment qui est le colon (dépourvu d'oxygène), le transit digestif est plus lent et la flore microbienne est plus abondante, représentant 35 à 50 % du volume du contenu du colon humain (Gounier-Château,1994).

La microflore du colon est très complexe et dominée par les bactéries anaérobies strictes (*Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Bifidobacterium* spp...). Tandis que les bactéries anaérobies sont moins nombreuses et représentées par les lactobacilles, les entérocoques, les streptocoques et les entérobactéries. Les levures (ex. *Candida albicans*) sont relativement faiblement représentées. La charge microbienne dans les différents compartiments a été estimée à environ : 10^4 , 10^{3-4} , 10^{5-7} , 10^{7-8} et 10^{10-11} unité formant colonie (cfu)/g dans l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le colon, respectivement (Isolauri et al., 2004).

Les bifidobactéries, les lactobacilles et les streptocoques, se distinguent par leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, comme l'amélioration de la maturation et de l'intégrité de l'intestin, l'antagonisme contre les bactéries pathogènes et la modulation de la fonction immunitaire (Rastall, 2004).

3. Facteurs majeurs influençant la microflore gastro- intestinale :

La composition et les fonctions de la microflore du tractus gastro-intestinal sont influencées par divers facteurs liés au changement des conditions physiologiques de l'hôte (âge, état de santé,...), de la composition du régime alimentaire et des circonstances environnementales (contamination par les bactéries pathogènes, antibiothérapie, chimiothérapie, climat, stress, hygiène ...) (Hopkins et al., 2002). Les divers facteurs mentionnés dans le tableau 1 peuvent perturber l'équilibre de l'écosystème intestinal en favorisant des espèces particulières par rapport à d'autres. Dans certains cas, ce déséquilibre

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

peut être très favorable à la prolifération de microorganismes opportunistes pathogènes pouvant compromettre la santé et le bien-être de l'hôte (Holzapfel et *al.*, 1998).

Tableau 1 : Principaux facteurs influençant la composition et la fonction de la microflore intestinale.

Facteurs médiés par l'hôte	Facteurs microbiens
<ul style="list-style-type: none"> - pH, sécrétion (immunoglobulines, biles, sels, enzymes). - Motilité (péristaltisme). - Physiologie (variable selon les compartiments). - Cellules détachées, mucines, exsudats de tissus. 	<ul style="list-style-type: none"> - Adhésion. - Motilité. - Flexibilité nutritionnelle. - Spores, capsules, enzymes, composants antimicrobiens. - Temps de génération.
Interactions microbiennes	
Synergie	Antagonisme/ Stimulation
<ul style="list-style-type: none"> - Coopération métabolique. - Excrétion de vitamines et facteurs de croissance. - Changement de potentiel d'oxydo-réduction, pH et tension d'O₂. 	<ul style="list-style-type: none"> - Acides gras à courte chaîne, amines. - Changement de potentiel d'oxydo-réduction, pH et tension d'O₂. - Composants antimicrobiens. - Besoins nutritionnels, etc.
Régime alimentaire	
Composition, fibres non digestibles, drogues, etc.	

Source : Holzapfel et *al.*, (1998)

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

II. BACTERIES PATHOGENES

1. Bactérioses des voies digestives inférieures :

Les maladies touchant le système digestif sont essentiellement de deux types : les infections et les intoxications. Une infection survient lorsqu'un agent pathogène pénètre à l'intérieur du tube digestif et s'y multiplie. Certains agents pathogènes entraînent la maladie en sécrétant des toxines qui perturbent l'activité du tube digestif. L'intoxication résulte de l'ingestion de telles toxines préformées. Les infections et les intoxications provoquant souvent des diarrhées, parfois sévères et sanglantes ou accompagnées de mucus s'appellent dysenteries. Le terme gastroentérite s'applique aux maladies s'accompagnant d'une inflammation des muqueuses de l'estomac et de l'intestin (tableau 2) (Tortora et *al.*, 2003).

Tableau 2 : Maladies infectieuses des voies digestives inférieures.

Maladie	Agent pathogène	Remarque
Intoxication alimentaire par <i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Une exoentérotoxine présente dans la nourriture provoque l'apparition rapide de nausées, de vomissements et de diarrhées
<i>Shigellose</i> (dysenterie bacillaire)	<i>Shigella spp.</i>	Les bactéries sont excrétées dans les fèces humaines. Une fois ingérées, elles envahissent les cellules épithéliales de l'intestin et y prolifèrent. L'infection se propage aux cellules voisines, causant des lésions tissulaires locales (abcès) et une dysenterie.
<i>Salmonellose</i>	<i>Salmonella enterica</i>	Les bactéries qui résident dans l'intestin des animaux contaminent la nourriture ; lorsqu'elles sont ingérées, elles envahissent les cellules épithéliales de l'intestin et s'y multiplient elles ne se propagent pas aux cellules voisines mais peuvent traverser la muqueuse et pénétrer dans la circulation sanguine et lymphatique. L'infection entraîne des nausées et des diarrhées.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Fièvre typhoïde	<i>Salmonella typhi</i>	L'agent de la fièvre typhoïde est excrété dans les fèces humaines. La période d'incubation est de 2 semaines environ, les bactéries ne prolifèrent pas dans les cellules intestinales mais se multiplient dans les cellules phagocytaires. Elles se disséminent dans tout le corps ; dans les cas graves, la paroi intestinale peut se perforer et engendrer des hémorragies intestinales. Le taux de mortalité est significatif.
Choléra	<i>Vibrio cholerae</i>	L'exotoxine – le cholérogène – cause une diarrhée grave avec perte importante de liquides et d'électrolytes. La bactérie n'envahit pas les tissus.
Gastroentérite à <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	L'exotoxine cause une diarrhée similaire à celle associée au choléra, mais généralement moins sévère.
Gastroentérite à <i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>	Très dangereuse chez les personnes souffrant d'une maladie hépatique.
Gastroentérite à <i>E. coli</i> entérotoxigène	<i>Escherichia coli</i>	La bactérie, non invasive, produit des entérotoxines qui provoquent une diarrhée liquide qui ressemble à celle de la forme bénigne du choléra ; diarrhée des voyageurs typique.
Gastroentérite à <i>E. coli</i> entéroinvasif	<i>E. coli</i>	L'invasion de la muqueuse intestinale par les bactéries entraîne une inflammation responsable d'une dysenterie semblable à celle provoquée par Shigella.
Gastroentérite à <i>E. coli</i> entérohémorragique	<i>E. coli</i>	La bactérie productrice de vérocytotoxines cause une colite hémorragique (fèces très sanguinolentes) et un syndrome hémolytique urémique (sang dans les urines, et peut être insuffisance rénale).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Gastroentérite à <i>E.coli</i> entéropathogène	<i>E. coli</i>	La bactérie n'est ni toxigène ni invasive ; elle adhère aux cellules épithéliales de l'intestin responsable de diarrhées aiguës dans les pouponnières et les garderies.
Gastroentérite à <i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	La bactérie microaérophile se rencontre dans l'intestin des animaux agent causal courant des gastroentérites.
Ulcère gastroduodéal à <i>Helicobacter</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	L'agent pathogène s'est adapté pour survivre dans l'estomac ; sa présence cause des ulcères gastroduodénaux.
Gastroentérite à <i>Yersinia</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	La bactérie réside dans l'intestin des animaux. Elle croît lentement à 4°C. Les signes et les symptômes habituellement bénins comprennent des douleurs abdominales et des diarrhées.
Gastroentérite à <i>Clostridium</i> perfringens	<i>Clostridium perfringens</i>	Se limite habituellement à la diarrhée.
Gastroentérite à <i>Baccillus cereus</i>	<i>Baccillus cereus</i>	Peut se manifester sous la forme de diarrhées ou de nausées et de vomissements ; causées par diverses toxines.

Source : Tortora et *al.*, (2003).

2. Escherichia coli :

2.1. Définition :

Escherichia coli appartient au groupe des coliformes Gram négatif, d'origine fécale et peut se développer dans le lait. Comme les autres coliformes, cette espèce peut être responsable d'intoxications à cause d'un développement abondant (figure 2) (Guiraud, 1998).

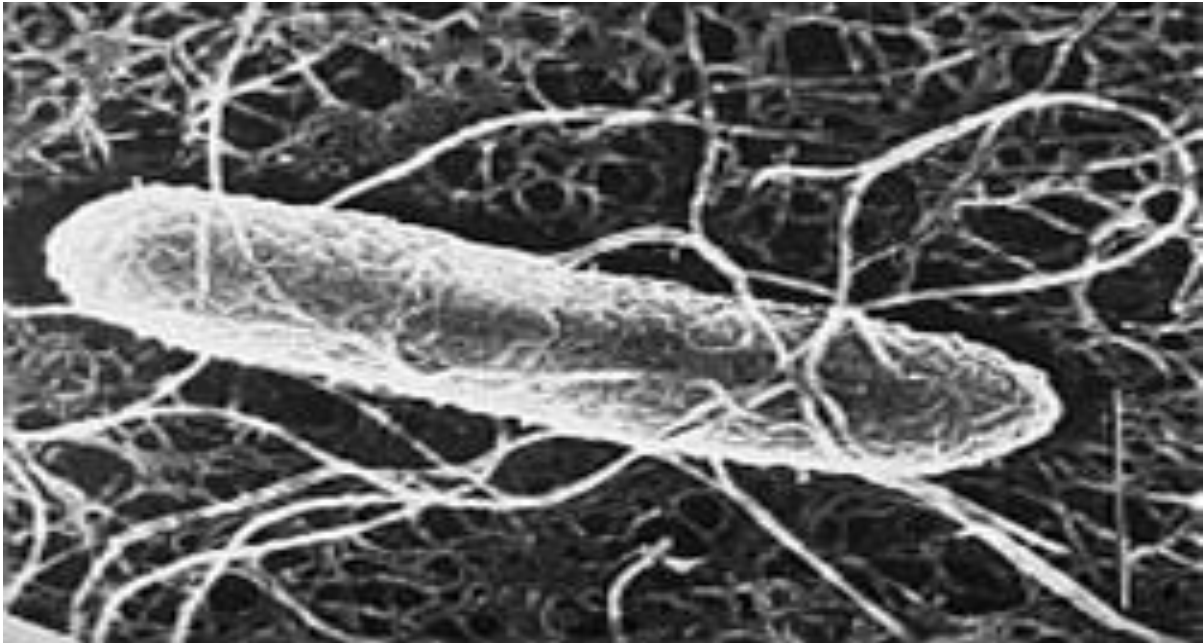


Figure 2 : Morphologie d' *Escherichia coli* sous microscope électronique.

Source : Ducluzeau, (2006).

2.2. Caractères bactériologiques :

E. coli possède les propriétés classiques des entérobactéries : Gram-, catalase +, oxydase-, anaérobie facultative, bâtonnet court. Ses principaux caractères biochimiques sont la fermentation du lactose et du mannitol, l'absence de l'uréase et de la production d' H_2S , ne se multiplie pas sur le milieu citrate de Simmons. Elle produit de l'indole, et peut se développer à 44 °C, *E. coli* peut croître à un pH qui s'étend de 4,4 à 9 en fonction du type d'acide utilisé (Guechi, 2002).

2.3. Caractères antigéniques :

E. coli possède des antigènes variés associés à quatre types de structures :

➤ **Antigènes somatiques O** : sont associés aux lipopolysaccharides (LPS) de la paroi et ont une variabilité qui permet de décrire au moins 164 spécificités (Joly & Alain, 2003).

➤ **Antigènes flagellaires H** : sont associés aux protéines des flagelles et sont également variés. Une cinquantaine ont été identifiés grâce à des méthodes d'agglutination ou d'immobilisation dans une gélose mannitol mobilité. Leur identification permet de déterminer le sérotype d'une souche de colibacille. Le sérotype rassemble les spécificités O, H et si possible K. Sa détermination est utile dans les enquêtes épidémiologiques et pour caractériser les souches pathogènes (Joly & Alain, 2003).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

➤ **Antigènes d'enveloppe K :** sont de nature polysaccharidique et sont inégalement répartis dans l'espèce. Certains constituent une véritable capsule semblable à celle de *Klebsiella*, il s'agit des antigènes K de type A. Pour la majorité des souches, l'antigène K est de type B, il est associé à une simple enveloppe (Joly & Alain, 2003).

➤ **Antigènes de surface de type F :** sont présents chez des souches ayant des propriétés d'adhésion. Ils sont souvent associés aux pili et sont donc de structure fibrillaire, ce qui explique la désignation F souvent employée. Ils sont rarement « non filamenteux », la protéine est organisée en une enveloppe mince extra cellulaire (Joly & Alain, 2003).

2.4. Groupes pathogènes d'E. coli :

L'analyse des facteurs de virulence des souches a permis de reconnaître cinq catégories d' *E. coli* pathogènes, agissant par des mécanismes différents.

➤ **E. coli entérotoxigène (ECEP) :**

Ces bactéries sont responsables des diarrhées surtout chez l'enfant. Elles peuvent être responsables d'épidémies dans les collectivités notamment en milieu néonatal, favorisées par le manque d'hygiène. La diarrhée peut être sévère et prolongée : selles aqueuses accompagnées d'une grande quantité de mucus, fièvre et vomissements. Pour manifester leur pouvoir pathogène, la plupart des souches doivent posséder des structures d'adhérence aux entérocytes, gérant une destruction progressive de ceux-ci associée ou non à l'action d'une cytotoxine (Leclerc et al., 1995).

➤ **E. coli entérotoxigène (ECET) :**

L'ECET est une cause fréquente des diarrhées du voyageur et d'enfants dans les pays en voie de développement. Les bactéries ingérées adhèrent aux entérocytes et sécrètent des enterotoxines l'une protéique thermolabile, non dialysable, antigénique, libérée dans le milieu lors de la lyse des corps bactériens; l'autre est thermostable, dialysable, non antigénique et peut être le résultat de fragmentation de la molécule première. Ces toxines vont être responsables d'une diarrhée aqueuse, s'accompagnant de nausées et de vomissements, de douleurs abdominales, parfois de la fièvre et du malaise général (Leclerc et al., 1995).

➤ **E.coli entero-invasive (ECEI) :**

C'est une souche provoquant des diarrhées aiguës, avec de la fièvre, myalgies et frissons, il s'agit de syndrome de dysentérieforme : la souche se fixe à la muqueuse et l'infecte. Certaines souches ont des réactions sérologiques croisées avec les shigelles, aussi bien

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

morphologique que physiologique, elles sécrètent la même vérotoxine, elles sont retrouvées surtout chez les enfants de moins de dix ans dans les pays en voie de développement (Leclerc et *al.*, 1995).

➤ **E.coli entérohémorragique (ECEH) :**

Ces germes sont responsables d'une diarrhée sanglante, de colites hémorragiques parfois accompagnées d'atteintes rénales graves pouvant aboutir à la mort, notamment chez l'enfant ou les personnes âgées. Ces bactéries interagissent avec la muqueuse de l'intestin et produisent une toxine, la vérotoxine qui détruit les vaisseaux sanguins du rein (Leclerc et *al.*, 1995).

➤ **E.coli entéroaggrégant et entéroadhérant (ECEAgg) :**

Leurs caractéristiques sont voisines de celles des ECEP. Ils provoquent des diarrhées chez l'enfant et chez les voyageurs en milieu tropical (Leclerc et *al.*, 1995).

3. Salmonella typhi :

3.1. Définition :

Salmonella est un agent infectieux intracellulaire facultatif ; il a été isolé pour la première fois en 1885 par Daniel Salmon, dont *Salmonella typhi* est l'agent pathogène humain à l'origine de la fièvre typhoïde (figure 3) (Bergeron & Dufour, 2004).

3.2. Caractères bactériologiques :

C'est un bacille à Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif, chimioorganotrophe, mobile grâce à des flagelles péritriches, et ne formant pas d'endospore. Cette bactérie possède un métabolisme oxydatif et fermentaire. Elle produit de l'acide de la fermentation du D- glucose ou d'autres hydrates de carbone, elle a une catalase positive, oxydase négative (Gledel, 1988).



Figure 3 : *Salmonella typhi*.

Source : Leyral & Vierling, (2001).

3.3. Caractères antigéniques :

Le genre *Salmonella* possède des antigènes variés associés à trois types :

➤ **Antigènes somatiques (ou antigène O)** : ce sont les antigènes de la paroi bactérienne, de nature lipopolysaccharidique. Ils sont thermostables et alcoolostables. Trois composants sont mis en évidence : le lipide A responsable des effets toxiques, le corps ou la partie basale, et le polysaccharide qui est le support de la spécificité et il repose sur les sucres constitutifs (Gledel, 1988).

➤ **Antigènes flagellaires (ou antigène H)** : les flagelles sont constitués de polymères de flagelline (protéine fibreuse). Pour une souche donnée, il peut exister un ou deux déterminants antigéniques de type H (Gledel, 1988).

➤ **Antigènes capsulaires (ou antigène Vi)** : ces antigènes forment une mince capsule glycolipidique qui recouvre le LPS et donc masque les spécificités O. Cette enveloppe peut être détruite par chauffage à 100°C pendant 10 minutes (Gledel, 1988).

3.4. Physiopathologie et symptomatologie de *Salmonella typhi* :

Le réservoir de *Salmonella typhi* est strictement humain. La transmission peut être interhumaine par contact direct avec une personne infectée, ou indirecte par consommation d'aliments contaminés lors de leur préparation par une personne malade (ou porteuse saine) ou par consommation d'aliments contaminés par de l'eau souillée par des matières fécales. La fièvre typhoïde emprunte quatre phases, la première se traduit par l'élimination rapide des bactéries sériques.

Durant la semaine suivant l'infection, *Salmonella* se réplique activement au sein des cellules phagocytaires. Cette phase précède la reconnaissance de PAMP (pathogen – associated molecular pattern) par les cellules de la lignée phagocytaire mononucléaire. Il en résulte la production de nombreuses cytokines (tumor necrosis factor α , interleukines 1,6 et 12, interféron γ) et une infiltration massive de monocytes et de polynucléaires neutrophiles dans les sites inflammatoires.

A la quatrième phase de l'infection s'installe la défense inflammatoire dite acquise, c'est-à-dire faisant intervenir les cellules T et B, ainsi que les facteurs humoraux qui en découlent. Cliniquement, la phase d'invasion associe une fièvre élevée d'installation progressive (40°C avec dissociation du pouls), des céphalées, une asthénie, une insomnie, des troubles digestifs de type : anorexie, nausées et crampes abdominales avec constipation ou diarrhée ; peuvent également apparaître des myalgies et des arthralgies.

La phase d'état associe une fièvre qui se maintient en plateau entre 39°C et 40°C (pouls dissocié) et l'émission de selles diarrhéiques (classiquement diarrhée jus de melon). Un état somnolant apparaît et évolue vers une prostration dans les formes graves (typhos), des complications peuvent apparaître à type de perforation et d'hémorragie intestinale, ou de myocardite, d'ostéomyélite, d'encéphalite et de glomérulonéphrite. Ces complications sont dues à la libération d'endotoxines lors de la lyse des salmonelles (Bergeron & Dufour, 2004).

4. *Helicobacter pylori* :

4.1. Historique :

En 1979 Warren, un auteur australien a observé sur des échantillons de la muqueuse gastrique antrale des bactéries incurvées qui furent alors appelées « *Campylobacter*- like-organisme » qui ont été présentes chez des patients qui avaient une gastrite chronique. Ce n'est qu'en 1982 que ces bactéries spiralées ont pu être cultivées par Marshall & Warren.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Ceci, avait permis aux chercheurs de déterminer un nouveau genre bactérien qu'ils avaient appelé « gastric *Campylobacter pylori* », pour prendre en 1989 le nom *Helicobacter pylori*, chef de fil du nouveau genre ainsi créé «*Helicobacter* » (Sevin et al., 1998).

4.2. Définition :

H. pylori est une bactérie pathogène, ne colonise que la muqueuse gastrique et n'infecte pas le duodénum s'il n'y pas de métaplasie gastrique. Elle est du genre *Helicobacter* et sa définition se résume en trois mots : helico (du grec *hélikoïde*, qui veut dire spiralée); bacter (bâtonnet) ; pylori (désigne le pylore). Ce qui donne un bâtonnet spiralé du pylore (figure 4) (Bigard, 2004).



Figure 4 : Morphologie d' *Helicobacter pylori* sous microscope électronique.

Source : Kim, (2004).

Selon la deuxième édition du manuel de Berge de la systématique bactérienne de 2001, le genre *Helicobacter* appartient à la famille Helicobacteraceae avec deux genres différents à savoir le genre *Helicobacter* et le genre *Wollinella*. Sa classification est la suivante :

Domaine	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Eubacteria	Proteobacteria	Epsilon-proteobacteria	Campylobacteriales	Helicobacteraceae	Helicobacter	<i>Helicobacter pylori</i>

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

D'autres *Helicobacter* ont pu être identifiés *H. felis*, *H. meridarum*, *H. pullorum*, et *H. bilis*... la plupart ont été trouvés dans le tube digestif des animaux et *H. pylori* a été isolée de l'estomac humain (Lamouliatte et *al.*, 1992).

4.3. Caractères bactériologiques :

H. pylori est un bacille à Gram négatif, de forme spiralée ou incurvée, de 2,5 à 5 µm de long et 0,5 à 1 µm de large. Les bacilles sont généralement de morphologie homogène sur biopsies. Après culture, la morphologie devient hétérogène. Les bacilles sont en forme de « U », « S » ou même circulaire. La mobilité d' *H. pylori* est assurée par 4-6 flagelles engagés de position polaire (ciliature lophotriche). Du fait de ses exigences métaboliques multiples, *H. pylori* est cultivé sur des milieux riches additionnés de sang ou de sérum de cheval (5% à 10%). La culture est réalisée dans des jarres sous atmosphère microaérophile avec 85% de N₂ et 10% de CO₂ et 5% d'O₂. Après 3 à 5 jours d'incubation à 37°C, les colonies apparaissent translucides, légèrement brunes et convexes (Avril et *al.*, 2000).

4.4. Caractères biochimiques :

H. pylori possède un capital enzymatique important car elle a une catalase, oxydase, amidase, peptidase, phosphatase et surtout une uréase extracellulaire en quantité extrêmement importante. Elle possède aussi une DNase gammaglutamyl - transpeptidase, leucine aminopeptidase, une lipase et aussi une estérase. *H. pylori* a un métabolisme respiratoire et tire principalement son énergie de phosphorylation oxydative. Le caractère micro-aérophilique des colonies dépendait de l'inhibition d'enzymes comme la lactate déshydrogénase plutôt que de celle de la chaîne des cytochromes. Certaines activités enzymatiques telles que l'uréase, catalase et phospholipase peuvent expliquer la capacité d'*H. pylori* à résister à l'acidité gastrique, à la réponse inflammatoire et la modification de la composition du mucus et des phospholipides qui ont un rôle protecteur pour la muqueuse (Fauchere, 1999).

4.5. Voies de transmission :

Actuellement, trois principales voies de transmission d' *H. pylori* d'une personne à une autre sont proposées :

➤ **Transmission féco-orale :** Elle peut exister dans les pays où les conditions d'hygiène sont absentes et les maladies sont fréquentes dans les pays du tiers monde (Megraud et *al.*, 2000).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

➤ **Transmission oro-orale** : suite à des régurgitations, la cavité buccale peut être un réservoir transitoire et la transmission peut se faire de façon directe. Le cas le plus remarqué chez les enfants nés de mères *H. pylori* positive, aussi chez les adolescents (maladies du baiser), parce que l'*H. pylori* a été isolé de la plaque dentaire et trouvé dans la salive (Megraud et *al.*, 2000).

➤ **Transmission gastro-orale** : le risque de l'infection existe dans les salles d'endoscopie, chez les gastroentérologues (défaut d'utilisation de gants), aussi la possibilité du risque de la transmission d'un malade à un autre par la fibroscopie non stérilisée (Megraud et *al.*, 2000).

4.6. Prévalence :

- **Facteurs environnementaux** :

Le plus important est le niveau socio-économique familiale qui dépend du nombre de personnes par foyer, l'hygiène et d'autres paramètres, car la prévalence de l'infection est élevée dans les pays en voie de développement par exemple 45% en Algérie, 55% en côte d'Ivoire (Sobhani et *al.*, 2000).

- **Facteurs d'âge** :

Les gens acquièrent l'infection dans leur jeune âge et en seraient ensuite porteur toute la vie, où elle augmente avec l'âge. L'infection est très faible chez l'enfant et augmente progressivement pour atteindre 40% vers l'âge de 50 à 60 ans (Lamouliatte et *al.*, 1992).

4.7. Pouvoir pathogène d'*H. pylori* :

L'implantation gastrique d' *H. pylori* est facilitée par plusieurs facteurs :

➤ **Mobilité** : La mobilité permet à *H. pylori* de se mouvoir dans le mucus mieux que d'autres bactéries. La mobilité particulière d'*H. pylori* est non seulement due à sa forme spiralée mais aussi à six flagelles unipolaires engagés. Les filaments sont constitués de l'assemblage polymérique de flagélines majeurs Fla A et Fla B. Ces filaments sont protégés de l'acidité gastrique par une gaine membranaire terminée par un tube. La synthèse des deux flagélines est nécessaire à *H. pylori* pour coloniser durablement la muqueuse gastrique (Skouloubris et *al.*, 2000).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

➤ **Colonisation** : *H. pylori* résiste à l'acidité gastrique grâce à la production de l'uréase, qui est une enzyme multimérique de 550 kDa qui est associée à 02 peptides de 62 et 30 kDa. Cette enzyme a besoin d'ions Ni^{2+} au niveau des sites actifs pour hydrolyser l'urée qui est normalement présente dans l'estomac en produisant du dioxyde de carbone et de l'ammoniac. Chaque bactérie se retrouve dans un microenvironnement tamponné qui la protège de l'acidité gastrique.

Ceci ne signifie pas que *H. pylori* peut pousser ou même survivre longtemps en milieu très acide, mais seulement qu'il possède un moyen de défense transitoire qui lui permettra la colonisation. Il est important de noter que l'uréase continue d'être sécrétée en grande abondance par la bactérie même après son établissement dans un environnement plus clément, ceci suggère que le rôle de l'uréase n'est pas limité à la colonisation et pourrait également expliquer une action agressive de cette enzyme au niveau de la muqueuse (Monteiro, 1995).

➤ **Adhérence** : L'observation histologique de biopsies a révélé qu'*H. pylori* est trouvé majoritairement dans la couche de mucus mais à proximité de la surface des cellules épithéliales gastrique (Skouloubris et al., 2000). Un effacement partiel des microvillosités est remarqué à la surface apicale des cellules. L'adhésion est due à deux types d'adhésines :

- **Adhésine Bab A** : elle est impliquée dans l'interaction avec l'antigène du groupe sanguin Lewis exprimé à la surface des cellules gastriques. Sa synthèse n'est pas généralisée à toutes les souches d' *H. pylori*.

- **Adhésines homologues Alp A et Alp B** : elles sont produites par toutes les souches d'*H. pylori* et permettent à la bactérie d'interagir avec les tissus gastriques.

4.8. Inefficacité du système immunitaire :

Suite à l'infection par *H. pylori*, l'hôte exerce une réponse immunitaire à la fois humorale et cellulaire. Pour échapper à ce système de défense, *H. pylori* peut soit produire des antigènes extrêmement immunogènes ou des enzymes :

➤ **Immunogénicité** : la réponse immune se manifeste sous forme d'IgM, pendant les premières semaines et d'IgG dans la phase chronique. Les immunoglobulines devraient pouvoir limiter l'infection en agissant sur la mobilité et sur l'adhérence, ce qui n'est pas le cas avec des IgG et des IgM qui sont produites, mais elles sont sensibles aux protéases présentes dans l'environnement gastrique et se fixent de manière non spécifique (Sobhani et al., 1995).

➤ **Enzymes :**

- *Catalase* : elle hydrolyse H_2O_2 et contribue à la protection d'*H. pylori* vis-à-vis des défenses de l'hôte (Sobhani et al., 1995).

- *Sialidase* : elle peut avoir des effets délétères selon plusieurs mécanismes en altérant le mucus et en révélant des sites de liaison à la muqueuse en aidant au recrutement de polynucléaires neutrophiles (Dwarakanath et al., 1994).

- *Phosphorylase* : les souches rencontrées chez les ulcéreux, produisent plus de phosphorylase que les autres (Fennerty, 1994).

4.9. Endommagement de la muqueuse gastrique :

La bactérie traverse la muqueuse gastrique, la couche du mucus et vient se fixer sur les cellules épithéliales. Ce contact va induire :

➤ **La genèse des lésions :** Les lésions observées au niveau des cellules épithéliales sont dues à la synthèse d'uréase et de la cytotoxine Vac A, le NH_3 produit par l'uréase peut être cytotoxique au contact des cellules. La protéine Vac A est transportée jusqu'à la membrane externe de la bactérie et libérée dans le milieu extracellulaire après un processus d'auto excision. Son activité est maximale en milieu acide. Elle est présente chez les souches d'*H. pylori*. Elle aurait pour fonction de perturber le trafic normal de la voie endocytosique par l'induction de formation de vacuole à pH acide et d'augmenter leur perméabilité aux anions (Cl^- , HCO_3^-). L'ammoniac libéré par *H. pylori* peut agir directement comme une cytotoxine sur les cellules gastriques pour rompre les *tight - junction* cellulaires, entraînant un flux accru d'ions. La présence d'ammoniac gêne la respiration mitochondriale et cellulaire en réduisant la viabilité de la cellule, entraînant les lésions de la muqueuse (Skouloubris et al., 2000).

➤ **L'inflammation :** Certaines souches d'*H. pylori* possèdent l'îlot pathogénique Cag A+, induisent une réponse inflammatoire plus importante que les souches Cag A-. Les souches Cag A+ induisent des cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IGF-B) dans le tissu gastrique. Cet îlot induit une production importante de la cytokine pro- inflammatoire IL8 par les cellules épithéliales, une augmentation de l'apoptose, de la prolifération cellulaire compensatrice du risque de mutation en cas d'infection à *H. pylori* a été réservée, l'évaluation de cette infection chronique va aussi dépendre des facteurs de l'hôte, notamment le polymorphisme de IL-1 β qui détermine le type de lésion qui va se développer (figure 5), et de facteurs de l'environnement tel que le tabagisme pour le malade ulcéreux (Megraud, 1994).

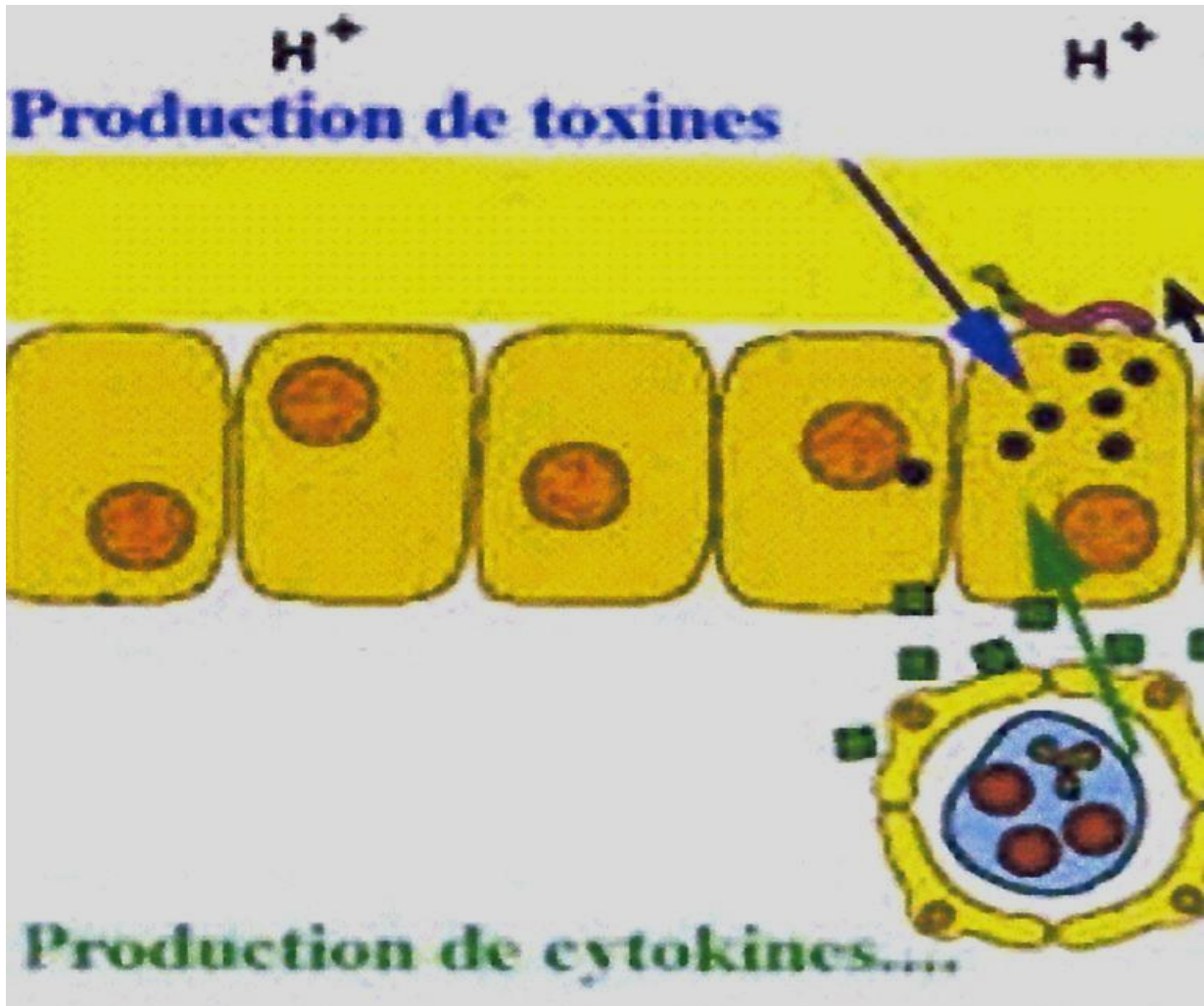


Figure 5 : Réaction inflammatoire induite par *H. pylori* dans le tissu gastrique.

Source : Megraud, (1994).

4.10. Pathologies causées par *H. pylori* :

Les lésions de base de l'infection à *H. pylori* est une gastrite c'est-à-dire une inflammation de la muqueuse gastrique. Elle peut évoluer vers d'autres pathologies telles que l'ulcère, gastrite, cancer gastrique. *H. pylori* a été lié à une liste de pathologies en dehors des régions gastroduodénales y compris la maladie du cœur, de quelques désordres auto-immuns (état inflammatoire chronique de la peau). L'explication de l'association entre *H. pylori* et les infarctus consiste en l'augmentation des globules blancs et du fibrinogène, ce qui favorise la coagulation du sang et par la suite, l'augmentation du nombre d'infarctus (Megraud, 1994).

III. PROBIOTIQUES, PREBIOTIQUES ET SYMBIOTIQUES

1. Probiotiques :

La notion de " probiotiques" a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff, (1907) qui avait constaté que les paysans bulgares, grands consommateurs de laits fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé. Ainsi, Metchnikoff avait proposé l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des bactéries lactiques, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie (Gournier-Château et *al.*, 1994).

Le terme probiotique dérive des deux mots grecs " pros" et " bios" qui signifient littéralement "pour la vie" contrairement au terme antibiotique signifiant "contre la vie". Ce terme a été introduit pour la première fois par Lilly & Stillwell, (1965) pour décrire des substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes.

Depuis, plusieurs définitions ont été données aux probiotiques dépendamment de leurs effets sur la santé. Selon Parker, (1974), « probiotiques » désigne les microorganismes et les substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale. Selon la définition récente de Schrezenmeir & De Verse, (2001) les probiotiques sont « des microorganismes vivants administrés en quantités adéquates et qui sont bénéfiques pour la santé de l'hôte ».

De façon plus spécifique, pour qu'un microorganisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique il doit présenter les caractéristiques suivantes :

- être un habitant naturel de l'intestin ;
- être capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier ;
- adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduire l'adhérence des pathogènes ;
- avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H₂O₂, bactériocines...);
- être non invasif, non carcinogène et non pathogène ;
- être capable de co-agrégation pour former une flore normale équilibrée ;
- survivre aux différents procédés technologiques de production ;
- garder sa viabilité dans l'aliment et durant le transit intestinal (Stanton et *al.*, 2001).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Bactéries lactiques :

Décrites pour la première fois par Orla -Jensen au début du siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres de bactéries à Gram positif possédant des caractéristiques physiologiques et métaboliques communes. Leur principale caractéristique est un métabolisme exclusivement fermentaire qui les conduit à produire à partir du glucose des quantités importantes d'acide lactique, accompagné dans certains cas d'autres métabolites (éthanol, CO₂, autres acides organiques). Leur capacité de biosynthèse est faible, elles possèdent de ce fait une exigence élevée en facteurs de croissance : acides aminés, bases nucléiques, acides gras, vitamines...etc.

Sept genres principaux constituent le groupe des bactéries lactiques : *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*. Le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré comme un genre de bactéries lactiques.

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, immobiles, asporulées, catalase et oxydase négatives, nitrate réductase négative, anaérobies ou aérotolérantes, uniquement capables de fermentation en aérobiose comme en anaérobiose. Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les bactéries lactiques sont dites :

- Homofermentaires : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose (*Streptococcus*, *Pediococcus* et certains *Lactobacillus*).

- Hétérofermentaires : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO₂ et autres acides organiques (*Leuconostoc* et *Bifidobacterium*) (Sutra et al., 1998).

Le pH et la température optimale de croissance varient selon le genre et même selon l'espèce, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, leur pH est de 5,5-6 et leur température optimale de croissance est de 45°C ; pour les bifidobactéries leur température optimale de croissance est comprise entre 37°C et 41°C, ils se développent à pH supérieur à 5 ; l'espèce *Streptococcus thermophilus* se développe mieux à 45°C avec un pH de 6-6,5 ; la température optimale de croissance de *Lactobacillus paracasei* est de 30 à 37°C et le pH est de 5,5-6 (Vingnola, 2002).

Les bactéries lactiques ont été isolées de nombreux milieux naturels végétaux (plantes et fruits), animaux et humains (cavités buccale et vaginale, fèces, lait,...) (Deroissart, 1986).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Parmi les bactéries lactiques, les lactobacilles et les bifidobactéries sont les probiotiques les plus étudiés et les plus répandus dans l'alimentation humaine.

Les lactobacilles sont en général des bâtonnets flagellés, non sporulés et à Gram positif, ont un métabolisme des sucres homofermentaire ou hétérofermentaire. Les lactobacilles ayant des effets bénéfiques sur la santé humaine sont *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus johnsonii* La1, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus plantarum* 299 V, *Lactobacillus casei* DN- 114001 et *Lactobacillus paracasei*.

Les bifidobactéries sont des bâtonnets aux formes variées dont la plus caractéristique est une forme en Y, non sporulées, à Gram positif, hétérofermentaires anaérobies strictes. Les bifidobactéries ayant des effets bénéfiques sur la santé humaine sont *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* et *Bifidobacterium breve* (Ouwehand et al., 2002).

1.2. Autres microorganismes probiotiques :

Ce sont les levures de type *Saccharomyces*, utilisées dans l'industrie agroalimentaires, autres bactéries sporulées tels que *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* (Rouchy, 2001).

1.3. Probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé :

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques. La figure 6 illustre la diversité des effets bénéfiques sur la santé.

- **Probiotiques et les infections gastro-intestinales :**

Des études cliniques ont démontré que des infections gastro-intestinales causées par *Helicobacter pylori*, la diarrhée du voyageur, diarrhée due aux rotavirus, diarrhée associée aux antibiotiques, peuvent être contre carrées avec succès par l'utilisation de probiotiques (Van Niel et al., 2002 ; Felley & Michetti, 2003).

- **Probiotiques et l'intolérance au lactose :**

Il a été rapporté que la consommation de lait ou de yogourts enrichis en probiotiques améliore l'absorption du lactose chez les patients déficients en lactase et réduit les symptômes digestifs dus à l'intolérance au lactose (Jiang et al., 1996).

- **Probiotiques et le cholestérol :**

Des études ont révélé que la consommation de yogourt ou de lait fermenté contenant des probiotiques entraîne une diminution du taux de cholestérol dans le sang, et par conséquent la réduction des risques d'hypercholestérolémie responsable des maladies coronariennes (Dilmi-Bouras, 2006).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

- **Probiotiques et les maladies inflammatoires de l'intestin :**

Les processus inflammatoires impliqués dans les pathologies de l'intestin de l'homme comme la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse sont contrôlés par les probiotiques (Gosselink et *al.*, 2004).

- **Probiotiques et la prévention du cancer du colon :**

Selon certaines études, les bactéries probiotiques ont la propriété d'inhiber les processus conduisant à la formation du cancer du colon chez l'homme (Matsumoto & Benno, 2004).

- **Probiotiques et la perméabilité intestinale :**

l'altération de la perméabilité intestinale (fonction barrière) causée par une infection, des toxines ou autre facteur, favorise un transfert aberrant d'antigènes (y compris la microflore locale) à travers l'intestin en engendrant des réponses immunitaires inappropriées (réactions inflammatoires ou auto-immunes). Des études récentes ont montré que la consommation de probiotiques stabilise la fonction barrière de l'épithélium intestinal (Rosenfeldt et *al.*, 2004).

- **Probiotiques et la motilité de l'intestin :**

La motilité intestinale joue un rôle important dans la réduction de la croissance des microorganismes pathogènes dans l'intestin. Les probiotiques pourraient avoir des effets positifs sur la motilité de l'intestin en réduisant le temps de transit des microorganismes pathogènes (Takeuchi et *al.*, 2000).

- **Probiotiques et le système immunitaire :**

Selon la littérature, les probiotiques, grâce à leurs composants intra ou extracellulaires actifs, sont capables d'influencer le système immunitaire par contact avec les cellules immunocompétentes, en transmettant des signaux qui modifient la réponse immunitaire de l'organisme hôte. De nombreuses études ont en effet rapporté que la prolifération des lymphocytes et la production de cytokines par les cellules du système immunitaire peuvent être sensiblement modifiées par l'ingestion de probiotiques. Selon la nature de leurs constituants cellulaires, les probiotiques influencent sélectivement la fonction immunitaire en induisant la réponse humorale, cellulaire spécifique ou non spécifique. Les probiotiques ont aussi la propriété de réduire ou supprimer les réponses immunitaires induites par les ingrédients alimentaires en induisant la tolérance orale et prévenant les allergies (Tanaka & Ishikawa, 2004).

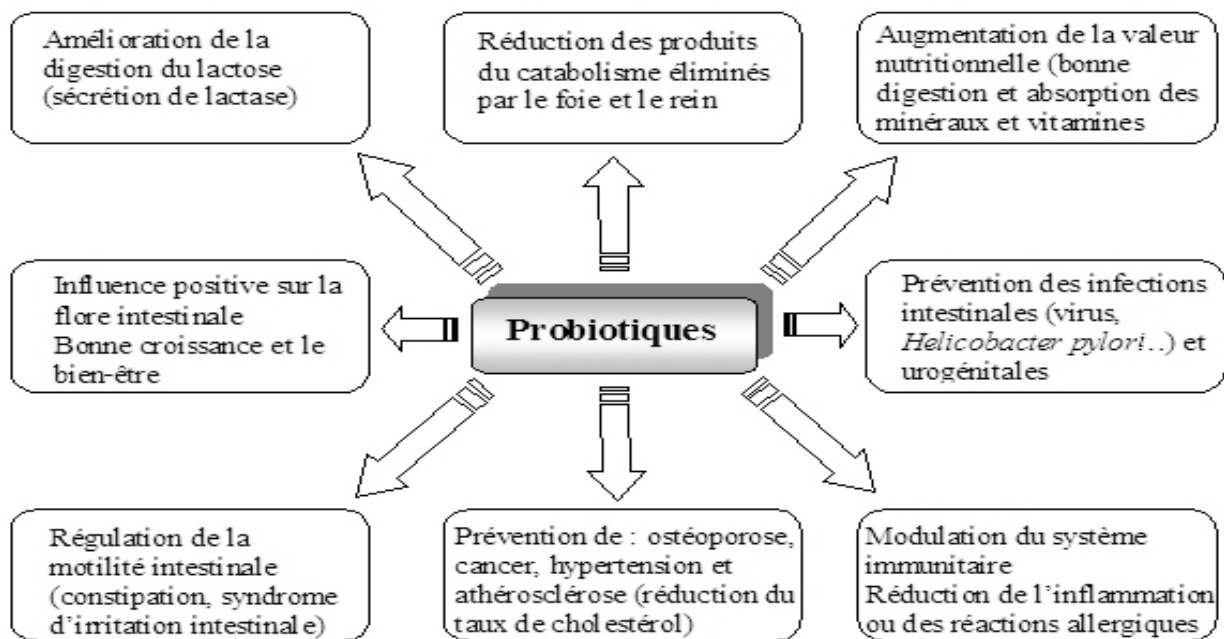


Figure 6 : Principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques.

Source : Mercenier et al. , (2002).

2. Prébiotiques :

Certains composants de la microflore intestinale, particulièrement les bifidobactéries, sont capables de fermenter des substances essentiellement non digestibles (hydrates de carbone) dans le colon grâce à leur pouvoir saccharolytique important. Cette propriété permet d'augmenter la croissance ou l'activité des microorganismes spécifiques du tractus gastro-intestinal en influençant positivement sur la santé de l'hôte. Les effets bénéfiques générés par ces interactions ont permis le développement du nouveau concept « Prébiotiques » (Kaialaspathy & Chin, 2000).

Le concept de prébiotique a été développé suite aux travaux de Gibson & Roberfroid, (1995) qui ont mis en évidence une stimulation sélective de la croissance de bifidobactéries dans le colon de sujets ayant ingérés de l'oligofructose et de l'inuline. Ainsi, les prébiotiques ont été définis comme étant des ingrédients alimentaires non digestibles exerçant des effets bénéfiques sur l'hôte en stimulant sélectivement dans le colon la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries capables d'améliorer la santé de l'hôte.

Les prébiotiques doivent être non digestibles pour servir de substrat aux bactéries spécifiques, principalement les bifidobactéries et les lactobacilles, qui sont actifs et améliorent la santé de l'hôte. Les fibres alimentaires comme les polysaccharides tels que l'amidon, l'inuline, la pectine, et les oligosaccharides non digestibles sont ainsi fermentés par les

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

bactéries intestinales en produisant des acides organiques à courte chaîne notamment les acides, acétique, propionique et butyrique...qui sont alors utilisés par les différents tissus de l'hôte comme substrats énergétiques, ou comme facteurs de régulation cellulaire. Par exemple, le butyrate est non seulement utilisé par les cellules épithéliales du colon à des fins énergétiques, mais aussi joue un rôle majeur dans la régulation de leur processus de prolifération et différenciation cellulaires (Blaut, 2002).

Pour être considéré comme prébiotique, un ingrédient alimentaire doit :

- être ni hydrolysé ni absorbé dans le tractus gastro-intestinal ;
- être sélectif pour un nombre limité de bactéries endogènes ;
- modifier la microflore intestinale en améliorant sa composition ;
- induire des effets intestinaux ou systémiques bénéfiques pour la santé de l'hôte (Gibson & Roberfroid, 1995).

3. Symbiotiques :

Un symbiotique est un mélange de probiotiques et de prébiotiques qui affecte positivement l'hôte en améliorant la survie et l'implantation d'espèces microbiennes vivantes apportées sous forme de suppléments alimentaires dans le tractus gastro-intestinal, et par conséquent, la santé et le bien-être de l'hôte (Isolauri et al., 2002).

Le terme symbiotique évoque la propriété de synergie et est réservé uniquement aux produits contenant les probiotiques et les prébiotiques au même temps. Dans ces produits, les prébiotiques stimulent sélectivement la croissance des probiotiques. Par exemple, un produit contenant l'oligofructose et une bifidobactérie probiotique est considéré comme un symbiotique. Cependant, lorsque un *Lactobacillus* probiotique est associé à l'oligofructose, la combinaison ne forme pas un symbiotique. Cette différence serait due au fait que les bifidobactéries produisent une grande quantité de β -fructosidases, enzymes capables de dégrader sélectivement la liaison entre les fructoses présents dans l'oligofructose.

Une étude récente de Bartosch et al., (2005) réalisée sur un groupe de volontaires âgés (> 62 ans) dont le contenu intestinal en bifidobactéries est fortement réduit par l'âge, a démontré que l'ingestion d'un symbiotique à base de *Bifidobacterium bifidum* BB-02 et *Bifidobacterium lactis* BL-01 (probiotiques) et de l'inuline (prébiotique) a augmenté significativement la taille et la diversité des populations de bifidobactéries dans les matières fécales par rapport au groupe contrôle et groupe placebo.

IV. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES BACTERIES LACTIQUES

Les bactéries lactiques sont utilisées dans de nombreux produits laitiers. Elles contribuent à la texture, la saveur des aliments ainsi qu'à la production de composés aromatiques. Les bactéries lactiques inhibent la prolifération de micro-organismes par la production de composés inhibiteurs telles que les bactériocines et en abaissant le pH par la production d'acide lactique (Piard & Desmazeaud, 1992).

1. Compétition vis-à-vis d'un substrat :

Selon Desmazeaud, (1990), lorsque plusieurs souches sont mises en culture dans un même milieu, cela conduit à des phénomènes de coopérations si elles utilisent un même substrat. L'exemple le plus étudié pour le phénomène de la protocoopération ou appelé aussi symbiose, est celui des ferments du yaourt : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, dont chaque espèce produit une ou plusieurs substances, absentes initialement du milieu de culture, qui stimulent la croissance de l'autre espèce (figure 7).

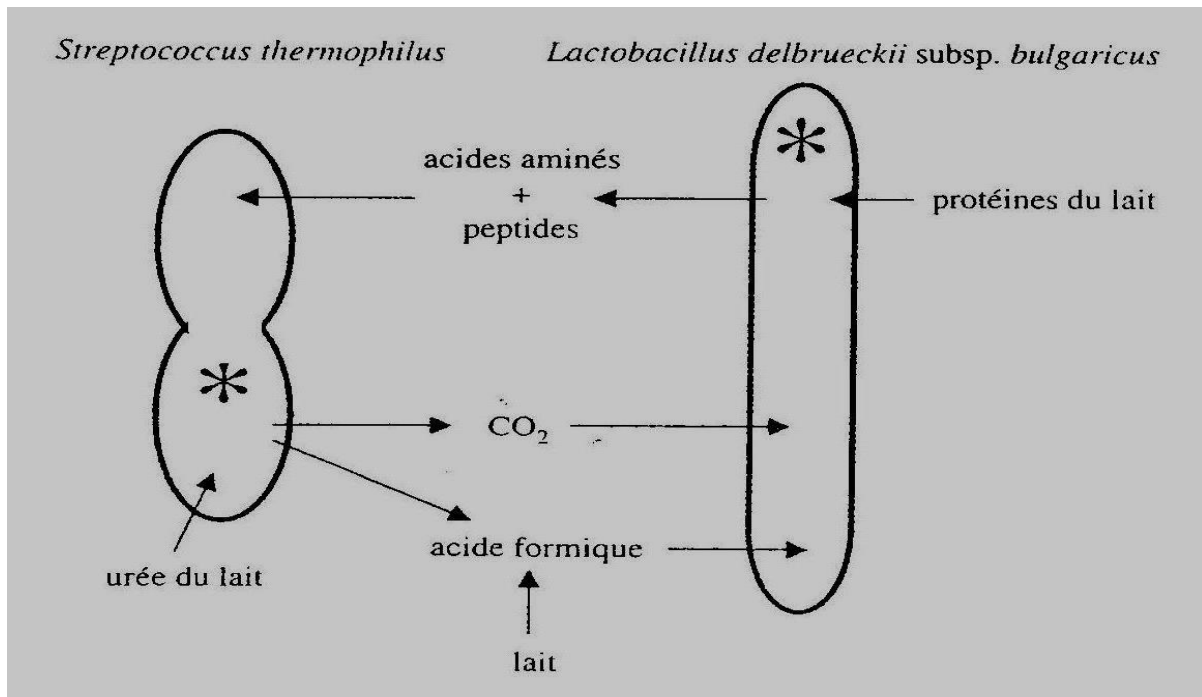


Figure 7 : Phénomène de la protocoopération des deux espèces *Sc. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*.

Source : Loones, (1994).

2. Production des acides organiques :

Effets de la formation de l'acide :

La tolérance des microorganismes vis à vis du pH est très variable dans un produit alimentaire, d'autres facteurs physiques comme la température, ou chimiques (concentration saline, activité de l'eau...) peuvent réduire la tolérance des microorganismes face à l'acidification. Le pH final atteint dépend de la matière première fermentée et des souches utilisées (plus ou moins acidifiantes). Il est plus souvent entre 4 et 4,5 dans le cas des yaourts, 4,8 pour la choucroute, 4,6 à 5,3 dans le cas des saucissons, c'est-à-dire à des valeurs inférieures aux valeurs limites de développement de la plupart des flores d'altération et des flores pathogènes (Sutra et *al.*, 1998).

Effets spécifiques :

La nature de l'acide présent dans le milieu influe sur la résistance des microorganismes face à l'acidification. L'effet inhibiteur spécifique des acides organiques est généralement attribué à leur forme non dissociée. Cette forme pénètre librement dans la cellule où elle s'ionise, ce qui provoque un abaissement du pH interne et le blocage de certains mécanismes de transport. Les bactéries lactiques hétérofermentaires peuvent produire des quantités notables d'acides organiques autres que l'acide lactique, les lactobacilles hétérofermentaires produisent de l'acide lactique et de l'acide acétique (Piard & Desmazeaud, 1992).

3. Peroxyde d'hydrogène :

3.1. Formation du peroxyde d'hydrogène :

La consommation de l'oxygène dissous par les bactéries aboutit en présence d'un substrat oxydable à la formation de composés de réduction de l'oxygène : anion superoxyde O_2^- , peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et eau ; les deux premiers composés sont très toxiques pour la cellule, et les micro-organismes aérobies disposent d'équipements enzymatiques permettant leur élimination.

Chez les bactéries lactiques, seules des enzymes aboutissant à la formation d' H_2O_2 et d' H_2O ont été identifiées mais l'anion superoxyde peut apparaître comme composé intermédiaire.

Diverses réactions enzymatiques aboutissent à la formation de peroxyde d'hydrogène :

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

- Chez les Streptocoques lactiques, la NADH oxydase est la principale source d' H_2O_2 ;
- Chez *Lactobacillus plantarum* c'est une pyruvate oxydase qui provoque la libération d' H_2O_2 en aérobiose au dépend du glucose.

Le superoxyde dismutase provoque aussi la formation d' H_2O_2 à partir des anions superoxydes. La capacité d'accumulation d' H_2O_2 dans des conditions de culture données varie grandement selon les espèces et même dans certains cas selon les souches d'une même espèce. Les concentrations maximales sont obtenues avec *Lactobacillus lactis* (Premi & Bottazi, 1972).

3.2. Action sur les microorganismes :

Dans le lait outre l'action directe du peroxyde d'hydrogène sur certains contaminants, le système lactoperoxydase- thiocyanate- peroxyde d'hydrogène a un rôle dans l'inhibition, qui est due à l'interaction entre trois composés : la lactoperoxydase, le thiocyanate et le peroxyde d'hydrogène :

- La lactoperoxydase catalyse l'oxydation du thiocyanate par le peroxyde d'hydrogène en formant un composé inhibiteur.

- La lactoperoxydase et le thiocyanate sont présents initialement dans le lait ; le peroxyde d'hydrogène est produit par les bactéries lactiques, le facteur limitant de ce système est le H_2O_2 . L'addition au lait de peroxyde à faible concentration peut rendre ce système actif contre certaines espèces Gram négatifs, même catalase positives comme *E.coli*, *Salmonella* ... etc.

- Le chauffage du lait, en inactivant la lactoperoxydase (70°C, 20 minutes ou 82°C, 20 secondes) supprime cette inhibition (Desmazeaud, 1990).

4. Diacétyle :

Le diacétyle produit par de nombreuses bactéries lactiques, est un inhibiteur actif contre de nombreux micro-organismes, bactéries ou moisissures. L'action inhibitrice est accrue en milieu acide, Les bactéries Gram négatifs sont plus sensibles que les Gram positifs. Cependant les concentrations nécessaires pour avoir une inhibition sont très supérieures à celles rencontrées dans les aliments (100 ppm pour les *Pseudomonas* qui sont les germes les plus sensibles). La production de diacétyle ne peut donc à elle seule être responsable des inhibitions dues aux bactéries lactiques (Beliard & Thuault, 1989).

5. Acétaldéhyde :

La contribution de l'acétaldéhyde à la bioconservation est mineure puisque le seuil d'arôme et de saveur est beaucoup plus inférieur aux niveaux qui sont considérés nécessaires à la réalisation de l'inhibition des micro-organismes. Les concentrations d'acétaldéhyde atteignant 25 ppm dans le yaourt peuvent entraîner des inhibitions chez *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *E. coli* (Piard & Desmazeaud, 1999).

6. Dioxyde de carbone :

Le dioxyde de carbone, formé de la fermentation hétérolactique, peut directement produire un environnement anaérobique ; à des concentrations faibles, il peut être stimulateur de la croissance de quelques bactéries anaérobiques (Lindgren & Dobrogosz, 1990).

7. Bactériocines :

Les bactériocines sont définies comme étant des peptides antimicrobiens, synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactiques. Ils sont thermorésistants, actifs uniquement sur des bactéries à Gram positif (Sutra et al., 1998). Les bactériocines des bactéries lactiques sont réparties selon leur structure chimique en :

➤ Classe I - Lantibiotiques : sont des peptides de taille réduite (< 5 kDa), contenant des acides aminés inhabituels obtenus par modification post-traductionnelle dont le plus caractéristique est la lanthionine.

➤ Classe II – Peptides non modifiés : sont des petites bactériocines (< 10 kDa) thermostables et sans modification post-traductionnelle. Ces bactériocines agissent principalement en perméabilisant la membrane de la cellule cible.

➤ Classe III – Protéines : sont caractérisées par leur grande taille, la plupart d'entre-elles sont produites par le genre *Lactobacillus* comme l'helvéticine J produite par *Lb. helveticus* 481 et la lacticin B produite par *Lb. acidophilus*.

➤ Classe IV- Bactériocines complexes : étaient définies comme des protéines associées à une composante non protéique, lipidique et/ ou oligosaccharidique, nécessaire à leur activité biologique (Nes et al., 1996).

PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIELS :

1. Matériel biologique :

- Lait en poudre « Célia » (BP 12-53400 CRAON /FR) (voir annexe 1), est utilisé comme milieu de culture pour les bactéries lactiques (Larpent, 1997).

- Des selles des patients présentant des diarrhées infectieuses et de la fièvre typhoïde ont été ramenées dans des pots en plastique stériles pour la recherche et l'isolement d'*Escherichia coli* et de *Salmonella typhi*.

- Des biopsies gastriques sont obtenues d'un patient présentant un ulcère, ayant subi une endoscopie digestive haute pour la recherche et l'isolement d'*Helicobacter pylori*. Deux à trois fragments sont mis dans du sérum physiologique, les biopsies doivent être prélevées à environ 2cm du pylore pour l'examen bactériologique. Un fragment est mis dans le milieu urée- indole (pour le test rapide à l'urée) (Sobhani et al., 1995).

- Les bactéries lactiques utilisées sont :

- *Streptococcus thermophilus* (St_1 , St_2 , St_3) et *Lactobacillus bulgaricus* (Lb_1 , Lb_2 , Lb_3), isolées du lait de vache et identifiées au laboratoire de lactologie du département des sciences alimentaires de l'université de Chlef.

- *Streptococcus thermophilus* (St^*), *Lactobacillus acidophilus* (Lb^*), *Bifidobacterium longum* (Bf) et *Bifidobacterium adolescentis* (Ba) ; isolées des selles des enfants et identifiées au laboratoire de Biologie moléculaire de l'université de Bejaia.

- *Lactobacillus paracasei* (Lp), isolée du lait de vache et identifiée au laboratoire de lactologie de l'université Pamplona – Navara de l'Espagne.

2. Milieus de culture :

- MRS bouillon et agar (Man Rogosa Sharp) sont utilisés pour l'enrichissement et le dénombrement des lactobacilles (voir annexe 1).

- MRS bouillon et agar à 0,05% de cystéine chlorhydrique (Man Rogosa Sharp) sont utilisés pour l'enrichissement et le dénombrement des bifidobactéries (voir annexe 1).

- M17 bouillon et agar sont utilisés pour l'enrichissement et le dénombrement de *Streptococcus thermophilus* (voir annexe 1).

- Milieu SFM (Sélénite acide de sodium) (Institut Pasteur, Alger) a été utilisé pour l'enrichissement des entéropathogènes (*E. coli* et *S. typhi*).

MATERIELS ET METHODES

- Milieu Hektoen (Institut Pasteur, Alger) a été utilisé pour l'isolement des Gram négatifs entéropathogènes (*E. coli* et *S. typhi*).
- Bouillon nutritif (Institut Pasteur, Alger) a été utilisé pour le broyage de la biopsie gastrique.
- Bouillon glucose Tamponné (Institut Pasteur, Alger) a été additionné au sang de cheval et utilisé pour donner une concentration élevée des bactéries.
- Gélose chocolat a été utilisé pour l'ensemencement et l'isolement d'*H. pylori* (voir annexe 1).

II. METHODES :

1. Dénombrement des bactéries lactiques :

Cette partie a été réalisée au laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Ain De fla, elle a pour but de dénombrer les souches des bactéries lactiques utilisées.

1.1. Préparation du lait :

Le lait a été reconstitué avec une teneur en matière sèche de 120 g/l, homogénéisé et chauffé à 115°C pendant 10 min (Larpen, 1997).

1.2. Revivification des souches de bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques ont été conservées à l'état congelé à une température de -18°C dans du lait reconstitué (Bourgeois & Larpen, 1989). La revivification des souches consiste à décongeler les souches et en ensemercer quelques microlitres dans 10 ml de lait. L'incubation se fait à :

- 45°C pour les souches de *Streptococcus thermophilus* ; *Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus acidophilus* (Larpen, 1997) ;
- 37°C pour *Bifidobacterium adolescentis* et *Bifidobacterium longum* (Sutra et al., 1998) ;
- 30°C pour *Lactobacillus paracasei* 1 (Sutra et al., 1998).

Après 72 h d'incubation, 1ml de chaque tube a été porté aseptiquement dans 9 ml de bouillon spécifique pour chaque souche, puis incubé pendant 3 h (Larpen, 1997).

1.3. Dénombrement des bactéries lactiques en culture pure :

- Préparation des dilutions :

Chaque souche des bactéries lactiques doit suivre la même préparation des dilutions :

- Repartir stérilement 9ml de diluant dans une série de tubes ;
- Agiter la solution mère pour assurer une répartition homogène des micro- organismes ;
- Prélever 1ml de la suspension de bactéries lactiques et transférer dans le tube n° 1 ; on obtient ainsi la dilution 10^{-1} ;
- Après agitation, prélever 1ml de la dilution 10^{-1} et transférer dans le tube n° 2 pour obtenir la dilution 10^{-2} et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de différentes dilutions (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) (Beerens & Luquet, 1987).

- Dénombrement des bactéries lactiques :

Le dénombrement des bactéries a été effectué sur :

- Le milieu M17 gélosé pour les streptocoques (Beerens & Luquet, 1987).
- Le milieu MRS gélosé pour les lactobacilles (Beerens & Luquet, 1987).
- Le milieu MRS cystéine gélosé pour les bifidobactéries (De Man et *al.*, 1960).

Pour cela, il faut procéder comme suit:

- Ensemencer 1ml de chaque dilution (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) des cultures des streptocoques, des lactobacilles et des bifidobactéries dans des boites de pétri (Sutra et *al.*, 1998).
- Couler par le M17, MRS et MRS cystéine fondus et refroidis à 45°C (Larpent ,1997).
- Homogénéiser pendant 5min et laisser se solidifier sur la paillasse auprès du bec benzène (Beerens & Luquet, 1987).
- Incuber à 45°C pendant 48h pour les souches de *Lactobacillus* et *Streptococcus thermophilus*, à 37°C pour les souches de *Bifidobacterium*, à 30°C pour la souche mésophile *Lactobacillus paracasei* 1(Sutra et *al.*, 1998).
- Compter le nombre des colonies dans chaque boite et le multiplier par l'inverse de la dilution (Beerens & Luquet ,1987).

1.4. Dénombrement des bactéries lactiques en culture mixte :

La préparation des cultures mixtes a été effectuée à partir des combinaisons *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus paracasei* 1 :

$St^* + Lb_1$	$St_2 + Lb_1$
$St^* + Lb_2$	$St_2 + Lb_2$
$St^* + Lb_3$	$St_2 + Lb_3$
$St^* + Lb^*$	$St_2 + Lb^*$
$St^* + Lp$	$St_2 + Lp$
$St_1 + Lb_1$	$St_3 + Lb_1$
$St_1 + Lb_2$	$St_3 + Lb_2$
$St_1 + Lb_3$	$St_3 + Lb_3$
$St_1 + Lb^*$	$St_3 + Lb^*$
$St_1 + Lp$	$St_3 + Lp$

- Préparer les dilutions avec un rapport 1/1 pour chaque combinaison (Bourgeois & Larpent, 1989) ;
- Ensemencer 1 ml de chaque dilution 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} des cultures mixtes en profondeur du milieu MRS gélosé dans des boîtes de pétri (Sutra et al., 1998) ;
- Incuber à 45°C pour les combinaisons $St_x + Lb_y$ et à 30°C pour la combinaison $St_x + Lp$ pendant 48h (Bourgeois & Larpent, 1989).

1.5. Dénombrement des bactéries lactiques en culture mixte additionnée de Bifidobactérium :

Après le dénombrement de la charge microbienne des cultures mixtes précédentes, les combinaisons dont les charges les plus élevées ont été additionnées de *Bifidobacterium adolescentis* ou de *Bifidobacterium longum* de la manière suivante :

$$St_x + Lb_y + Ba$$
$$St_x + Lb_y + Bl$$

- Ensemencer 1 ml de chaque dilution 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} des cultures mixtes ($St_x + Lb_y + Ba$ et $St_x + Lb_y + Bl$) avec un rapport de 1/1/1 pour chaque combinaison et recouvrir avec du MRS gélosé cystéiné ;
- Incuber à 37°C pendant 48h (Bourgeois & Larpent, 1989).

2. Isolement et identification des entéropathogènes E.coli et S.typhi :

Cette partie a été réalisée au niveau de l'hôpital de la wilaya de Ain Defla, elle a pour but d'isoler et d'identifier deux bactéries pathogènes très fréquentes dans la wilaya : *Escherichia coli* responsable des diarrhées chez les enfants et *Salmonella typhi* responsable de la fièvre typhoïde.

2.1. Prélèvements :

Dès son arrivé au laboratoire, le prélèvement des selles a été examiné dans les 4 premières heures (conservation possible 8 heures à 4°C) pour éviter toute dessiccation.

2.2. Examen bactériologique :

La coproculture est la mise en culture de matière fécale dans le but d'isoler les bactéries responsables d'une infection digestive (figure 8) (Robin & Roche ,2002).

- Enrichissement :

- Prélever à l'aide d'une anse à platine une portion de selles et l'ajouter à 2 ml de bouillon SFM ;

- Homogénéiser et incuber à 37°C pendant 24 h.

- Isolement :

- Prendre à l'aide d'une anse à platine une goutte du milieu préalablement enrichi et ensemercer sur le milieu gélose Hektoen en utilisant la méthode des stries ;

- Incuber à 37°C pendant 24 h.

- Identification :

- Chaque bactérie présente un type de colonie caractérisé par la couleur, le contour, l'odeur, la taille et l'aspect. Les colonies d'*E. coli* sont plates, sèches, jaunes avec un centre saumon ; les colonies de *Salmonella* sont vertes avec un centre noir.

- Un frottis préparé et coloré suivant la technique de Gram (voir annexe 2).

2.3. Identification des caractères biochimiques :

- Préparation de la suspension bactérienne :

- Prélever une colonie suspecte bien isolée à l'aide d'une anse à platine stérile, la déposer dans 5ml d'eau physiologique ;

- Mettre à l'étuve à 37°C pendant 10 à 15 minutes.

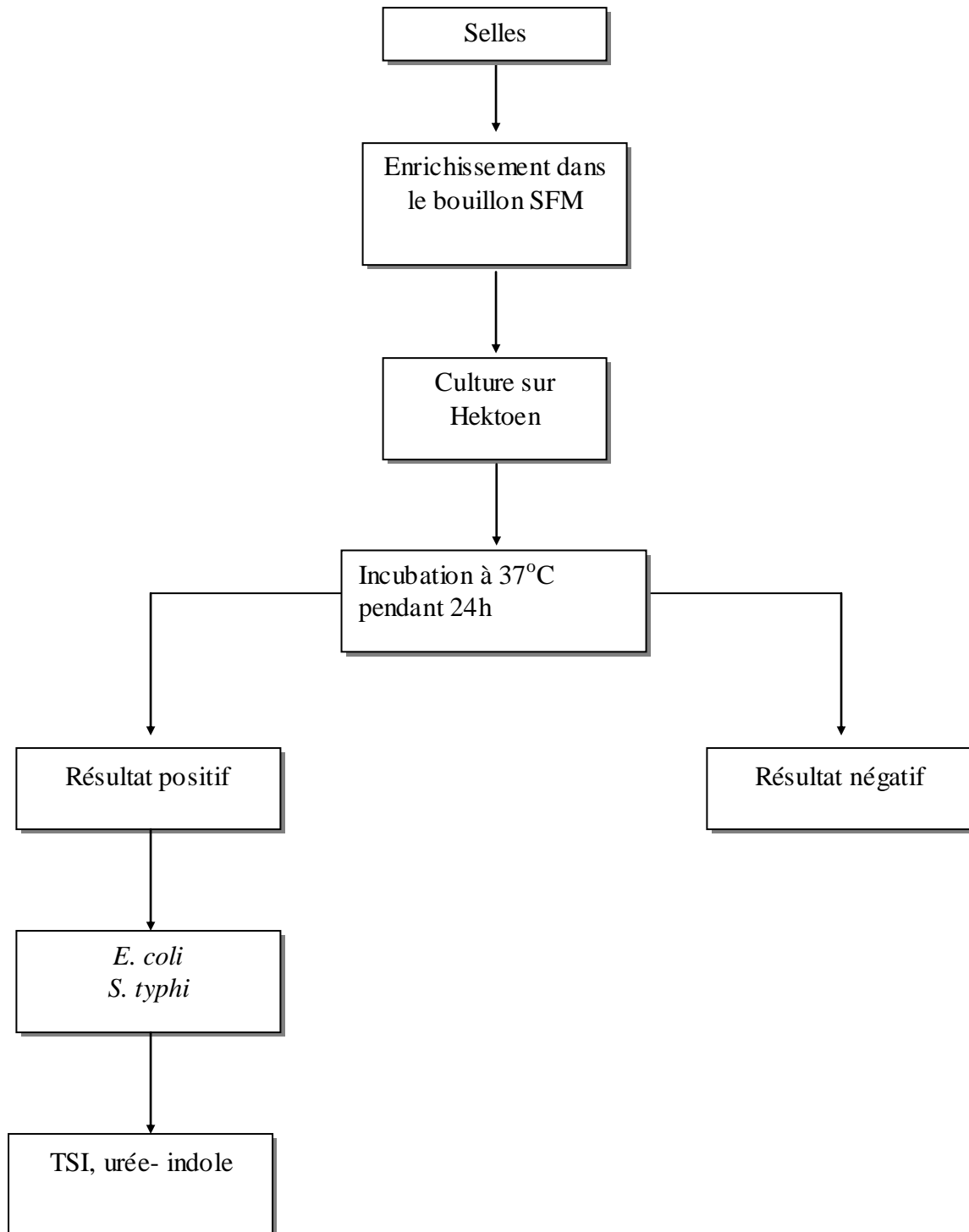


Figure 8 : Schéma de la coproculture pour la recherche des entérobactéries pathogènes *E. coli* et *S. typhi*.

MATERIELS ET METHODES

- **Ensemencement d'une galerie biochimique classique :**

Selon Marshall, (1982), la galerie biochimique classique peut contenir les tests présentés par le tableau 3.

Tableau 3 : Caractères biochimiques recherchés pour identifier *E. coli* et *S. typhi*.

Tests	Substrats	Réaction / Enzyme	Résultats	
			Négatif	Positif
uréase	Urée – indole	Possession d'une uréase	Orange	Rouge
Catalase		Possession d'une catalase	Pas de bulles	Présence de bulles
ONPG	Ortho-Nitro-Phenyl-Galactopyranoside	Béta galactosidase	Incolore	Jaune
LDC	Lysine	L-décarboxylase	Violet	Jaune
ODC	Ornithine	O- décarboxylase	Violet	Jaune
ADH	Arginine	A- dihydrolase	Violet	Jaune
Mannitol Mobilité	Mannitol	Dégradation du mannitol et voir la mobilité du germe	Rouge	Jaune
			Diffusion de la bactérie à travers la ligne de croissance	
Citrate Simmons	Citrate	L'utilisation du citrate comme source de carbone	Vert	Bleu

Source : Marshall, (1982).

3. Isolement et identification d' *Helicobacter pylori* :

Cette partie a été réalisée au laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Ain Defla, elle a pour but d'isoler et d'identifier *Helicobacter pylori*, responsable de l'ulcère gastrique.

3.1. Test rapide à l'urée :

Ce test a été effectué dans la salle d'endoscopie, la lecture du résultat se fait après environ 60 min à température ambiante. Un fragment est mis dans un tube contenant de l'urée indole pour détecter l'activité uréasique qui montre la présence de la bactérie dans la biopsie (Cassel-Beraud et *al.*, 1996). Le résultat positif est interprété par le changement de couleur de l'urée- indole de l'orange au rose ou rouge.

3.2. Isolement :

- Broyer la biopsie à l'aide d'un mortier dans 0,5ml de bouillon nutritif (le broyage permet la dispersion des bactéries et leur libération des cellules à mucus) ;
- Ensemencer la totalité du broyat dans des boîtes de pétri contenant la gélose-chocolat ;
- Mettre les boîtes ensemencées dans une jarre, incuber à 37°C pendant 3 à 5 jours.

3.3. Enrichissement :

- Après la durée d'incubation, mettre les colonies suspectes dans un bouillon glucose tamponné (BGT) additionnée au sang de cheval ;
- Incuber le tube dans une jarre sous atmosphère micro- aérophile à 37°C pendant 24h.

3.4. Culture :

- Ensemencer une goutte de bouillon d'enrichissement dans des boîtes de pétri contenant la gélose chocolat ;
- Incuber les boîtes dans une jarre sous atmosphère micro- aérophile à 37°C pendant 3 à 5 jours (Lamouliatte et *al.*, 1992) .

3.5. Examen microscopique :

- Préparer un frottis à partir des colonies suspectes en fixant la goutte de la suspension à la flamme;
- Colorer le frottis à la méthode de Gram (voir annexe 2).

3.6. Identification des caractères biochimiques :

La galerie biochimique classique peut contenir les tests présentés par le tableau 4 (Marshall, 1982).

MATERIELS ET METHODES

Tableau 4 : Caractères biochimiques recherchés pour identifier *H. pylori*.

Tests	Substrats	Réaction / Enzyme	Résultats	
			Négatif	Positif
uréase	Urée – indole	Possession d'une uréase	Orange	Rouge
Catalase		Possession d'une catalase	Pas de bulles	Présence de bulles
ONPG	Ortho-Nitro-Phenyl - Galactopyranoside	Béta galactosidase	Incolore	Jaune
LDC	Lysine	L-décarboxylase	Violet	Jaune
ODC	Ornithine	O- décarboxylase	Violet	Jaune
ADH	Arginine	A- dihydrolase	Violet	Jaune
Mannitol Mobilité	Mannitol	Dégradation du mannitol et voir la mobilité du germe	Rouge	Jaune
			Diffusion de la bactérie à travers la ligne de croissance	
Citrate Simmons	Citrate	L'utilisation du citrate comme source de carbone	Vert	Bleu

Source : Marshall, (1982).

4. Interaction des bactéries lactiques avec des bactéries pathogènes :

Cette partie à été réalisée au laboratoire d'hygiène de la wilaya de Ain Deffa, elle a pour but de mettre en évidence l'effet antimicrobien des bactéries lactiques utilisées avec les trois bactéries pathogènes (*E. coli*, *S. typhi* et *H. pylori*).

4.1. Préparation des précultures des bactéries lactiques :

Pour l'étude de l'interaction, le choix a été fait sur les meilleures charges microbiennes trouvées en culture pure, mixte, mixte additionnée de bifidobactéries :

- Ensemencer 5 tubes contenant 5 ml de MRS bouillon avec les souches des bactéries lactiques genre *Lactobacillus* ;
- Ensemencer 4 tubes contenant 5 ml de M17 bouillon avec les souches de *Streptococcus thermophilus* ;
- Ensemencer 2 tubes contenant 5ml de MRS bouillon cystéine avec les deux espèces de *Bifidobacterium* ;
- Ensemencer des tubes contenant 5ml de MRS bouillon avec les meilleures charges microbiennes de cultures ($St_x + Lb_y$) et des cultures mixtes additionnées de *Bifidobacterium* ($St_x + Lb_y + Bif_z$);
- Incuber à 37°C pendant 24h.

4.2. Préparation des précultures des bactéries pathogènes :

- *E. coli* et *S. typhi* sont ensemencées dans deux tubes contenant 5ml de bouillon nutritif;
- *H. pylori* est ensemencée dans 5ml de BGT additionnée au sang de cheval ;
- Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h.

4.3. Antagonisme :

Ensemencer des boites de pétri contenant du M17, MRS et MRS cystéine solide par inondation de quelques millilitres des précultures des bactéries pathogènes sur la surface du milieu ; laisser sécher les boites à 37°C pendant 30 min. Après le séchage, déposer à la surface de la gélose des disques de papier buvard préalablement imprégnés du bouillon des souches des bactéries lactiques, de la culture pure, de la culture mixte additionnée ou non de *Bifidobacterium* et sécher à 37°C pendant 30 min. Finalement, incuber les boites à 37°C pendant 24 à 48h (figure 9). L'inhibition des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques se traduit par des zones claires autour des disques, dont les diamètres sont mesurés à partir du centre du disque en mm (Guiraud, 1998).

MATERIELS ET METHODES

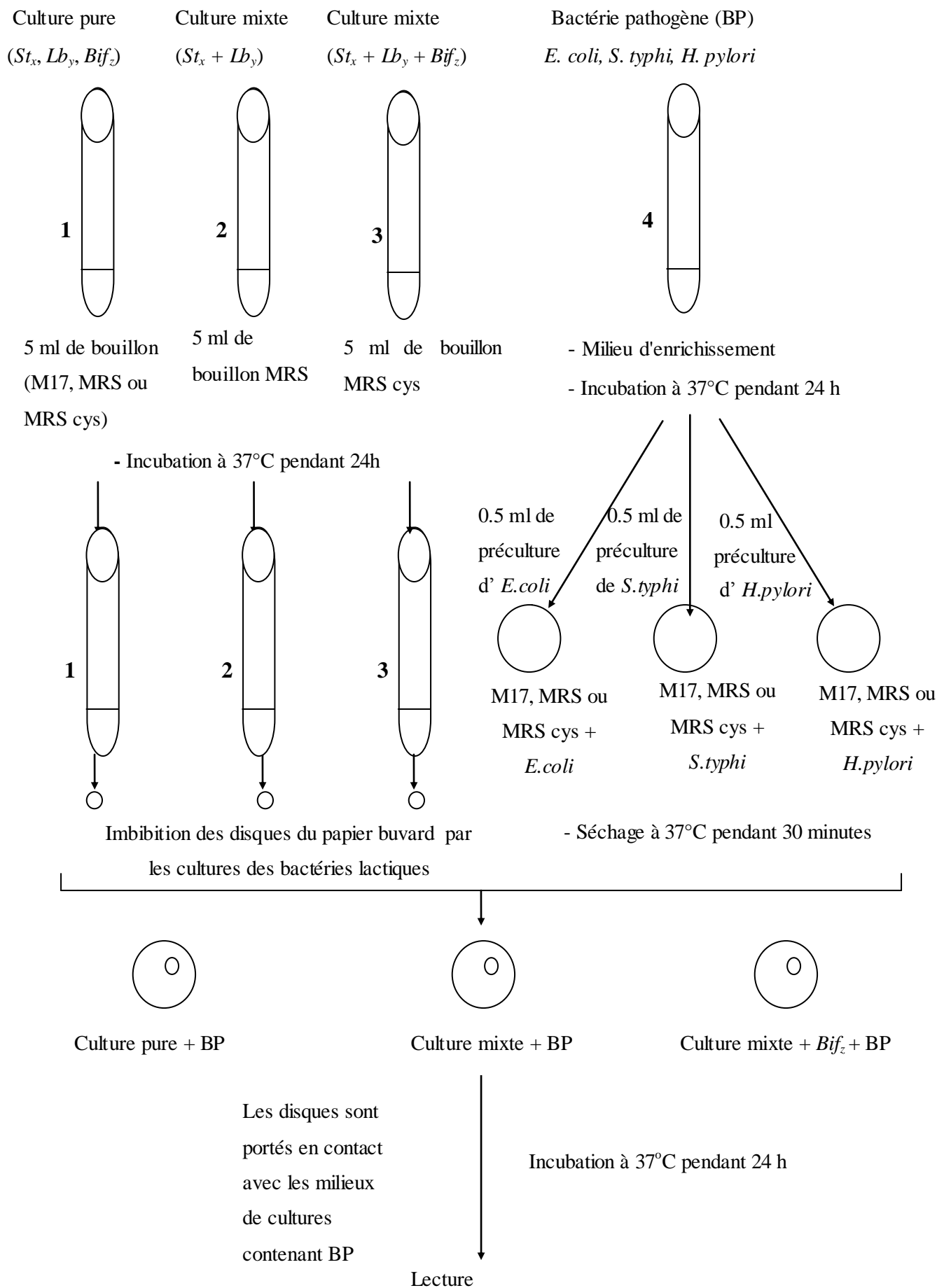


Figure 9 : Procédure de l'interaction des bactéries lactiques avec des bactéries pathogènes.

5. Analyse des acides organiques des bactéries lactiques sélectionnées :

Cette partie a pour but l'analyse des acides organiques produits par des bactéries lactiques des cultures qui ont montré des inhibitions importantes des trois bactéries pathogènes (*E. coli*, *S. typhi* et *H. pylori*). Nous avons utilisé deux méthodes de chromatographie: CCM et CLHP.

5.1. Préparation des échantillons de l'analyse :

Les six précultures des bactéries lactiques qui ont donné les meilleures zones d'inhibition sont ensemencées avec les précultures des bactéries pathogènes dans le milieu liquide. Les cultures *Lb*^{*} + *H. pylori* et *Lp* + *E. coli* ont été ensemencées chacune dans 5 ml de MRS bouillon ; la culture *St*₁ + *H. pylori* a été ensemencée dans 5 ml de M17 bouillon, les cultures (*St*^{*} + *Lb*^{*} + *Bl*) + *E. coli* ; (*St*₃ + *Lb*₁ + *Bl*) + *S. typhi* et (*St*₂ + *Lp* + *Bl*) + *S. typhi* ont été ensemencées chacune dans 5 ml de MRS cystéiné. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, ces cultures ont subi une centrifugation à une vitesse de 12400 tr/min pendant 10 min, afin d'éliminer les cellules bactériennes du milieu (Bayoub et *al.*, 2006).

5.2. Chromatographie sur couche mince (CCM) :

Cette partie a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie du centre universitaire de Khemis Miliana.

- **Principe :**

Nous avons utilisé la méthode décrite par Lee et *al.*, (2001).

- Phase mobile est constituée d'un mélange de : 60 ml d'acétone, 2 ml d'H₂O, 10 ml d'éthanol, 22 ml d'hydroxyde d'ammonium ; 100 ml de ce mélange sont mis dans une cuve de chromatographie (110 x 24 x 24 cm) ;

- Plaque de chromatographie recouverte de gel de silice 60 F254 (20 x 20 cm) ;

- Les acides témoins utilisés sont: acide lactique à 10 % (référence : Allemagne ; 497329970), acide acétique à 10 % (référence : Allemagne ; 833412), acide propionique à 10 % (référence : CE-EMB ; 33621) et acide citrique à 10 % (référence : CE-EMB ; 45053) ;

- La solution indicatrice est composée de : 0,25 g de bleu de bromophenol plus 0,25 g de rouge de méthyle plus 100 ml de méthanol à 70 % ;

- Dans une cuve de chromatographie, la phase mobile est répandue sur la plaque de chromatographie, des gouttelettes sont déposées de chaque acide témoin et de chaque fermentât de la culture bactérienne, une distance de 1 cm doit être laissée entre deux dépôts.

MATERIELS ET METHODES

- La plaque est ensuite mise dans la cuve qui est maintenue fermée hermétiquement pendant 20 min jusqu'à ce que la phase mobile migre de 6-7 cm par rapport à la ligne frontale. La plaque CCM est retirée de la cuve pour être séchée à température ambiante ;

- La plaque CCM est colorée avec la solution indicatrice, la coloration se développe après un chauffage de 1-3 min à 165°C ;

- **Lecture** :

La lecture est réalisée par un calcul du rapport frontal, exprimé par la distance de migration des échantillons par rapport à celle des acides témoins.

$$R_f = L_1 / L_2$$

L_1 : la distance de formation des spots.

L_2 : la distance de migration de la phase mobile.

5.3. **Chromatographie liquide haute performance (CLHP)** :

Cette partie a été réalisée au niveau du laboratoire de contrôle de la qualité et de la répression des fraudes d'El-Harrach, Alger.

- **Principe** :

Nous avons utilisé la technique de chromatographie liquide haute performance (CLHP) suivie par Baron, (1998) pour le dosage des acides organiques acétique et lactique. Les acides organiques peuvent être séparés sur la phase stationnaire. Ces acides sont détectés par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet. Le dosage des acides organiques est effectué par rapport à un étalon externe analysé dans les mêmes conditions.

L'analyse des échantillons a été effectuée à l'aide d'un appareillage de qualité Waters 1525 pour CLHP à pompe binaire, Waters 2487 pour le détecteur UV et Waters pour le dégazeur AF. La durée d'élution est courte, elle est obtenue par l'application d'une pression élevée de l'ordre de 300 bars, avec un volume d'injection égal 20,00 µl et un temps de rétention (RT) égal 40,00 minutes.

- **Mode opératoire** :

L'échantillon de travail est préparé selon la procédure suivante :

- Laver préalablement une cartouche avec 10 ml de méthanol puis avec 10 ml d'eau ;
- Dégazer l'échantillon ;
- Filtrer sur membrane (0,45 µm) ;

MATERIELS ET METHODES

- Prélever 8 ml d'échantillon filtré dans une seringue préalablement rincée avec l'échantillon ; faire passer sur la cartouche, éliminer les trois premiers ml et recueillir les 5 ml suivants (éviter d'amener la cartouche à sec).

L'analyse par la chromatographie comporte les étapes suivantes :

- Injecter dans le chromatographe successivement 10 µl de solution de référence et 10 µl de l'échantillon préparé, répéter trois fois ces injections dans le même ordre ;
- Enregistrer le chromatogramme.

- **Analyse qualitative :**

L'analyse qualitative consiste à déterminer les temps de rétention respectifs de chacun des composés élué. Les acides organiques de la solution de référence sont séparés dans l'ordre d'élution suivant : acide lactique, acide acétique.

- **Analyse quantitative :**

L'analyse quantitative consiste à une mesure de la surface des pics (solution de référence et l'échantillon à analyser) et la détermination de la concentration de l'acide organique de l'échantillon selon l'équation :

$$[\text{Échantillon}] = \frac{\text{Aire échantillon}}{\text{Aire standard}} \times [\text{standard}] \times \text{dilution}$$

RESULTATS ET DISCUSSIONS

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. DENOMBREMENT DES BACTERIES LACTIQUES

1. Dénombrement des bactéries lactiques en culture pure :

Les résultats du dénombrement des bactéries lactiques en culture pure sont représentés par le tableau 5.

Tableau 5 : Charge des bactéries lactiques en culture pure.

Souches	<i>Lb</i> ₁	<i>Lb</i> ₂	<i>Lb</i> ₃	<i>Lb</i> [*]	<i>Lp</i>	<i>St</i> ₁	<i>St</i> ₂	<i>St</i> ₃	<i>St</i> [*]	<i>Ba</i>	<i>Bl</i>
Nombre bactérien (bactéries /ml)	1,25 x 10 ⁸	1,59 x 10 ⁸	1,28 x 10 ⁷	1,48 x 10 ⁷	4,51 x 10 ⁷	6 x 10 ⁷	7,6 x 10 ⁷	2,69 x 10 ⁷	2,11 x 10 ⁷	2 x 10 ⁷	1,42 x 10 ⁸

Parmi toutes les cultures pures des souches des bactéries lactiques, les souches de *Lactobacillus bulgaricus* 2, *Bifidobacterium longum* et *Lactobacillus bulgaricus* 1, ont donné des meilleurs taux de croissance estimés à 1,59x10⁸, 1,42 x 10⁸ et 1,25 x 10⁸ bactéries /ml, respectivement, alors que, les souches de *Streptococcus thermophilus* 2, *Streptococcus thermophilus* 1, *Lactobacillus paracasei* 1, *Streptococcus thermophilus* 3, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* 3, ont donné des taux de croissance modérés estimés à 7,6 x 10⁷, 6 x 10⁷, 4,51 x 10⁷, 2,69 x 10⁷, 2,11 x 10⁷, 2 x 10⁷, 1,48 x 10⁷ et 1,28 x 10⁷ bactéries /ml, respectivement.

2. Dénombrement des bactéries lactiques en culture mixte :

Les résultats du dénombrement des bactéries lactiques en culture mixte sont représentés par le tableau 6.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 6 : Dénombrement des souches des bactéries lactiques en cultures mixte ($St_x + Lb_y$).

Combinaison $St_x + Lb_y$	Nombre bactérien (bactéries /ml)
$St^* + Lb_1$	2×10^6
$St^* + Lb_2$	$2,07 \times 10^7$
$St^* + Lb_3$	$5,6 \times 10^7$
$St^* + Lb^*$	$3,1 \times 10^7$
$St^* + Lp$	$2,69 \times 10^7$
$St_1 + Lb_1$	$4,8 \times 10^7$
$St_1 + Lb_2$	$1,9 \times 10^7$
$St_1 + Lb_3$	$5,9 \times 10^7$
$St_1 + Lb^*$	$1,3 \times 10^7$
$St_1 + Lp$	2×10^6
$St_2 + Lb_1$	4×10^6
$St_2 + Lb_2$	$1,57 \times 10^7$
$St_2 + Lb_3$	8×10^6
$St_2 + Lb^*$	3×10^6
$St_2 + Lp$	$8,9 \times 10^7$
$St_3 + Lb_1$	$6,4 \times 10^7$
$St_3 + Lb_2$	$8,8 \times 10^6$
$St_3 + Lb_3$	$1,57 \times 10^7$
$St_3 + Lb^*$	3×10^6
$St_3 + Lp$	$2,1 \times 10^7$

Selon le taux de croissance des bactéries lactiques en culture mixte, nous pouvons déduire la différence de l'affinité entre les souches de *Sc. thermophilus* et celles de *Lb. bulgaricus* ; de *Lb. acidophilus* et la souche de *Lb. paracasei* 1, ceci peut être expliqué par la différence des caractéristiques de croissance des souches de *Sc. thermophilus* et *Lactobacillus* ssp., individuelle ou de manière associative (Terré, 1986).

Le taux de croissance le plus élevé est celui de la combinaison de $St_2 + Lp$ ($8,9 \times 10^7$ bactéries/ml), ceci peut être dû à l'association positive des souches des bactéries lactiques en culture mixte (Amorosso et al., 1989).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Des taux de croissance importants sont trouvés avec les combinaisons types $St_3 + Lb_1$, $St_1 + Lb_3$, $St^* + Lb_3$, $St_1 + Lb_1$ et $St^* + Lb^*$, dont les nombres sont : $6,4 \times 10^7$, $5,9 \times 10^7$, $5,6 \times 10^7$, $4,8 \times 10^7$ et $3,1 \times 10^7$ bactéries/ml, respectivement. Ce ci peut être expliqué par la synergie qui existe entre *Sc. thermophilus* et *Lactobacillus* spp. , dont chaque espèce produit une ou plusieurs substances, absentes initialement dans le milieu de culture, qui stimulent la croissance de l'autre espèce, avec une augmentation de la protéolyse par le genre *Lactobacillus* et une production plus élevée d'acide lactique par les deux espèces (Kaeffer & Morgin, 1993).

3. Dénombrement des bactéries lactiques en culture mixte additionnée de bifidobactéries :

Les six meilleures combinaisons issues de l'interaction $St_x + Lb_y$ sont additionnées de *Bifidobacterium adolescentis* ou de *Bifidobacterium longum*, les résultats sont représentés par le tableau 7.

Tableau 7 : Taux de croissance des bactéries lactiques en culture mixte additionnée de *Bifidobacterium* ($St_x + Lb_y + Bif_z$).

Combinaison avec <i>Ba</i>	Nombre bactérien (bactéries /ml)	Combinaison avec <i>Bl</i>	Nombre bactérien (bactéries /ml)
$St_2 + Lp + Ba$	$1,3 \times 10^7$	$St_2 + Lp + Bl$	$3,12 \times 10^7$
$St_3 + Lb_1 + Ba$	6×10^6	$St_3 + Lb_1 + Bl$	$1,24 \times 10^8$
$St_1 + Lb_3 + Ba$	$3,9 \times 10^6$	$St_1 + Lb_3 + Bl$	$1,19 \times 10^7$
$St^* + Lb_3 + Ba$	$1,21 \times 10^7$	$St^* + Lb_3 + Bl$	$1,69 \times 10^7$
$St_1 + Lb_1 + Ba$	$3,3 \times 10^6$	$St_1 + Lb_1 + Bl$	$1,25 \times 10^7$
$St^* + Lb^* + Ba$	$9,1 \times 10^6$	$St^* + Lb^* + Bl$	$9,5 \times 10^6$

Le taux de croissance des bactéries lactiques (choisies comme meilleures combinaisons) est supérieur avec l'addition de *Bifidobactérium longum* qu'avec *Bifidobactérium adolescentis*. D'après Shah, (1997), *B. longum* résiste correctement à l'acidité et au H_2O_2 sécrétés par les ferments du yaourt (*Sc. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*) d'où l'intérêt de son emploi dans les laits fermentés.

II. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES ENTEROPATHOGENES *E.COLI* ET *S.TYPHI*

1. Etude bactériologique :

L'aspect macroscopique montre des colonies rondes légèrement jaunâtres, lisses et laiteuses, suspectées d'être *E. coli* (figure 10), et des colonies fines, vertes au centre noir suspectées d'être *S. typhi* (figure 11), ceci a été défini par les travaux de Sutra et *al.*, (1998) et Euzéby, (2006).

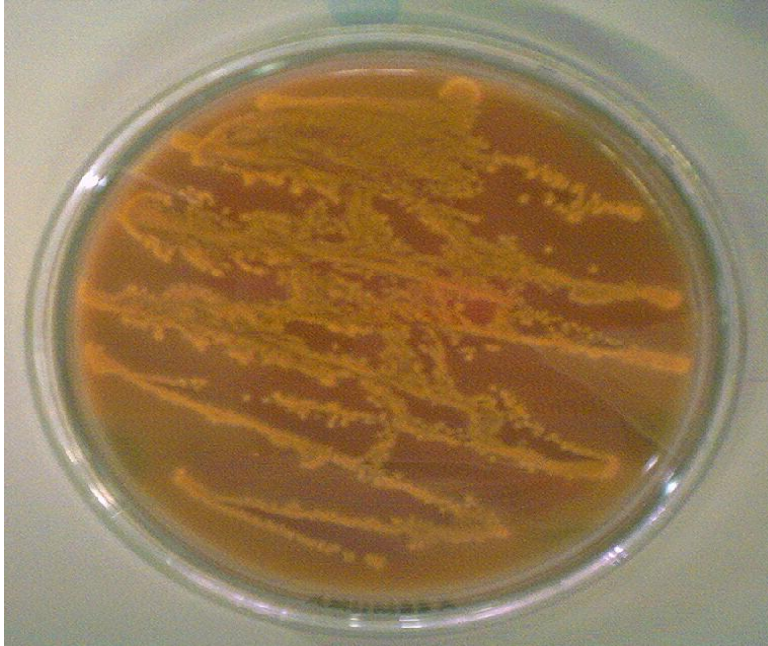


Figure 10 : Aspect macroscopique d' *E. coli* après incubation à 37°C pendant 24h.



Figure 11 : Aspect macroscopique de *S. typhi* après incubation à 37°C pendant 24h.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

L'examen microscopique a permis d'observer des bacilles fins dont la coloration de Gram est négative, correspondant à *E. coli* (figure 12) et des petits bâtonnets Gram – correspondant à *S. typhi* (figure 13), ces résultats correspondent aux caractères étudiés par Sutra *et al.*, (1998).

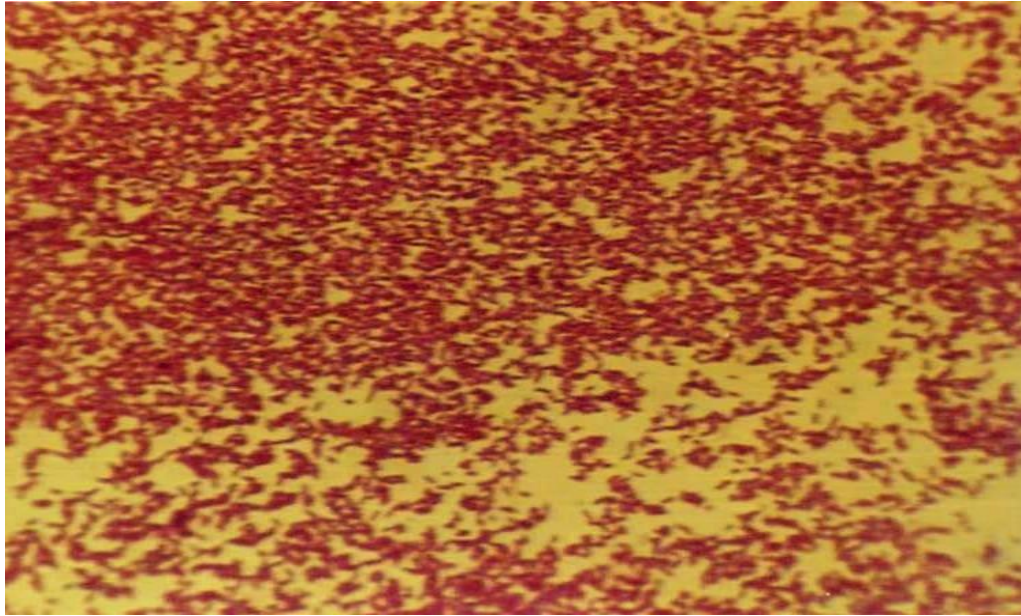


Figure 12 : Observation des cellules d'*E. coli* sous microscope optique après coloration de Gram (grossissement x 100).

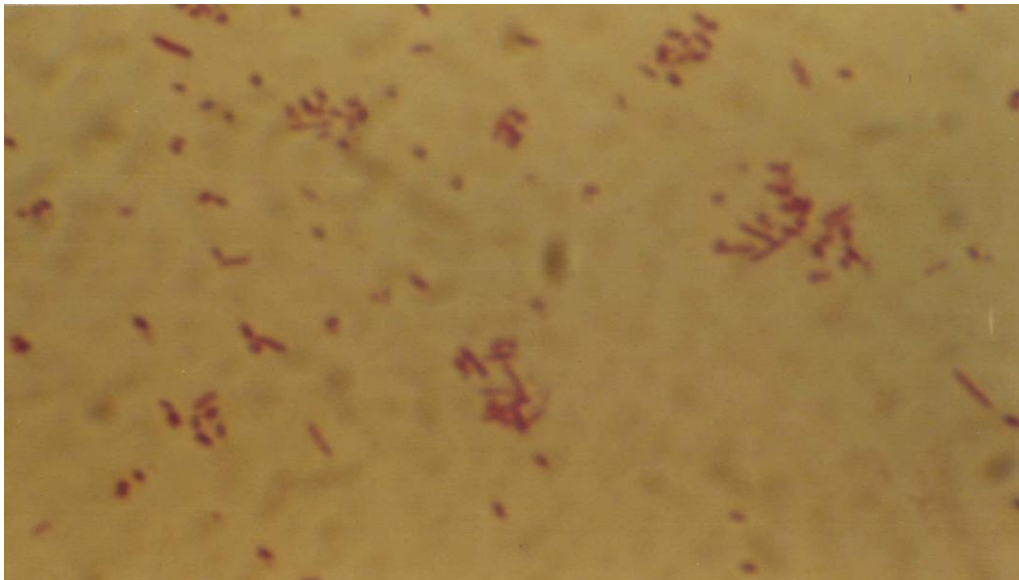


Figure 13 : Observation des cellules de *S. typhi* sous microscope optique après coloration de Gram (grossissement x 100).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

2. Identification des caractères biochimiques :

Les résultats de l'identification biochimique montrent les caractères recherchés pour *E. coli* et *S. typhi* (tableau 8).

Tableau 8 : Caractères biochimiques recherchés pour *E. coli* et *S. typhi*.

Tests		Résultats obtenus	
		<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>
Urée – indole	Uréase	-	-
	Indole	+	-
Oxydase		-	-
Catalase		+	+
ONPG		+	-
TSI	Glucose	+	+
	Saccharose	+	-
	Lactose	+	-
	H ₂ S ou gaz	Gaz	H ₂ S
LDC		+	+
ODC		+	-
ADH		-	-
Mannitol – mobilité	Mannitol	+	+
	Mobilité	+	+
Citrate de simmons		-	+

+ : Réaction positive.

- : Réaction négative.

E. coli a pu fermenter l'indole, les sucres du milieu TSI avec production du gaz et le mannitol. Elle possède aussi les enzymes suivantes : Catalase, lysine décarboxylase (LDC), ornithine décarboxylase (ODC) et β galactosidase (changement de couleur du disque ONPG). Par contre, elle ne possède pas d'oxydase, d'uréase et d' arginine dihydrolase (ADH), elle n'utilise pas le citrate. Elle est mobile. Ces caractères ont été démontrés par Larpent, (1997).

S. typhi représente les mêmes caractères biochimiques que ceux d' *E. coli*, sauf qu'elle ne fermente pas l'indole, le saccharose et le lactose. Elle produit du H₂S lors de la fermentation du TSI, elle utilise le citrate, elle possède la catalase mais elle n'a ni β galactosidase, ni ODC. Ces caractères ont été démontrés par Sutra et *al.*, (1998).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION D' *HELICOBACTER PYLORI*

1. Test rapide à l'urée :

Le test rapide à l'urée a donné un résultat positif, le changement de la couleur du milieu urée - indole de l'orange au rouge (figure 14) indique la présence de la bactérie dans la biopsie gastrique. D'après Cassel-Béraud et *al.*, (1996), cette bactérie a une particularité très marquante qui est la présence d'une activité uréase très intense ; cette propriété a été mise à profit pour un diagnostic rapide, la sensibilité de cette méthode est comprise entre 71 et 91 % à la 24^{ème} heure. L'uréase de cette bactérie hydrolyse l'urée en ammoniac et en bicarbonates dans le but de neutraliser l'acidité de l'estomac, un moyen pour adhérer aux cellules du mucus (Sobhani et *al.*, 1995).

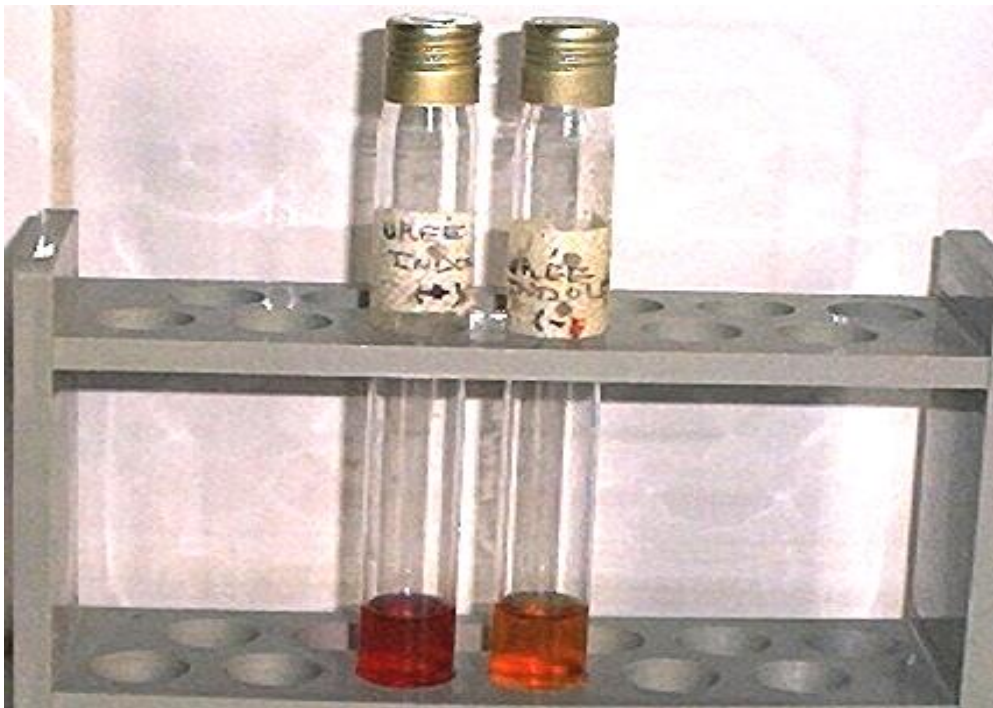


Figure 14 : Test rapide à l'urée après incubation à 37°C pendant 24h.

2. Etude Bactériologique :

Après cinq jours d'incubation sous une atmosphère micro- aérophile, de fines colonies, transparentes à grisâtres, luisantes, apparaissent dans les boîtes contenant la gélose chocolat (figure 15) ; ces caractères cultureux correspondent à *Helicobacter pylori*. L'examen microscopique a permis d'observer des bacilles de couleur rose, prouvant leur appartenance aux bactéries à caractères Gram négatif (figure 16). Ces caractères ont été démontrés par Sobhani et *al.*, (1995).

RESULTATS ET DISCUSSIONS



Figure 15 : Aspect macroscopique d' *H. pylori* après incubation à 37°C pendant 5 jours.

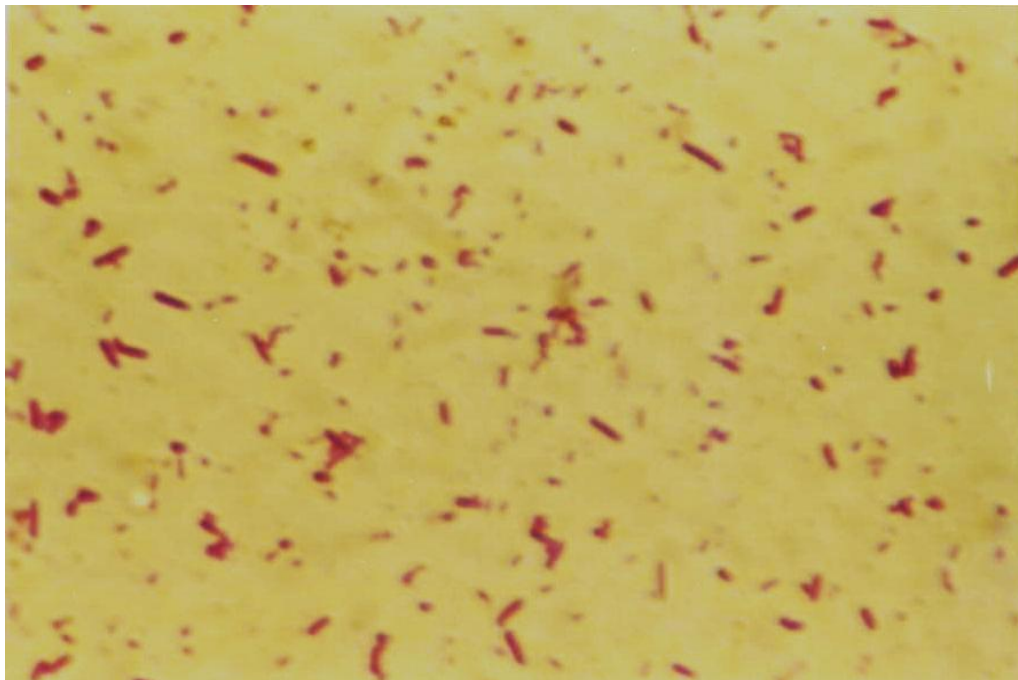


Figure 16 : Observation des cellules d' *H. pylori* sous microscope optique après coloration de Gram (grossissement x 100).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

3. Identification des caractères biochimiques :

Après 24 h d'incubation d'une galerie biochimique classique, les résultats obtenus montrent des caractères biochimiques recherchés pour identifier *H. pylori* (tableau 9).

Tableau 9 : Caractères biochimiques recherchés pour *H. pylori*.

Tests		Résultats obtenus
Urée – indole	Uréase	+
	Indole	+
Oxydase		+
Catalase		+
ONPG		-
TSI	Glucose	-
	Saccharose	-
	Lactose	-
	H ₂ S ou gaz	-
LDC		+
ODC		+
ADH		-
Mannitol – mobilité	Mannitol	-
	Mobilité	+
Citrate de simmons		+

+ : Réaction positive. - : Réaction négative.

H. pylori fermente le citrate et l'indole, possède de l'uréase, l'oxydase, la catalase, LDC et ODC, alors qu'elle présente des résultats négatifs pour les caractères biochimiques suivants : TSI, ONPG, ADH , elle ne fermente pas le mannitol. Elle présente une mobilité. Ces caractères biochimiques ont été démontrés par Monteiro, (1995).

IV. INTERACTION DES BACTERIES LACTIQUES AVEC DES BACTERIES PATHOGENES

1. Interaction des bactéries lactiques avec E.coli :

1.1. En culture pure :

L'inhibition d' *E. coli* se traduit par des zones claires autour des disques imbibés par des solutions contenant les souches des bactéries lactiques en culture pure (diamètre du disque est égal à 3mm), les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à partir du centre des disques en mm (tableau 10).

Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) d' *E. coli* par les bactéries lactiques en culture pure.

Bactéries lactiques / Bactérie pathogène	<i>St</i> ₁	<i>St</i> ₂	<i>St</i> ₃	<i>St</i> [*]	<i>Lb</i> ₁	<i>Lb</i> ₂	<i>Lb</i> ₃	<i>Lb</i> [*]	<i>Lp</i>	<i>Ba</i>	<i>Bl</i>
<i>E. coli</i>	0	0	5	0	7	4	3,5	8	10	5	6

D'après les résultats obtenus, 70% des cultures pures des bactéries lactiques utilisées ont donné une activité inhibitrice d' *E. coli*. Nahaisi, (1986) confirme que les ferments lactiques ont la capacité d'inhiber, *in vitro*, l'action des germes pathogènes Gram positifs ou négatifs.

Les meilleures zones d'inhibition ont été trouvées avec les lactobacilles (*Lp*, *Lb*^{*} et *Lb*₁) dont les diamètres sont : 10 mm, 8 mm et 7 mm, respectivement (figure 17). Cette activité a été prouvée par les travaux de Van Niel et al., (2002), où un traitement, avec les lactobacilles, donné au cours des diarrhées aiguës chez des enfants de moins de trois ans, a montré une réduction de la durée de la diarrhée d'environ 0,7 jours, et de la fréquence des selles de 1,6 selles/j, à partir du deuxième jour. Les zones d'inhibition trouvées peuvent être dues à la diminution du pH par ces bactéries lactiques (Jacobsen et al., 1999).

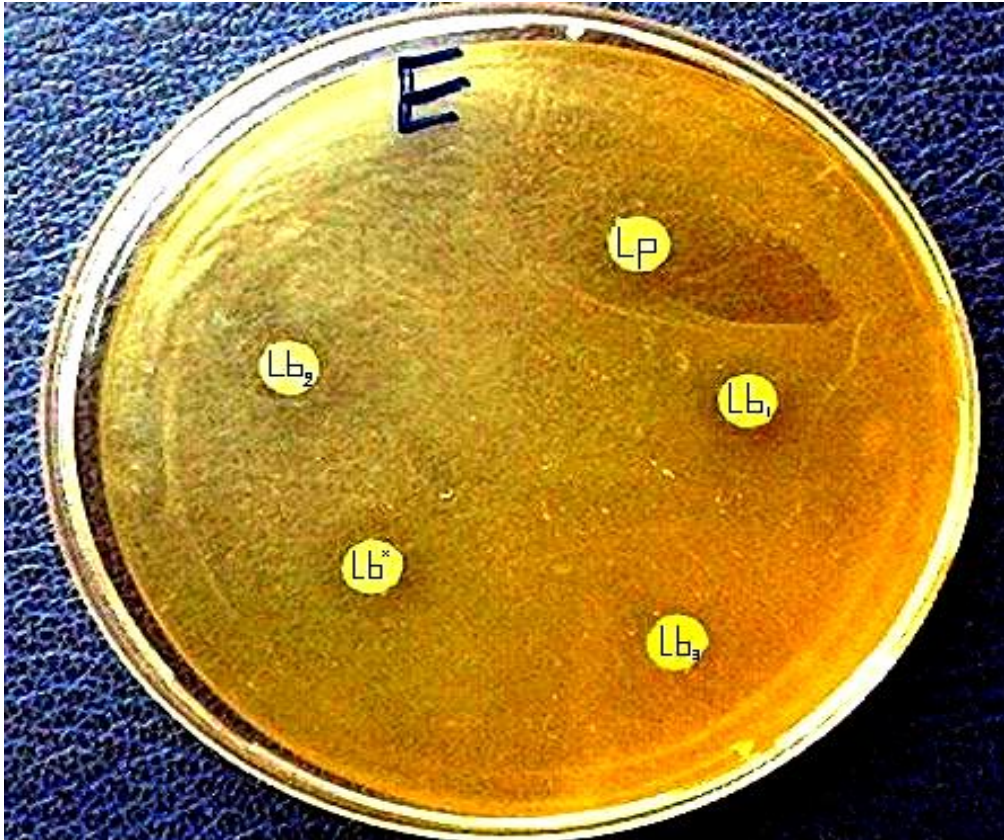


Figure 17 : Interaction d' *E. coli* avec la culture pure des bactéries lactiques.

Une activité antagonique a été aussi enregistrée avec les *Bifidobacterium* (*Bf* et *Ba*), avec des diamètres de 6 mm et 5 mm, respectivement. Les travaux, *in vitro*, de Ziemer & Gibson, (1998) ont démontré que *B. longum* peut inhiber la fixation d' *E. coli* sur les cultures Caco-2.

Parmi les quatre souches de *Sc. thermophilus* utilisées, il n'y a que la souche *St3* qui a montré un effet inhibiteur avec un diamètre de 5 mm. Les travaux de Marshall, (1987) ont montré que les souches de *Sc. thermophilus* sont souvent peu protéolytiques, du fait d'une faible activité ou de l'absence d'une protéase de la paroi, de ce fait leur croissance est limitée, les acides aminés et les peptides présents initialement dans le milieu étant insuffisants pour couvrir leurs besoins.

Nous avons enregistré un faible effet inhibiteur avec les deux souches *Lb2* et *Lb3* avec des diamètres de 4 mm et 3,5 mm, respectivement, et aucun effet inhibiteur avec les souches *St1*, *St2* et *St**.

La différence de l'activité inhibitrice se trouvant entre les souches d'une même espèce peut être due à une faible homologie de leurs acides nucléiques responsables des caractères héréditaires (Sutra et al., 1998).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1.2. En culture mixte ($St_x + Lb_y$) :

L'inhibition d' *E. coli* a été constatée avec les six meilleures cultures mixtes sélectionnées ($St_x + Lb_y$) (tableau 11).

Tableau 11 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) d' *E. coli* par les bactéries lactiques en culture mixte ($St_x + Lb_y$).

Bactéries lactiques / Bactérie pathogène	$St_2 + Lp$	$St_3 + Lb_1$	$St_1 + Lb_3$	$St^* + Lb_3$	$St_1 + Lb_1$	$St^* + Lb^*$
<i>E. coli</i>	5	4	4	4	4	5

Nous avons enregistré des diamètres des zones d'inhibition d' *E. coli* dans toutes les cultures choisies, cela peut être dû à l'effet de synergie qui existe dans la culture mixte (Driessen, 1981).

Les meilleures zones d'inhibition sont celles des combinaisons de $St^* + Lb^*$ et $St_2 + Lp$ avec un diamètre de 5 mm. Cet effet inhibiteur peut être dû à la diminution du pH qui est dû à la production de l'acide lactique (Driessen, 1981). Les travaux de Nader De Macias et al., (1993), ont démontré, *in vitro*, que *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus paracasei* en culture mixte ont un effet inhibiteur sur *E. coli*.

Toutefois, une inhibition moins importante a été enregistrée avec les cultures mixtes de $St_1 + Lb_1$; $St^* + Lb_3$; $St_1 + Lb_3$ et $St_3 + Lb_1$ avec des diamètres de 4 mm. Les travaux de Touhami et al., (1992), ont démontré l'effet inhibiteur des ferments du yaourt chez des enfants atteints de diarrhée persistante.

1.3. En culture mixte additionnée de bifidobactéries ($St_x + Lb_y + Bif_z$) :

L'inhibition d' *E. coli* a été constatée avec quelques combinaisons de cultures mixtes additionnées de bifidobactéries ($St_x + Lb_y + Bif_z$) (tableau 12).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 12 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) d' *E. coli* par les bactéries lactiques en culture mixte additionnée de *Bifidobacterium* ($St_x + Lb_y + Bif_z$).

Bactéries lactiques Bactérie pathogène	<i>E. coli</i>	Bactéries lactiques Bactérie pathogène	<i>E. coli</i>
$St_2 + Lp + Ba$	0	$St_2 + Lp + Bl$	5
$St_3 + Lb_1 + Ba$	0	$St_3 + Lb_1 + Bl$	0
$St_1 + Lb_3 + Ba$	0	$St_1 + Lb_3 + Bl$	5
$St^* + Lb_3 + Ba$	0	$St^* + Lb_3 + Bl$	4
$St_1 + Lb_1 + Ba$	0	$St_1 + Lb_1 + Bl$	8
$St^* + Lb^* + Ba$	5	$St^* + Lb^* + Bl$	10

Pour les cultures mixtes type $St_x + Lb_y + Ba$, nous avons enregistré l'inhibition qu'avec une seule combinaison $St^* + Lb^* + Ba$ (diamètre = 5 mm). Alors que, pour les cultures mixtes type $St_x + Lb_y + Bl$, nous avons enregistré des zones d'inhibition avec les combinaisons $St^* + Lb^* + Bl$, $St_1 + Lb_1 + Bl$ dont les diamètres sont de 10mm et 8mm, respectivement, d'autres inhibitions ont été constatées avec les combinaisons $St_2 + Lp + Bl$ (diamètre = 5mm), $St_1 + Lb_3 + Bl$ (diamètre = 5mm) et $St^* + Lb_3 + Bl$ (diamètre = 4mm) (figure 18). Les travaux de Bernet et al., (1993), ont démontré, que divers *Bifidobacterium* peuvent empêcher la fixation d'*E. coli* entéropathogène sur des cellules en culture de lignée Caco-2.

Gibson & Wang, (1994) ont démontré que *B. longum* a un effet inhibiteur plus important que celui de *B. adolescentis*. De même, Ziemer & Gibson, (1998), ont montré que *B. longum* aurait un puissant effet antagoniste à l'égard d' *E.coli*.

Nous n'avons pas constaté des zones d'inhibition par les combinaisons $St_2 + Lp + Ba$, $St_3 + Lb_1 + Ba$, $St_1 + Lb_3 + Ba$, $St^* + Lb_3 + Ba$, $St_1 + Lb_1 + Ba$ et $St_3 + Lb_1 + Bl$.

D'après les résultats obtenus dans l'étude de l'interaction des bactéries lactiques avec *E. coli*, la souche *Lb. paracasei* 1 a donné un grand effet inhibiteur (diamètre = 10mm) parmi toutes les cultures pures; le même effet inhibiteur a été constaté avec la combinaison des

RESULTATS ET DISCUSSIONS

cultures mixtes additionnées de *B. longum* St^+ + Lb^+ + *Bl* (diamètre = 10 mm).

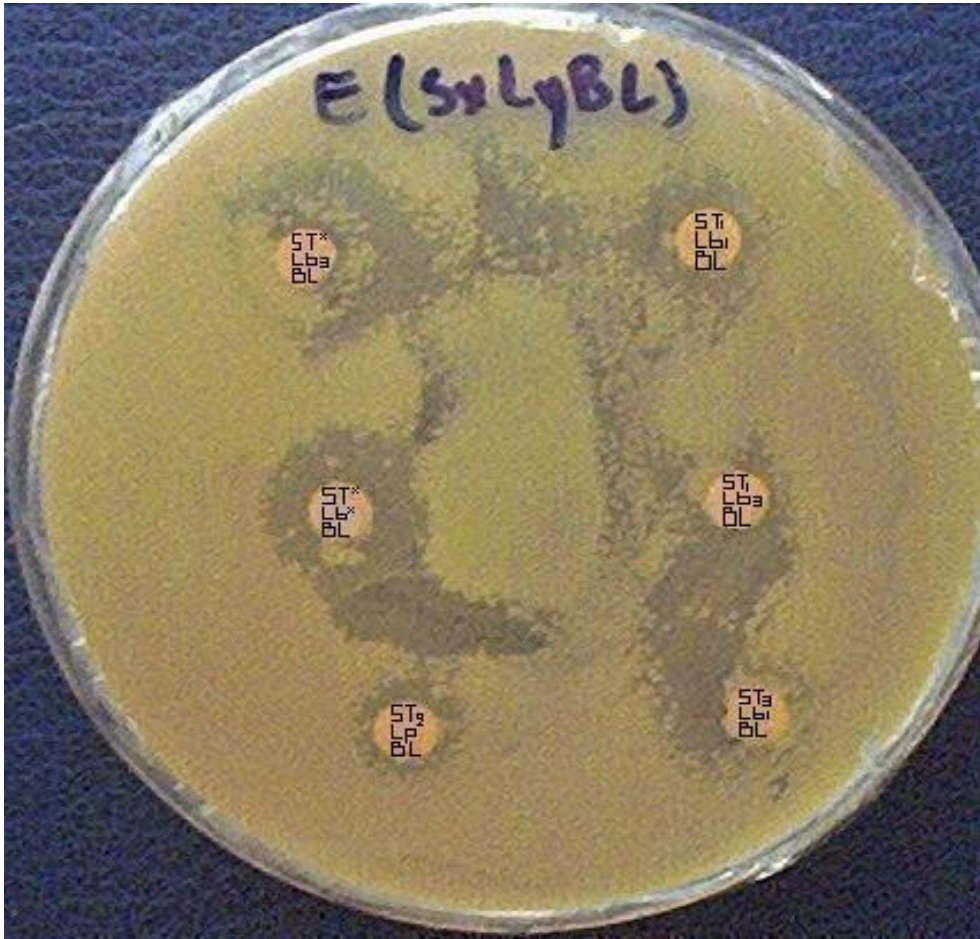


Figure 18 : Interaction d' *E. coli* avec la culture mixte des bactéries lactiques ($St_x + Lb_y + Bl$).

2. Interaction des bactéries lactiques avec *S. typhi* :

2.1. En culture pure :

L'inhibition de *S. typhi* a été enregistrée avec quelques bactéries lactiques en culture pure (tableau 13).

Tableau 13 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de *S. typhi* par les bactéries lactiques en culture pure.

Bactéries lactiques	Bactérie pathogène	St_1	St_2	St_3	St^*	Lb_1	Lb_2	Lb_3	Lb^*	Lp	Ba	Bl
		<i>S. typhi</i>	0	0	0	4	0	0	4	5	0	0

RESULTATS ET DISCUSSIONS

La meilleure zone d'inhibition de *S. typhi* a été enregistrée avec *Lb. acidophilus* (Lb^*) (diamètre = 5mm), les cultures St^* , Lb_3 et $B1$ ont donné un effet moins important (diamètre = 4mm). Les travaux de Bernet et al., (1994), ont montré, *in vitro*, que *Lactobacillus acidophilus* se fixe sur les cellules Caco-2, et si elle se trouve en quantité suffisante elle peut 'occuper le terrain' et empêcher des bactéries pathogènes d'y adhérer. Il a été démontré, *in vivo*, que l'incorporation de *Lactobacillus acidophilus* dans le régime alimentaire des nouveaux-nés nourris au biberon diminue la fréquence des diarrhées et autres désordres digestifs (Szajewska & Mrukowics, 2001).

Les travaux de Devuyst, (2004) ont montré que les souches de *Bifidobacterium* peuvent détruire *Salmonella* ; et les souches de *Lactobacillus* génèrent des substances antimicrobiennes qui contribuent à l'élimination des bactéries pathogènes.

L'absence de l'effet inhibiteur de *S. typhi* a été constaté avec St_1 , St_2 , St_3 , Lb_1 , Lb_2 , Lp et *Ba*.

2.2. En culture mixte ($St_x + Lb_y$) :

L'inhibition de *Salmonella typhi* a été constatée avec les différentes combinaisons des cultures mixtes sauf avec la combinaison $St_1 + Lb_1$ (tableau 14).

Tableau 14 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de *S. typhi* par les bactéries lactiques en culture mixte ($St_x + Lb_y$).

Bactéries lactiques \ Bactérie pathogène	$St_2 + Lp$	$St_3 + Lb_1$	$St_1 + Lb_3$	$St^* + Lb_3$	$St_1 + Lb_1$	$St^* + Lb^*$
<i>S. typhi</i>	4	4	7	5	0	4

L'inhibition de *S. typhi* par les bactéries lactiques est plus importante en culture mixte. Cet effet est dû généralement à la synergie qui existe entre les souches de *Sc. thermophilus* et celles de *Lactobacillus*.

Nous avons enregistré un diamètre de la zone d'inhibition plus grand avec la combinaison $St_1 + Lb_3$ (7mm), un effet inhibiteur a été constaté avec la combinaison $St^* + Lb_3$ (5 mm) et des diamètres moins importants (4 mm) ont été trouvés avec les combinaisons $St_2 + Lp$; $St_3 + Lb_1$ et $St^* + Lb^*$. Ces résultats corroborent avec les travaux de Van der Meer & Bovee Oudenhoven, (1998), qui ont mis en évidence, *in vitro*, un puissant pouvoir bactéricide

RESULTATS ET DISCUSSIONS

du yaourt contre *Salmonella*. Par contre, la combinaison $St_1 + Lb_1$ n'a pas donné d'inhibition.

2.3. En culture mixte additionnée de bifidobactéries ($St_x + Lb_y + Bif_z$) :

L'effet inhibiteur des deux espèces de *Bifidobacterium* a été observé (tableau 15).

Tableau 15 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de *S. typhi* par les bactéries lactiques en culture mixte additionnées de *Bifidobacterium* ($St_x + Lb_y + Bif_z$).

Bactéries lactiques / Bactérie pathogène	<i>S. typhi</i>	Bactéries lactiques / Bactérie pathogène	<i>S. typhi</i>
$St_2 + Lp + Ba$	0	$St_2 + Lp + Bl$	7
$St_3 + Lb_1 + Ba$	0	$St_3 + Lb_1 + Bl$	8
$St_1 + Lb_3 + Ba$	5	$St_1 + Lb_3 + Bl$	6
$St^* + Lb_3 + Ba$	4	$St^* + Lb_3 + Bl$	6
$St_1 + Lb_1 + Ba$	0	$St_1 + Lb_1 + Bl$	4
$St^* + Lb^* + Ba$	4	$St^* + Lb^* + Bl$	6

Pour les cultures mixtes additionnées de *B. adolescentis*, l'inhibition a été constatée avec les combinaisons $St_1 + Lb_3 + Ba$ (diamètre = 5mm), $St^* + Lb_3 + Ba$ et $St^* + Lb^* + Ba$ (diamètre = 4mm). Aucune inhibition n'a été enregistrée avec $St_2 + Lp + Ba$, $St_3 + Lb_1 + Ba$ et $St_1 + Lb_1 + Ba$.

Pour les cultures mixtes additionnées de *B. longum*, la combinaison $St_3 + Lb_1 + Bl$ a donné une meilleure zone d'inhibition (diamètre = 8mm), une inhibition importante a été aussi enregistrée avec la combinaison $St_2 + Lp + Bl$ (diamètre = 7mm) (figure 19). L'inhibition a été trouvée aussi avec les autres combinaisons, $St_1 + Lb_3 + Bl$, $St^* + Lb_3 + Bl$, $St^* + Lb^* + Bl$ (diamètre = 6mm) et $St_1 + Lb_1 + Bl$ (diamètre = 4mm).

Les résultats montrent que les inhibitions constatées dans les cultures mixtes additionnées de *Bifidobacterium longum* sont plus importantes que celles trouvées dans les cultures mixtes additionnées de *Bifidobacterium adolescentis*, les travaux de Lankaputhra et al., (1996) ont démontré que *B. longum* a un effet plus inhibiteur que celui de *B. adolescentis*.

L'interaction de *S. typhi* avec les bactéries lactiques a montré que les meilleures inhibitions sont celles trouvées avec les combinaisons des cultures mixtes additionnées de

RESULTATS ET DISCUSSIONS

B. longum : $St_3 + Lb_1 + Bl$ (diamètre= 8mm) et $St_2 + Lp + Bl$ (diamètre=7mm).



Figure 19 : Interaction de *S. typhi* avec la culture mixte de type $St_x + Lb_y + Bl$.

3. Interaction des bactéries lactiques avec *H. pylori* :

En culture pure :

L'effet inhibiteur d' *H. pylori* a été constaté avec les différentes bactéries lactiques en culture pure (tableau 16).

Tableau 16 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) d' *H. pylori* par les bactéries lactiques en culture pure.

Bactéries lactiques / Bactérie pathogène	St_1	St_2	St_3	St^*	Lb_1	Lb_2	Lb_3	Lb^*	Lp	Ba	Bl
<i>H. pylori</i>	12	0	5	7	0	6	7	8	0	0	4

La souche St_1 a donné une meilleure inhibition dont le diamètre est égal à 12mm, son effet antagonique peut être expliqué par la nature d'acide lactique sécrété qui est de type L (-) (Botazzi et al., 1973). D'autres inhibitions d' *H. pylori* ont été enregistrées avec St^* et St_3 dont

RESULTATS ET DISCUSSIONS

les diamètres sont de 7 mm et 5 mm, respectivement (figure 20).

Un autre effet inhibiteur important a été enregistré avec *Lb. acidophilus* (Lb^*) (diamètre =8mm) (figure 21). Les autres souches de *Lactobacillus* ont donné un effet antagonique avec des diamètres de 7mm pour la souche Lb_3 et 6mm pour la souche Lb_2 . Les travaux de Midolo et al., (1995) ; Felley & Michetti, (2003) ont démontré l'existence de cet antagonisme, *in vitro*, avec certaines souches probiotiques, notamment des lactobacilles et *H. pylori*.

Nous avons constaté l'absence d'inhibition avec St_2 , Lb_1 et Lp ; cette dernière serait capable d'inhiber *H. pylori* si elle était administrée avec un traitement antibiotique (Syndifrais, 2005).

Pour l'effet des deux bactéries de *Bifidobacterium* (*B. adolescentis* et *B. longum*), nous n'avons enregistré un effet inhibiteur qu'avec *B. longum* (4 mm).

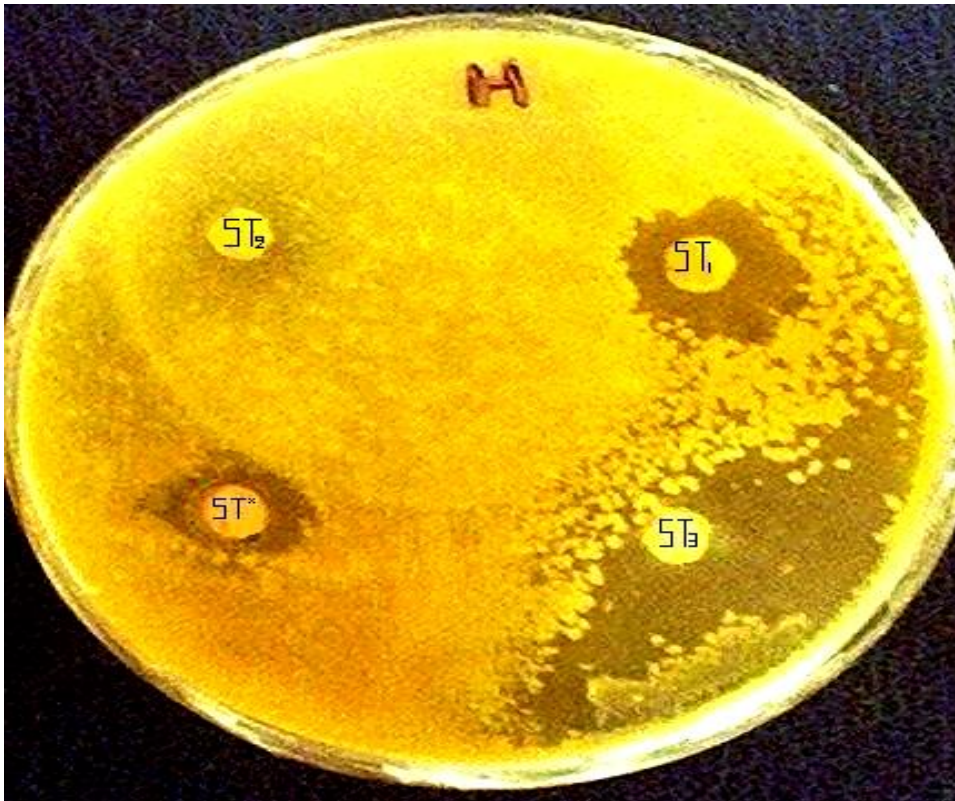


Figure 20 : Interaction d' *H. pylori* avec la culture pure des bactéries lactiques type St_x .

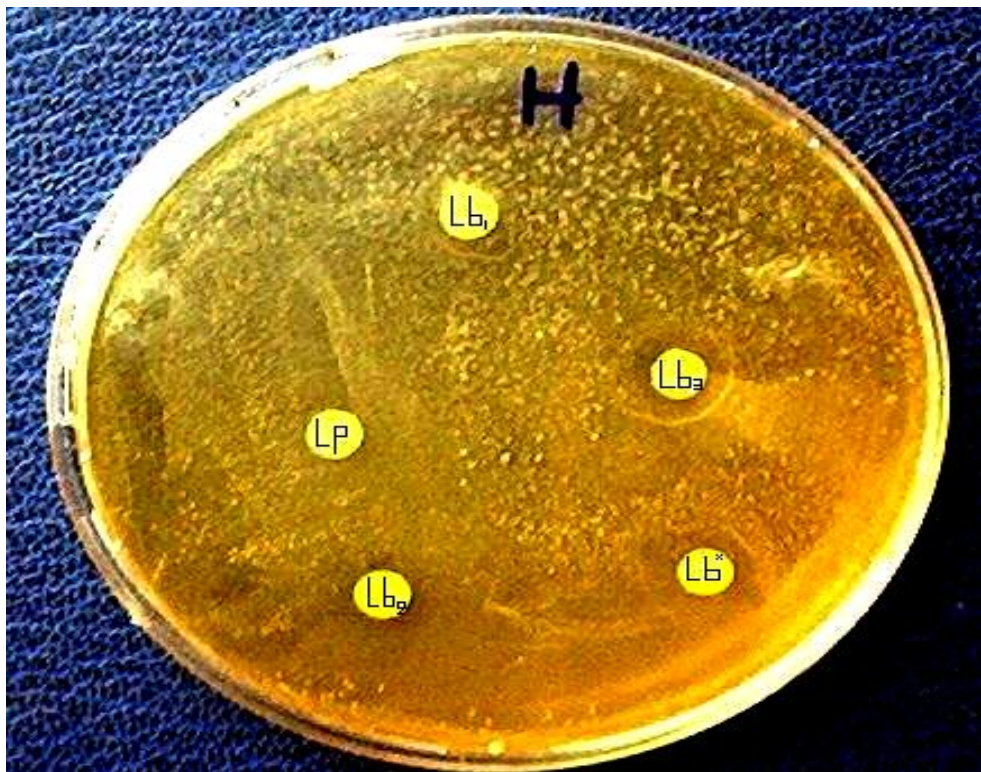


Figure 21 : Interaction d'*H. pylori* avec la culture pure des bactéries lactiques type *Lb_y*

En culture mixte :

L'inhibition n'a été observée qu'avec les deux combinaisons $St^* + Lb^*$ et $St_1 + Lb_1$ (tableau 17).

Tableau 17 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) d' *H. pylori* par les bactéries lactiques en culture mixte ($St_x + Lb_y$).

Bactéries lactiques / Bactérie pathogène	$St_2 + Lp$	$St_3 + Lb_1$	$St_1 + Lb_3$	$St^* + Lb_3$	$St_1 + Lb_1$	$St^* + Lb^*$
<i>H. pylori</i>	0	0	0	0	3,5	5

Nous avons enregistré une zone d'inhibition avec la combinaison $St^* + Lb^*$ (diamètre = 5mm) une autre zone d'inhibition moins importante a été enregistrée avec la combinaison $St_1 + Lb_1$ (diamètre =3,5). Les travaux de Mrda et al., (1998) ont montré que la consommation d'un lait fermenté n'est pas efficace pour éradiquer *H. pylori*, *in vivo*, alors que l'administration de lait fermenté avec *Lb. acidophilus* a éradiqué *H. pylori*. Ces travaux confirment aussi l'absence des zones d'inhibition pour les combinaisons $St_2 + Lp$; $St_3 + Lb_1$; $St_1 + Lb_3$ et $St^* + Lb_3$.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

En culture mixte additionnée de bifidobactéries ($St_x + Lb_y + Bif_z$) :

L'effet inhibiteur n'a été enregistré qu'avec quatres combinaisons des bactéries lactiques (tableau 18).

Tableau 18 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) d' *H. pylori* par les bactéries lactiques en culture mixte additionnée de *Bifidobacterium* ($St_x + Lb_y + Bif_z$).

Bactéries lactiques / Bactérie pathogène	<i>H. pylori</i>	Bactéries lactiques / Bactérie pathogène	<i>H. pylori</i>
$St_2 + Lp + Ba$	0	$St_2 + Lp + Bl$	0
$St_3 + Lb_1 + Ba$	0	$St_3 + Lb_1 + Bl$	0
$St_1 + Lb_3 + Ba$	0	$St_1 + Lb_3 + Bl$	4
$St^* + Lb_3 + Ba$	0	$St^* + Lb_3 + Bl$	0
$St_1 + Lb_1 + Ba$	0	$St_1 + Lb_1 + Bl$	4
$St^* + Lb^* + Ba$	4	$St^* + Lb^* + Bl$	5

Avec *B. adolescentis*, une zone d'inhibition a été enregistrée avec la combinaison $St^* + Lb^* + Ba$, seulement, dont le diamètre est de 4mm. Avec *B. longum*, des zones d'inhibition ont été enregistrées avec les combinaisons $St^* + Lb^* + Bl$ (5 mm), $St_1 + Lb_1 + Bl$ (4mm) et $St_1 + Lb_3 + Bl$ (4 mm), pour les combinaisons $St_2 + Lp + Bl$; $St_3 + Lb_1 + Bl$ et $St^* + Lb_3 + Bl$ l'effet inhibiteur est absent.

L'augmentation du diamètre de la zone d'inhibition pour la combinaison $St^* + Lb^* + Bl$ (diamètre= 5mm) peut être expliqué par la présence de *Lb. acidophilus* (Lb^*). Les travaux de Wang et al., (2004) ont rapporté que la consommation régulière de yogourt additionné de *Bifidobacterium* induit une suppression effective de l'infection due à *H. pylori*.

L'étude de l'interaction entre les bactéries lactiques et *H. pylori*, nous a permis de déduire que l'effet majeur a été observé dans les cultures pures, de *Sc. thermophilus* 1 (diamètre = 12mm) et de *Lb. acidophilus* (diamètre = 8mm).

V. ANALYSE DES ACIDES ORGANIQUES DES BACTERIES LACTIQUES SELECTIONNEES

L'inhibition des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques a été démontrée par nos résultats et par les travaux publiés dans le domaine qui confirment que les ferments lactiques ont la capacité d'inhiber l'activité des germes pathogènes en produisant certaines substances antimicrobiennes.

Selon Rouchy, (2001), l'inhibition des bactéries indésirables ou pathogènes par les probiotiques peut se faire de différentes façons:

- Production du peroxyde d'hydrogène;
- Production des substances type bactériocines.
- La production d'acides organiques (acide lactique ou acide acétique).

D'après Monteiro, (1995) ; Sutra et *al.*, (1998) *H. pylori*, *S. typhi* et *E. coli*, sont des Gram négatifs et ont une catalase très active, donc elles peuvent se débarrasser du peroxyde d'hydrogène. Selon Richoux, (2005), les bactériocines sont des substances antimicrobiennes qui agissent que sur les Gram positifs, ce qui nous a permis de réaliser dans notre étude, une analyse des acides organiques (acide lactique et acide acétique) dans les cultures bactériennes ayant montré un net effet inhibiteur avec deux techniques de chromatographie (CCM et HPLC).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Chromatographie sur couche mince (CCM):

Les rapports frontaux (Rf) calculés sont représentés par le tableau 19, dont la distance de la migration de la phase mobile L_2 est égal à 7 cm.

Tableau 19 : Rapports frontaux des spots de la révélation des acides organiques.

Dépôts	L_1 (cm)	$Rf = L_1 / L_2$
Acide lactique + acide acétique (Al + Aa)	5	0,71
Acide acétique (Aa)	5,7	0,81
Acide citrique (Ac)	1	0,14
Acide propionique (Ap)	5,9	0,84
Acide lactique (Al)	5,2	0,74
Surnagent de la culture <i>H. pylori</i> + St_1	5,2	0,74
Surnagent de la culture <i>H. pylori</i> + Lb^*	5,2	0,74
Surnagent de la culture <i>E. coli</i> + Lp	5,2	0,74
Surnagent de la culture <i>E. coli</i> + ($St^* + Lb^* + Bl$)	5,2	0,74
Surnagent de la culture <i>S. typhi</i> + ($St_3 + Lb_1 + Bl$)	5,2	0,74
Surnagent de la culture <i>S. typhi</i> + ($St_2 + Lp + Bl$)	5,2	0,74

La distance L_1 des différents spots, démontre une meilleure migration pour les acides organiques lactique, acétique, propionique et même l'association lactique et acétique, alors que l'acide citrique donne une faible distance de migration (tableau 19, figure 22).

Les cultures (qu'elles soit pures ou mixtes) ont donné un $Rf = 0,74$, qui est identique à celui de l'acide lactique, donc on peut déduire que dans les différentes cultures (bactéries lactiques + bactéries pathogènes) où il y'a eu des inhibitions, l'acide lactique et le principal acide organique présent.



Figure 22 : Séparation des acides organiques par CCM.

- 1 : acide lactique + acide acétique (Al + Aa).
- 2 : acide acétique (Aa).
- 3 : acide citrique (Ac).
- 4 : acide propionique (Ap).
- 5 : acide lactique (Al).
- 6 : surnagent de la culture *H. pylori* + *St*₁.
- 7 : surnagent de la culture *H. pylori* + *Lb*^{*}.
- 8 : surnagent de la culture *E. coli* + *Lp*.
- 9 : surnagent de la culture *E. coli* + (*St*^{*} + *Lb*^{*} + *Bl*).
- 10 : surnagent de la culture *S. typhi* + (*St*₃ + *Lb*₁ + *Bl*).
- 11 : surnagent de la culture *S. typhi* + (*St*₁ + *Lp* + *Bl*)

2. Chromatographie liquide haute performance (CLHP) :

Analyse qualitative :

La détection des deux standards injectés : acide lactique et acide acétique par un spectrophotomètre UV, permet d'obtenir deux pics qui résultent de l'absorption (AU) de ces deux acides organiques en fonction du temps de rétention (RT), dont l'éluion a été effectuée dans l'ordre acide lactique, acide acétique (figure 23).

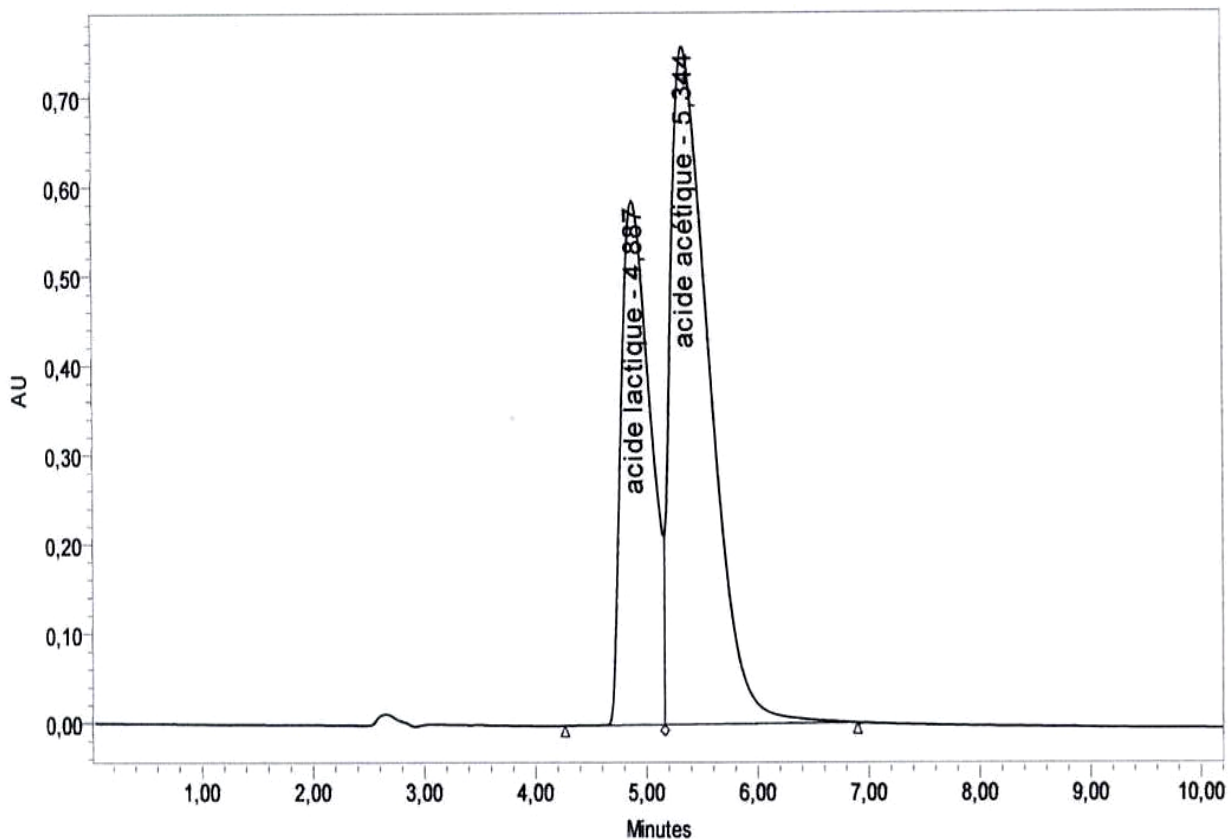


Figure 23 : Séparation du mélange acide acétique/ acide lactique.

La détection des acides organiques lactique et acétique par chromatographie liquide haute performance dans les échantillons préparés à partir des meilleurs cultures bactériennes qui ont montré un effet inhibiteur important, a permis d'obtenir des pics résultant de l'absorption (AU) en fonction du temps de rétention (RT) (figure 24, 25, 26, 27, 28, 29).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

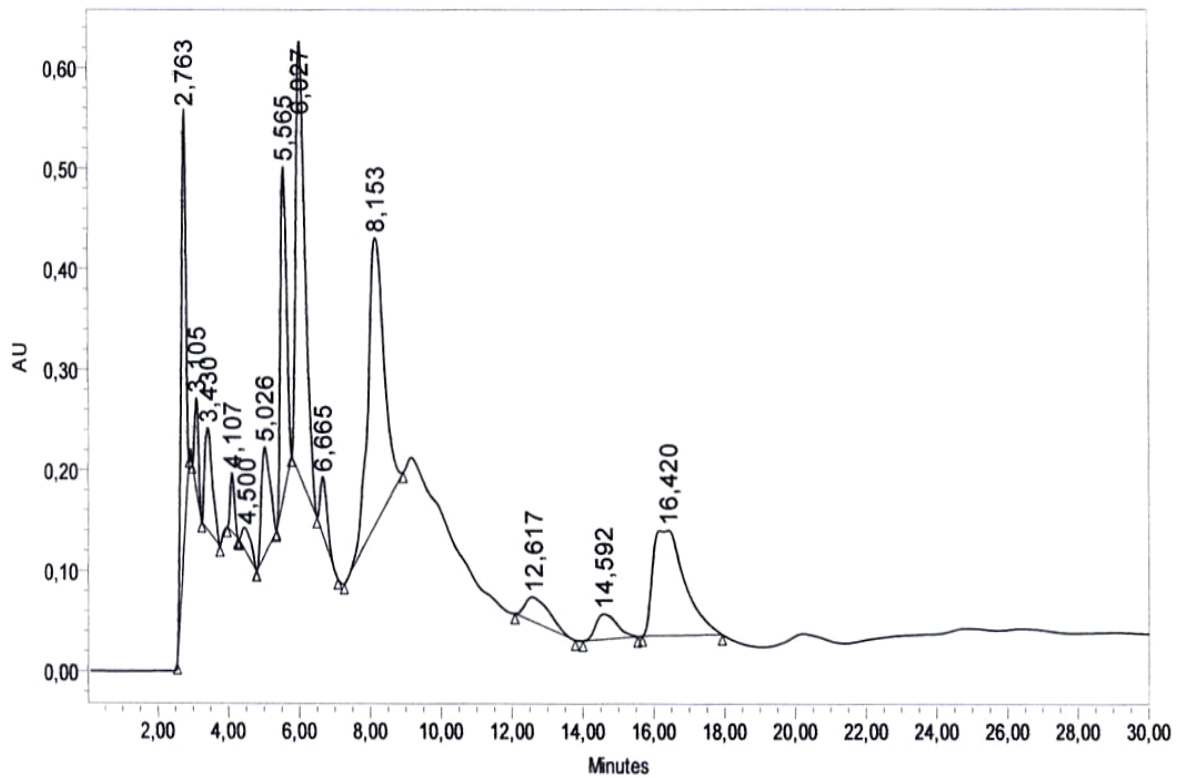


Figure 24 : Séparation des acides organiques de l'échantillon *H. pylori* + *St*₁

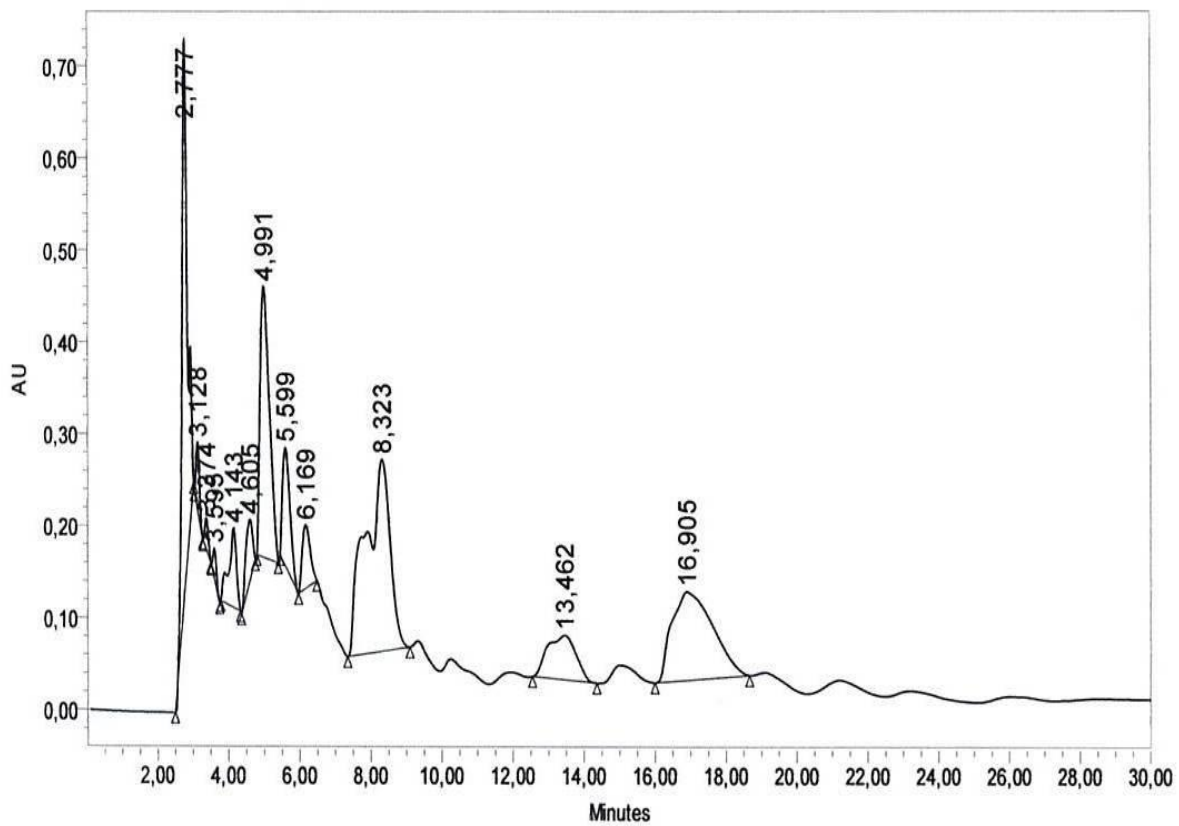


Figure 25 : Séparation des acides organiques de l'échantillon *H. pylori* + *Lb*^{*}

RESULTATS ET DISCUSSIONS

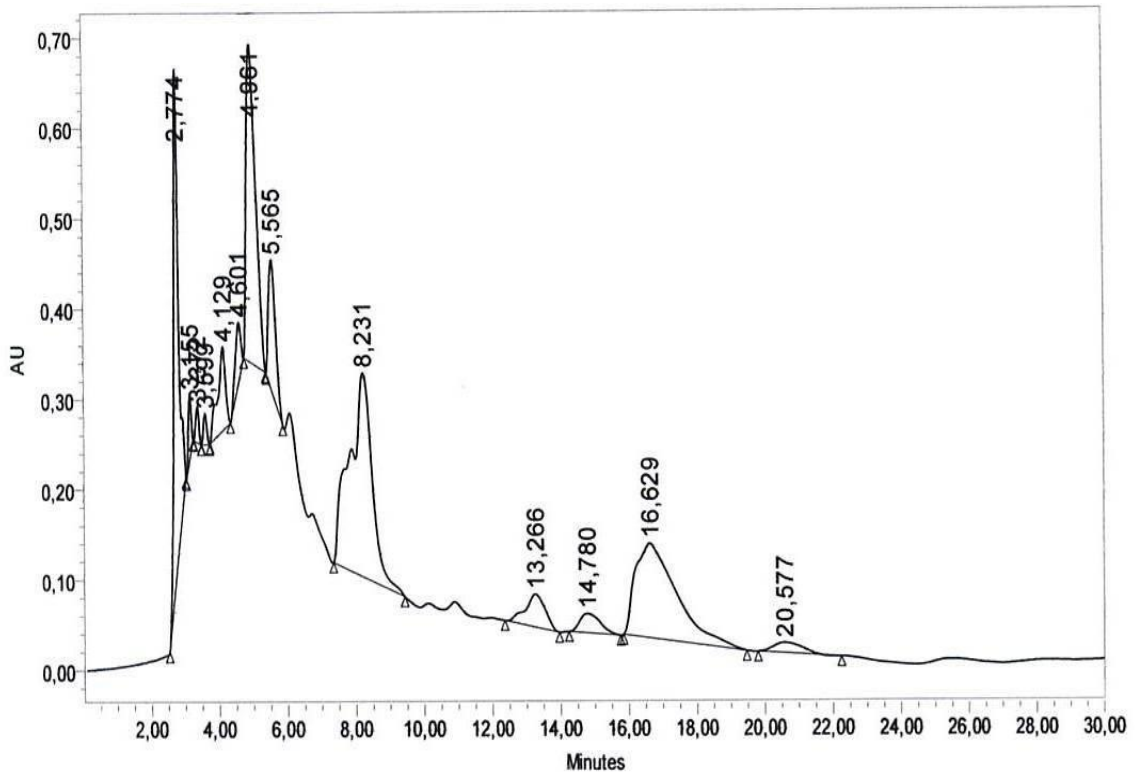


Figure 26 : Séparation des acides organiques de l'échantillon *E. coli* + *Lp*

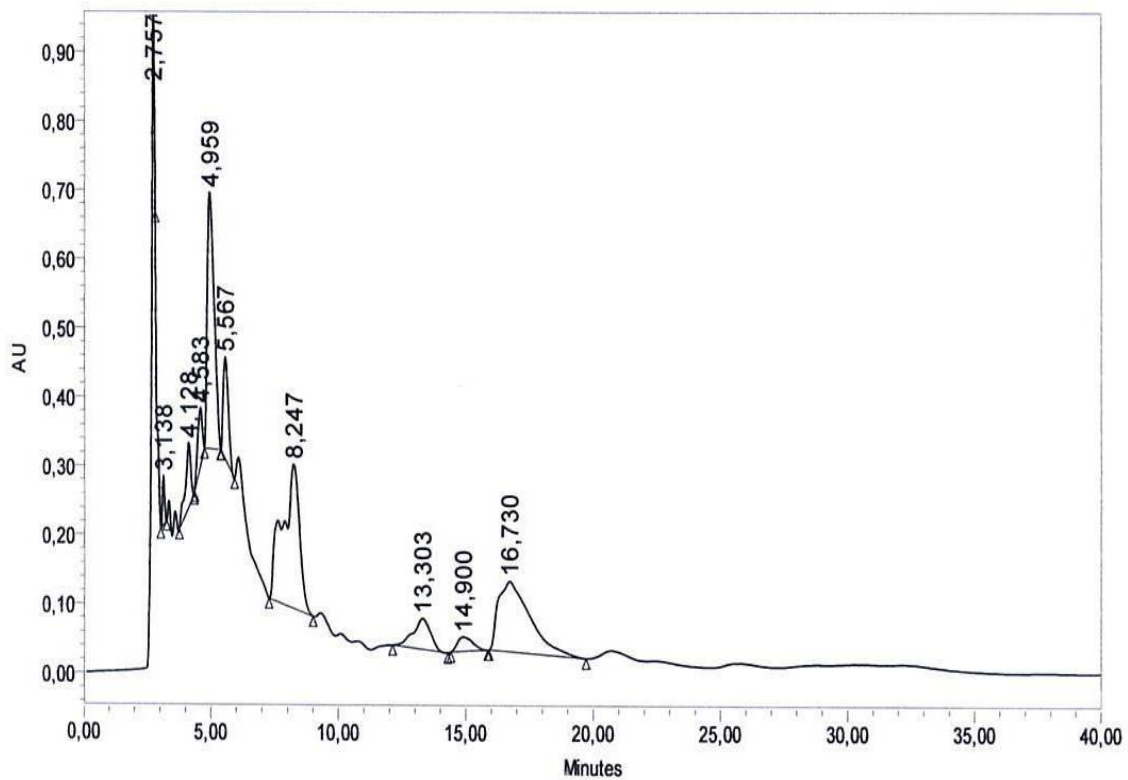


Figure 27 : Séparation des acides organiques de l'échantillon *E. coli* + (*St** + *Lb** + *Bl*).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

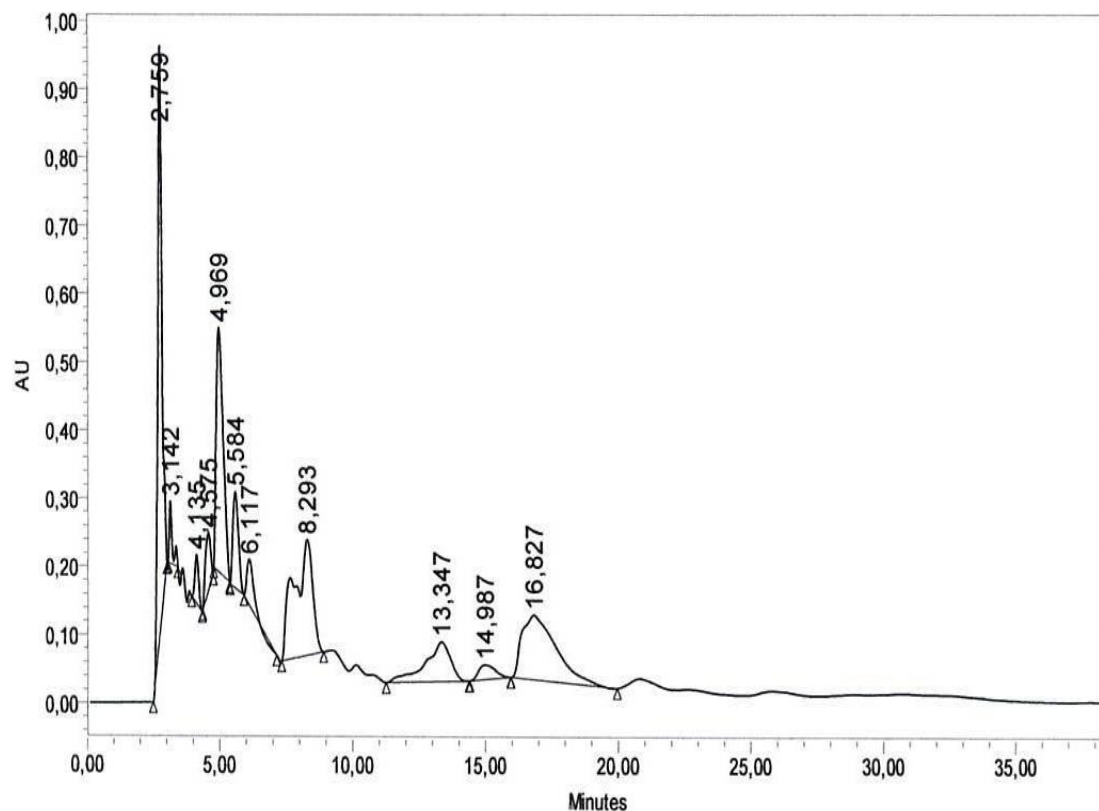


Figure 28 : Séparation des acides organiques de l'échantillon *S. typhi* + (St_3 + Lb_1 + Bl).

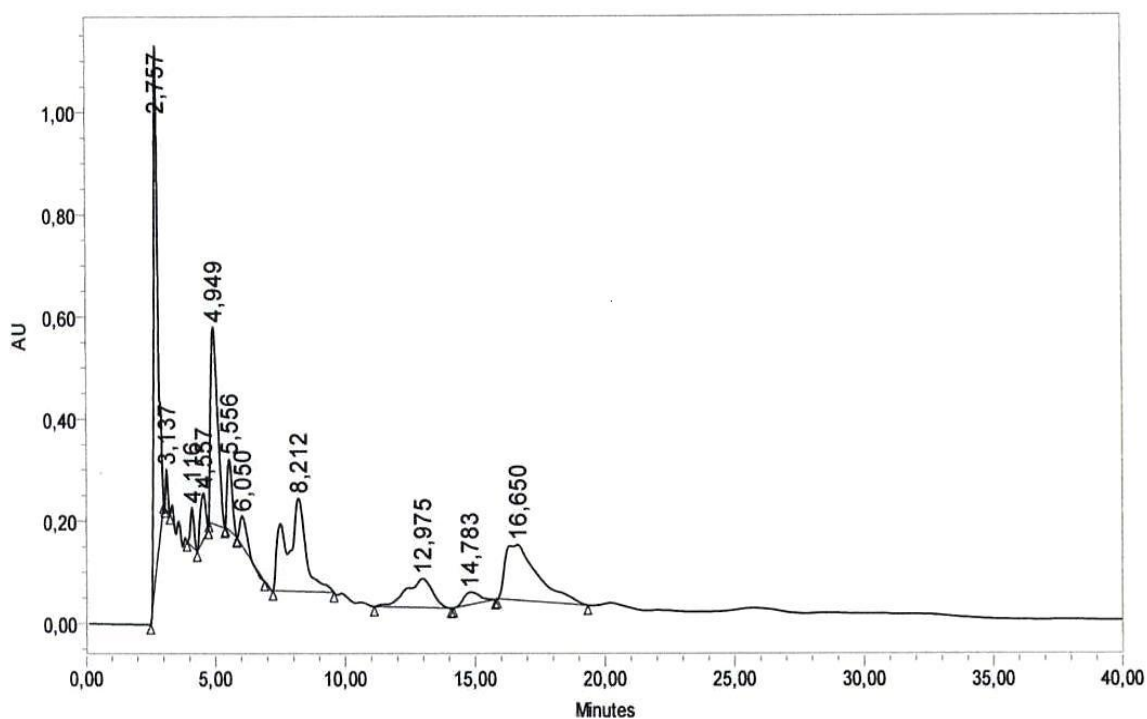


Figure 29 : Séparation des acides organiques de l'échantillon *S. typhi* + (St_2 + Lp + Bl).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Le phénomène de plusieurs pics observés peut être dû à la présence de certaines substances (impuretés, substances du milieu de culture, substances présentes au préalable dans la colonne, autres substances antibactériennes ...etc.).

Afin de déterminer l'acide organique responsable de cette inhibition, une comparaison est faite par le calcul de la différence entre le temps de rétention du pic standard et celui du pic très proche (en terme de valeur de RT). Selon la figure 23, le RT du pic de l'acide lactique est de 4,887 min, celui de l'acide acétique est de 5,344 min, nous avons obtenu les résultats qui sont représentés par le tableau 20 et le tableau 21.

Tableau 20 : Analyse qualitative de l'acide lactique.

Echantillon	RT (min)	D (différence en min)
<i>H. pylori</i> + <i>St</i> ₁	5,026	0,139
<i>H. pylori</i> + <i>Lb</i> [*]	4,991	0,104
<i>E. coli</i> + <i>Lp</i>	4,961	0,074
<i>E. coli</i> + (<i>St</i> [*] + <i>Lb</i> [*] + <i>Bl</i>)	4,959	0,072
<i>S. typhi</i> + (<i>St</i> ₃ + <i>Lb</i> ₁ + <i>Bl</i>)	4,969	0,082
<i>S. typhi</i> + (<i>St</i> ₂ + <i>Lp</i> + <i>Bl</i>)	4,949	0,062

Tableau 21 : Analyse qualitative de l'acide acétique.

Echantillon	RT (min)	D (différence en min)
<i>H. pylori</i> + <i>St</i> ₁	5,565	0,221
<i>H. pylori</i> + <i>Lb</i> [*]	5,599	0,255
<i>E. coli</i> + <i>Lp</i>	5,565	0,221
<i>E. coli</i> + (<i>St</i> [*] + <i>Lb</i> [*] + <i>Bl</i>)	5,567	0,223
<i>S. typhi</i> + (<i>St</i> ₃ + <i>Lb</i> ₁ + <i>Bl</i>)	5,584	0,240
<i>S. typhi</i> + (<i>St</i> ₂ + <i>Lp</i> + <i>Bl</i>)	5,556	0,212

L'analyse qualitative de l'acide lactique, a donné des petites différences (D) par rapport au temps de rétention (RT) de l'acide lactique standard pour toutes les cultures bactériennes choisies (tableau 20).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Alors que, l'analyse qualitative de l'acide acétique, a donné des grandes différences (D) par rapport au temps de rétention de l'acide acétique standard, pour toutes les cultures bactériennes choisies (tableau 21). Ces résultats démontrent que l'inhibition des trois souches pathogènes (*H. pylori*, *E. coli* et *S. typhi*) peut être dûe à la présence de l'acide lactique (Novel, 1993).

Analyse quantitative :

L'analyse qualitative a démontré l'absence de l'acide acétique et la présence de l'acide lactique dont nous avons réalisé l'analyse quantitative. La détermination de la quantité d'acide lactique a été effectuée selon la loi suivante :

$$[\text{Échantillon}] = \frac{\text{Aire échantillon}}{\text{Aire standard}} \times [\text{standard}] \times \text{dilution}$$

Pour l'acide lactique :

$$[\text{Échantillon}] = \frac{\text{Aire échantillon}}{10648567} \times 6,9 \times \frac{1}{20 \times 3}$$

Les aires des pics de l'acide lactique et les échantillons utilisés sont représentés dans l'annexe 5.

Tableau 22 : Analyse quantitative de l'acide lactique.

Culture bactérienne	La concentration de l'acide lactique (g/l)
<i>H. pylori</i> + <i>St</i> ₁	0,019
<i>H. pylori</i> + <i>Lb</i> [*]	0,058
<i>E. coli</i> + <i>Lp</i>	0,069
<i>E. coli</i> + (<i>St</i> [*] + <i>Lb</i> [*] + <i>Bl</i>)	0,075
<i>S. typhi</i> + (<i>St</i> ₃ + <i>Lb</i> ₁ + <i>Bl</i>)	0,070
<i>S. typhi</i> + (<i>St</i> ₂ + <i>Lp</i> + <i>Bl</i>)	0,077

RESULTATS ET DISCUSSIONS

D'après les résultats obtenus (tableau 22), nous pouvons enregistrer des quantités d'acide lactique sécrétées par la souche *St*₁' (0,019g/l) et *Lb. acidophilus* (*Lb*^{*}) (0,058 g/l). L'effet inhibiteur de *Lactobacillus acidophilus* par production de l'acide lactique a été enregistré, *in vitro*, par les travaux de Midolo et al., (1995). Les travaux de Coconnier et al., (1998) ont démontré que le surnagent de fermentation de *Lactobacillus acidophilus* était capable d'inhiber, *in vitro*, la viabilité d' *H. pylori*.

Des concentrations ont été enregistrées dans l'inhibition d'*E. coli* par la souche *Lp* (0,069 g/l) et par la combinaison *St*^{*} + *Lb*^{*} + *Bl* (0,075 g/l). Plusieurs travaux ont pu démontrer que *Lb. acidophilus* d'origine humaine tué par la chaleur (30min à 110°C) était capable d'inhiber la fixation d'*E. coli* (Coconnier et al., 1993). L'inhibition d' *E.coli* par les cultures mixtes peut être dûe aussi à la production importante de l'acide par les *Lactobacillus* par rapport au *Streptococcus thermophilus* (Marshall, 1982)

Des concentrations de 0,070 g/l et de 0,077 g/l sont retrouvées respectivement dans les combinaisons de *St*₃ + *Lb*₁+ *Bl* et *St*₂ + *Lp*+ *Bl* responsables de l'inhibition de *S. typhi*. Van der Meer & Bovee Oudenhoven, (1998) a trouvé que l'acide lactique inhibe la survie intestinale de *Salmonella*. Cet acide est le seul responsable du renforcement de la barrière gastrique vis-à-vis des *Salmonella*.

Nous avons constaté que dans les cultures mixtes des bactéries lactiques, la concentration de l'acide lactique est plus importante, ceci est du à l'effet de synergie des deux genres *Lactobacillus* et *Streptococcus*.

Les travaux de Midolo et al., (1995) ; Sutra et al., (1998) ont annoncé que l'inhibition des bactéries pathogènes ne dépend pas de la quantité d'acide organique produit par les bactéries lactiques, mais liée au type (L (-), D(+)) ou les deux) et la forme dissociée ou non de l'acide organique. L'effet du pH est renforcé par la forme sous laquelle se trouvent l'acide lactique et les autres acides organiques produits lors des fermentations. En effet, c'est la forme non dissociée de l'acide lactique qui prédomine à pH acide, elle est généralement plus toxique pour les cellules microbiennes.

L'acidification du milieu suffirait à inhiber de nombreuses bactéries pathogènes, l'acide lactique inhiberait le métabolisme oxydatif, en diminuant le pH intracellulaire et finalement serait bactéricide (Novel, 1993).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les acides ont un double effet antimicrobien : un effet via l'acidification qu'ils engendrent, et un effet spécifique de l'acide utilisé. Les microorganismes n'ont pas la même sensibilité au pH. Les acides faibles étant lipophiles, sont capables de traverser la membrane et agir directement sur le pH cytoplasmique. Les acides organiques étant pour la plupart des acides faibles, ils vont donc agir plus efficacement pour inhiber les microorganismes (Chene, 2002).

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'interaction des bactéries lactiques qui ont donné les meilleures charges microbiennes après dénombrement et les bactéries pathogènes isolées a montré des inhibitions dans les cultures pures et mixtes.

Les souches de *Lactobacillus bulgaricus* 2, *Bifidobacterium longum* et *Lactobacillus bulgaricus* 1 ont donné des taux élevés de bactéries parmi toutes les cultures pures des bactéries lactiques dénombrées. Pour les cultures mixtes type $St_x + Lb_y$, les meilleures croissances sont celles des combinaisons $St_2 + Lp$, $St_3 + Lb_1$, $St_1 + Lb_3$, $St^* + Lb_3$, $St_1 + Lb_1$ et $St^* + Lb^*$. L'addition de bifidobactéries aux six meilleures combinaisons, issues de dénombrement des cultures mixtes, a donné des charges bactériennes supérieures avec l'addition de *Bifidobacterium longum* qu'avec *Bifidobacterium adolescentis*.

L'isolement des bactéries pathogènes a été confirmé par l'identification bactériologique et biochimique.

L'interaction d' *E. coli* avec les bactéries lactiques a donné des effets inhibiteurs importants avec la culture pure de *L. paracasei* 1 (*Lp*) et avec la combinaison de culture mixte additionnée de *Bifidobacterium longum* ($St^* + Lb^* + Bl$).

Pour *S. typhi*, les résultats des interactions ont montré les meilleures zones d'inhibition avec les combinaisons des cultures mixtes additionnées de *Bifidobacterium longum* ($St_3 + Lb_1 + Bl$ et $St_2 + Lp + Bl$).

Les effets inhibiteurs importants ont été aussi constatés dans le cas de *H. pylori* avec les cultures pures de la souche *Streptococcus thermophilus* 1 (St_1) et *Lactobacillus acidophilus* (Lb^*).

L'analyse des acides organiques (acide lactique et acide acétique) par la chromatographie sur couche mince (CCM) des bactéries lactiques sélectionnées a donné des rapports frontaux qui correspondent à celui de l'acide lactique.

L'analyse qualitative et quantitative des acides organiques par chromatographie liquide haute performance (CLHP) a confirmé aussi la présence de l'acide lactique et il pourrait être seul ou associé à d'autres substances responsables dans l'inhibition d' *E. coli*, de *S. typhi* et de *H. pylori*.

Ces résultats suggèrent que l'utilisation de ces souches de bactéries lactiques comme probiotiques permettraient mieux de protéger l'homme contre les bactéries responsables de la physiopathologie gastro-intestinale (diarrhées, typhoïde, ulcère...etc.)

Enfin, il serait intéressant d'analyser la composition chimique des différentes substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques et d'entreprendre une étude, *in vivo*, pour confirmer les résultats obtenus, *in vitro*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMOROSSO M.J., MANCADE NADRA M.C. & DIVER G. (1989). The growth and sugar utilization by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* isolated from market yoghurt. *Le lait*, 69(6) : 519-528.
- AVRIL J.L., DABERNAT H., DENIS F. & MONTAIL H. (2000). *Helicobacter pylori*. *Bacteriol. Clin.* 30: 406-410.
- BARON, M. (1998). Étude de l'impact de l'ajout des bifidobactéries sur les cinétiques de fermentation des bactéries lactiques mésophiles utilisées dans la production de fromage frais. *Mémoire*, Université Laval, 108 p.
- BARTOSCH S., WOODMANSEY E. J., PATERSON J. C., MCMURDO M. E. & MACFARLANE G. T. (2005). Microbiological effects of consuming a symbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 40 : 28-37.
- BAYOUB K., ELOTMANI F., ASSOBEI O., JAOUA S. & SOUKRI A. (2006). Contribution à l'étude des bactériocines produites par des souches isolées du lait fermenté traditionnel « Raïb ». *Congrès international de biochimie*, Agadir, pp : 410-420.
- BEERENS H. & LUQUET F.M. (1987). Guide pratique d'analyse microbiologique des laits et produits laitiers. Ed : *Lavoisier*, Paris, 144 : 107- 108.
- BELIARD E. & THUAULT D. (1989). Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. In : *Microbiologie alimentaire*. Ed : *Lavoisier*, pp : 282-293.
- BERGERON M. & DUFOUR J.C. (2004). Protagonistes de l'immunité innée dans les infections à salmonelles. *Médecine Sciences*, 12p.
- BERNET M.F., BRASSART D., NEESER J.R. & SERVIN A.L. (1993). Adhesion of human *Bifidobacteria* strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 : 4121-4128.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERNET M.F., BRASSART D., NEESER J.R. & SERVIN A.L. (1994). *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal epithelial cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria.
Gut, 35: 483-489.
- BIGARD M. A. (2004). L'ulcère gastroduodenal associé à l' *Helicobacter pylori*.
Rev de Formation Médicale Continue, n° 29, 24 : 6-9.
- BJORKSTEN B. (2004). Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy.
Springer Seminras in Immunopathology, 25 : 257-270.
- BLAUT M. (2002). Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora.
European Journal of Nutrition, 41 : 11- 16.
- BOTTAZZI V., BATTISTOTTI B. & MONTESECANI G. (1973). Influence des souches seules et associées de *L.bulgaricus* et *S.thermophilus* ainsi que des traitements du lait sur la production d'aldéhyde acétique dans le yaourt.
Lait, 53(525/526) : 295-308.
- BOURGEOIS C.M. & LARPENT J.P. (1989). Microbiologie alimentaire : les fermentations alimentaires. ED : *Lavoisier*, Paris, 332(2) : 194,200.
- CASSEL-BERAUD A.M., PEGHINI M., MOUDEN J.C. & RAJAONARISON P. (1996). Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* à Tananarive, Madagascar.
Bactériologie n° 1441, 4p.
- CHENE C. (2002). Les acides organiques. *C.E.A.I.*, Adria Nord, 8p.
- COCONNIER M.H., BERNET M.F., CHAUVIERE G. & SEVIN A.L. (1993). Inhibition du processus de pathogenicité des bactéries responsables de diarrhées par adhérence d'origine humaine, souche LB, tués par la chaleur, sur cultures de cellules intestinales.
J. Diarrhoeal Dis. Res., 11(4) : 235-242.
- COCONNIER M. H., LIEVIN V., HEMERY E. & SERVIN A. L. (1998). Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Environ Microbiol*, 64 : 4573-4580.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DE MAN J.D., ROGOSA M. & SHARPE M.E. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, 23 : 130-135.
- DEROISSART H.B. (1986). Les bactéries lactiques. In : Lait et produits laitiers (vache, chèvre, brebis). Vol 3. Ed : *Lavoisier*, Paris, pp : 343-386.
- DESMAZEAUD M.J. (1990). Le lait milieu de culture. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 8(4) : 313-325.
- DEVUYST L. (2004). Découverte de nouveaux composés contre les bactéries nocives. *Proeuhealth - Propath*, 5p.
- DILMI – BOURAS A. (2006). Assimilation *in vitro* of cholesterol by yogurt bacteria. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 13:49-53.
- DRIESSEN F.M. (1981). Protocooperation of yoghurt bacteria in continuous cultures. *Special Publication of the Society for General Microbiology*, 5 : 99-120.
- DUCLAS B. & REIMUND J.M. (2002). Prebiotiques et probiotiques. *Rev De Presse Articles Recents Et Anciens*. CHU Maute Pierre, Strasbourg, 5p.
- DUCLUZEAU R. (2006). Des bactéries génotoxiques dans le tube digestif. *INRA Prod. La vie*, 3p.
- DWARAKANATH A.D., TSAI H.H., HART C.A. & RHODES J.M. (1994). Sialidase production by *Helicobacter pylori*. It's possible role in pathogenesis. *Digestive. Week. Aga* (abstract 2521).
- EUZEBY J.P. (2006). Enterobacteriaceae, "Enterobacteriales". *Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire*, 22p.
- FAUCHER J.L. (1999). Caractères bactériologiques et diagnostic de l'*Helicobacter pylori*. *La Borama Rev d'information Médicale*, 35 : 4-8.
- FELLEY C. & MICHETTI P. (2003). Probiotics and *Helicobacter pylori*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 17 : 785-791.
- FENNERTY M.B. (1994). *Helicobacter pylori*. *JAMA*, Vol. 19 n° 295, pp : 27-35.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- GIBSON G. R., & ROBERFROID M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.
Journal of Nutrition, 125 : 1401-1412.
- GIBSON G.R. & WANG X. (1994). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 77(4) : 412-420.
- GLEDEL J. (1988). Les salmonelles. In : microbiologie alimentaire. Vol. 1. Ed : *LAVOISIER*, Paris, pp : 51-53.
- GOSSELINK M. P, SCHOUTEN W. R., VAN LIESHOUT L. M., HOP W. C., LAMAN J. D. & RUSELER-VAN EMBDEN J. G. (2004). Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG.
Disease of Colon and Rectum, 47 : 876-884.
- GOURNIER-CHATEAU N., LARPENT J. P., CASTILLANOS M. I. & LARPENT J. L. (1994). Les probiotiques en alimentation animale et humaine.
Ed : *Lavoisier*, Paris, pp : 1-192.
- GUECHI Z. (2002). Microbiologie des viandes et des produits carnés. Cours nationales d'hygiène et de microbiologie des aliments. Institut Pasteur d'Algérie.
- GUIRAUD J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Ed : *Dunod*, Paris, pp : 88-89.
- HAO W. L. & LEE Y. K. (2004). Microflora of the gastrointestinal tract: a review.
Methods in Molecular Biology, 268 : 491-502.
- HOLZAPFEL W. H., HABERER P., SNEL J., SCHILLINGER U., & HUIS IN'T VELD J. H. J. (1998). Overview of gut flora and probiotics.
International. Journal of Food Microbiology, 41 : 85-101.
- HOOPER L. V. & GORDON J. I. (2001). Commensal host- bacterial relationships in the gut.
Science, 292 : 1115-1118.
- HOPKINS M. J., SHARP R., & MACFARLANE G. T. (2002). Variation in human intestinal microbiota with age. *Digestive and Liver Diseases*, 34 : 12-18.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ISOLAURI E., KIRJAVAINEN P. V. & SALMINEN S. (2002). Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation.
Gut, 50: 54-59.
- ISOLAURI E., SALMINEN S. & OUWEHAND A. C. (2004). Probiotics.
Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 18: 299-313.
- JACOBSEN C.N., NIELSEN V.R., HAYFORD A.E. & MOLLER P. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonisation ability of five selected strains in humans.
Appl. Environm. Microbiol., 65(11) : 4949-4956.
- JIANG T., MUSTAPH A.A. & SAVAIANO D. A. (1996). Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*.
Journal of Dairy Sciences, 79 : 750-757.
- JOLY B. & ALAIN R. (2003). Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic.
Ed : *Lavoisier*, Paris, 356 : 29-38.
- KAEFFER R.C. & MONGIN P. (1993). Veille technologique en industrie laitière.
Ed : *Hygino V.* France : 9-19 pp.
- KAILASAPATHY K. & CHIN J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.
Immunology and Cell Biology, 78 : 80-88.
- KIM F. (2004). Ulcers can be cured!. *Newsletter*, n° 32, 7p.
[http:// www. gihealth.com/subscribe](http://www.gihealth.com/subscribe).
- LAMOULIATTE H., MEGRAUD F. & CAYLA R. (1992). *Helicobacter pylori* et pathologies gastroduodénales. *Encyclopédie medico – chirurgicale*, 9021 : 1-11.
- LANKAPUTHRA W.E.V. SHAH N.P. & BRITZ M.L. (1996). Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide.
Milchwissenschaft, 51(2) : 65-70.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- LARPENT J.P. (1997). Microbiologie alimentaire.
Ed : *Lavoisier*, Paris, 1073(4) : 133-218.
- LECLERC H., GAILLARD J.L. & SIMONET M. (1995). Microbiologie générale : La bactérie et la monde bactérien. Ed : *Doin*, Paris, 535p.
- LEE K. Y., SO J.S. & HEO T. R. (2001) .Thin layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of bifidobacteria at genus level.
J. Microbiol. Methods, 45 : 1-6.
- LEYRAL G. & VIERLING E. (2001). Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaire. Ed : *Doins*, Paris, pp : 100-102.
- LILLEY D.M. & STIWELL R.H. (1965). Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. *Sci*, 147 : 747-748.
- LINDGREN S.E. & DOBROGOSZ W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87 : 149-163.
- LOONES A. (1994). Laits fermentés par les bactéries lactiques. In : bactéries lactiques.
Ed : *Lorica*. Uriage, pp : 135-154.
- MARSHALL V.M. (1982). Flavour compounds in fermented milks.
Perfumer and Flavorist, 7(2): 27-34.
- MARSHALL V.M. (1987). Fermented milks and their future trends. I. Microbiol aspects.
J. Dairy Res., 54 (4): 559-574.
- MATSUMOTO M. & BENNO Y. (2004). Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutation Research*, 568: 147-153.
- MC CRACKEN V. J. & LORENZ R. G. (2001). The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota.
Cellular Microbiology, 3: 1-11.
- MEGRAUD F. (1994). *Helicobacter pylori*. *Manuel de Bacteriol. Clin.* N° 3, pp: 1311- 1324.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- MEGRAUD F., FRANCIS, BROUET & NATHALIE. (2000). Epidémiologie acquisition et transmission d' *Helicobacter pylori*. *Rev du Praticien*, 50 : 1414-1417.
- MERCENIER A., PAVAN S. & POT B. (2002). Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 8 : 99-110.
- MIDOLO P.D., LAMBERT J.R., HULL R., LUO F. & GRAYSON M.L. (1995). *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 79(4): 475-479.
- MISRA A. K. & KUILA R.K. (1995). Antimicrobial substances from *Bifidobacterium Bifidum*. *J Dairy Sci.*, 48: 612-614.
- MONTEIRO L. (1995). *Helicobacter pylori*. Facteurs pathogènes bactériens. *Hépatogastroenterol.*, suppl. I n° 2, pp : 227-30.
- MRDA Z., ZIVANOVIC M., RASIC J., GAJIN S., SOMER L., TRBOJEVIC S., MAJOROS J. & PETROVIC Z. (1998). Therapy of *Helicobacter pylori* infection using *Lactobacillus acidophilus*. *Med. Pregl.*, 51(7-8) : 343-5.
- NADER DE MACIAS M.E., ROMERO N., APELLA M.C., GONZALEZ S.N. & OLIVER G. (1993). Prevention of infections produced by *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by feeding milk fermented with lactobacilli. *J. Food Prot.*, 56 : 401-405.
- NAHAISI M.H. (1986). *Lactobacillus acidophilus* : therapeutic properties, products and enumeration. In: Developments in food microbiology- 2. *Appl. Sci.*, 6: 153-178.
- NES I.F., HOLO H., FIMLAND G., HAUGE H.H. & NISSEN-MEYER J. (2001). Unmodified peptide bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria. In : Peptide antibiotics. New York, pp : 81-115.
- NOVEL G. (1993). Les bactéries lactiques. *Microbiologie industrielle*. Ed : *Lavoisier*, Paris, pp : 172-330.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- OUWEHAND A. C. & VESTERLUND S. (2003). Health aspects of probiotics.
Drugs, 6: 573-580.
- OUWEHAND A., ISOLAURI E., & SALMINEN S. (2002). The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood.
European of Journal Nutrition, 41 : 32- 37.
- OUWEHAND A. C., KIRJAVAINEN P. V., GRONLUND M. M., ISOLAURI S. J., & SALMINEN S. (1999). Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus.
International Dairy Journal, 9 : 623-630.
- PARKER R.B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story.
Anim. Nutr. Health, 29: 4-8.
- PIARD J.C. & DESMAZEAUD M. (1992). Inhibitory factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances.
Le Lait, 72 (2): 113-142.
- PREMI L. & BOTTAZI V. (1972). Hydrogen peroxide formation and hydrogen peroxid splitting activity in lactic acid bacteria.
Milchwissenschaft, 27: 267- 265.
- RASTALL R. A. (2004). Bacteria in the gut: Friends and foes and how to alter the balance.
Journal of Nutrition, 134: 2022-2026.
- RICHOUX R. (2005). Bactériocines, une synthèse. *Lait/ 33- 92*, 2p.
- ROBIN S. & ROCHE S. (2002). Virologie : les coprocultures. *DES de bactériologie*, 4p.
- ROSENFELDT V., BENFELDT E., VALERIUS N. H., PAERREGAARD A. & MICHAELSEN K. F. (2004). Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis.
Journal of Pediatrics, 145 : 612-616.
- ROUCHY A. (2001). Les probiotiques. *Nutranews : Information et Actualité Santé : Nutrition, Prévention du Vieillessement*, 7p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- SCHREZENMEIR J. & DE VRESE M. (2001). Probiotics, Prebiotics and symbiotics :
approaching a definition. *Am. J. Clinical Nutr.* 73 : 361S-364S.
- SEVIN E., SOUSSY C.J. & TANKOVIC J. (1998). *Helicobacter pylori* en 1998.
Feuillet de biologie, Vol XIX, 224 p.
- SHAH N.P. (1997). Bifidobacteria: characteristics and potential for application in fermented
milk product. *Milchwissenschaft*, 7: 349-356.
- SKOULOUBRIS, STEPHANE, HILDE, REUSEO, LABIGNE, AGNES (2000).
Bactériologie et pathogénéicité d' *Helicobacter pylori*.
Rev De Praticien, 50 : 1409-1413.
- SOBHANI I., VALLOT T. & MIGNON M. (1995). *Helicobacter pylori*, une bactérie
redécouverte son implication dans les maladies gastroduodénales.
Presse Médicale n° 2, 24 : 67-79.
- SOBHANI I., DOSPAI, MIGNON M., FLEJOU F. (2000). *Helicobacter pylori*.
Epidémiologie, mécanismes d'altération de la muqueuse gastrique et diagnostic.
Gastroentérol. Bacteriol., 55 : 301-308.
- STANTON C., GARDINER G., MEEHAN H., COLLINS K., FITZGERALD G., LYNCH P.
B. & ROSS R. P. (2001). Market potential for probiotics.
American Journal of Clinical Nutrition, 73 : 476- 483.
- SUTRA L., FEDERIGHI M. & JOUVE J.L. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire.
Ed : *POLYTECHNICA*, Paris, 308(6) : 31-249.
- SYNDIFRAIS. (2005). Yaourt et laits fermentés. *Santé. Nutrition. Flore*, n° 24, 6p.
- SZAJEWSKA H. & MRUKOWICZ J.Z. (2001). Probiotics in the treatment and prevention of
acute infectious diarrhoea in infants and children: a systematic review of published
randomized, double- blind, placebo controlled trials.
J Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 33 (suppl. 2) : 17-25.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- TAKEUCHI O., HOSHINO K., & AKIRA S. (2000). Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88- deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Immunology*, 165 : 5392-5396.
- TANAKA K. & ISHIKAWA H. (2004). Role of intestinal bacterial flora in oral tolerance induction. *Histology and Histopathology*, 19 : 907-914.
- TERRE S. (1986). Propriétés technologiques nutritionnelles et physiologiques de *S.thermophilus* et *L. bulgaricus*. *Techniques Laitières et Marketing*, 1006 : 26-39.
- TORTORA G.J., FUNKE B.R. & CASE C.L. (2003). Les maladies infectieuses du système digestif. In : Introduction à la microbiologie. *Editions du Renouveau Pédagogique Inc (ERPI)*, Canada, 945 : 756, 757, 761-772.
- TOUHAMI M., BOUDRAA G., MARY J.Y., SOLTANA H. & DEJEUX J.F. (1992). Conséquences cliniques du remplacement du lait par le yaourt dans les diarrhées persistantes du nourrisson. *Ann. Pedit.*, 39 : 79-86.
- VAN DER MEER R. & BOVEE OUDENHOVEN I.M.J. (1998). Dietary modulation of intestinal bacterial infections. *Int. Dairy J.*, 8 : 481-486.
- VAN NIEL C.W., FEUDTNER C., GARRISON M.N. & CHARISTAKIS D.A. (2002). *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhoea in children : a meta analysis. *Pediatrics*, 109 : 678-684.
- VIGNOLA C.L. (2002). Science et technologie du lait (transformation du lait). Ed : *POLYTECHNICA*, Paris, pp : 444-459.
- WANG M. F., LIN H. C., WANG Y. Y. & HSU C. H. (2004). Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatric Allergy and Immunology*, 15 : 152-158.
- ZIEMER C.J. & GIBSON G.R. (1998). An overview of probiotics, prebiotics and symbiotic in the functional food concept: perspectives and future strategies. *Int. Dairy J.*, 8 : 473-479.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Milieux de cultures

Tableau 1 : Composition du milieu MRS bouillon (g/l).

Constituants	g/l
Peptone de caséine	10,00
Extrait de viande	05,00
Extrait de levure	04,00
D (+) Glucose	20,00
Tween 80	01,00
Citrate d'ammonium	02,00
Acétate de soduim	05,00
Sulfate de magnésium	00,10
Sulfate de maganèse	0,050

Tableau 2 : Composition du milieu MRS agar (g/l).

Constituants	g/l
Peptone de caséine	10,00
Extrait de viande	08,00
Extrait de levure	04,00
D (+) Glucose	20,00
Tween 80	01,00
Citrate d'ammonium	02,00
Acetate de sodium	05,00
Sulfate de magnésium	00,20
Sulfate de manganèse	00,04
Agar	14,00

ANNEXES

Tableau 3 : Composition du milieu M17 bouillon (g/l).

Constituants	g/l
Tryptone	02,50
Peptone pepsique de viande	02,50
Peptone papaïnique de soja	05,00
B- Glycérophosphate de sodium	19,00
Lactose	05,00
Extrait de levure	02,50
Extrait de viande	05,00
Sulfate de magnésium	00,25
Acide ascorbique	00,50

Tableau 4 : Composition du milieu M17 agar (g/l).

Constituants	g/l
Tryptone	02,50
Peptone pepsique de viande	02,50
Peptone papaïnique de soja	05,00
B- Glycérophosphate de sodium	19,00
Lactose	05,00
Extrait de levure	02,50
Extrait de viande	05,00
Sulfate de magnésium	00,25
Acide ascorbique	00,50
Agar	14,00

Tableau 5 : Composition du milieu gélose chocolat (g/l).

Constituants	g/l
Polypeptone	15,00
Amidon	01,00
Phosphate dipotassique	04,00
Phosphate monopotassique	01,00
Chlorure de sodium	05,00
Hémoglobuline	10,00
Agar	10,00

Mettre le milieu de base à fondre dans le bain marie bouillant, incorporer le sang dans le milieu en surfusion, mesurer les volumes soit par pipette graduée stérile, soit à la pipette pasteur, compter environ 25 à 30 gouttes, remettre le flacon au bain marie à 75-80°C pendant 10min.

- **Milieux d'identification biochimique** :

- Milieu TSI : pour la mise en évidence de la fermentation des sucres (lactose, saccharose, glucose) avec ou sans dégagement de gaz.
- Milieu citrate de Simmons : pour rechercher l'utilisation de citrate comme seule source d'énergie.
- Milieu urée-indole : pour la détection de la présence de l'uréase et de la production d'indole.
- Milieu Mannitol-Mobilité : pour la détection de la fermentation du mannitol et la mobilité du germe.
- Milieu Falkow additionné d'Arginine, d'Ornithine ou de Lysine, pour l'étude de la décarboxylation des acides aminés.

ANNEXE 2 : Coloration de Gram

- Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de Gentiane;
- Il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante ;
- Traiter pendant une minute par la solution de Lugol ;
- De nouveau, rincer rapidement ;
- Traitement avec l'éthanol (95%), la lame est maintenue inclinée : on fait couler le solvant sur le frottis pendant une à trois secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis ;
- Rincer à l'eau courante ;
- Faire une contre- coloration de 30 secondes à la Fushine basique diluée ;
- Rincer brièvement et sécher le frottis au buvard ;
- Examiner à l'objectif à immersion (grossissement x100).

ANNEXE 3 : Réactifs et disques

- Lugol, alcool éthylique, violet de gentiane et Fushine, utilisés pour la coloration de Gram.
- Disque d'ONPG : (Ortho–Nitro –Phenyle– Galactopyranoside) pour la mise en évidence de la β galactosidase.
- Disque OX (Oxydase) : pour la mise en évidence du cytochrome oxydase.
- H₂O₂ volume 10 pour la recherche de la présence de catalase.
- Réactif de Kowacs pour la détection de la présence d'indole.

ANNEXE 4 : Equipement de la CLHP

L'appareillage utilisé est constitué de :

- Dispositif de filtration sur membrane de cellulose (diamètre des pores : 0,45 μ m) ;
- Cartouches garnies de silice greffée octadécyl ;
- Chromatographe en phase liquide haute performance équipé :
 - d'un injecteur à boucle de 10 μ l ;
 - d'un dispositif de thermostatisation ;

ANNEXES

- d'un détecteur, spectrophotomètre permettant les mesures d'absorbance à 210 nm ;
- d'un enregistreur et éventuellement d'un intégrateur.

Les conditions opératoires sont :

- Phase stationnaire contient deux colonnes de 250 mm de longueur et 4mm de diamètre interne, placées en série, garnies de silice greffées ocyl (particules sphériques de 5 µm de diamètre) ;
- Phase mobile est constituée de la solution titrant 100 g/l en dihydrogénophosphate de potassium, 4 g/l en sulfate d'ammonium ajusté à pH 2,1 par addition d'acide phosphorique ;
- Débit de la phase mobile: 0,8 ml/min ;
- Température : 25°C.

Les réactifs utilisés sont :

- Eau distillée ou de qualité CLHP ;
- Méthanol distillé ;
- Acide sulfurique ;
- Solution d'acide sulfurique 0,0125 M ;
- Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 ;
- Sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- Acide ortho phosphorique à 85% ;
- Acide acétique (5,6 g/l) et acide lactique (6,9 g/l), sont utilisés comme solutions de référence, dont les dilutions utilisées sont de 1/3 et 1/20 pour chaque acide.

ANNEXE 5 : Analyse des acides organiques.

Tableau 6 : Séparation du mélange acide acétique/ acide lactique

	RT (Min)	Aire (µV*sec)	% Aire	Hauteur (µV)	% Hauteur
01	4,887	10648567	36,75	586311	43,59
02	5,344	18324227	63,25	758802	56,41

Tableau 7 : Séparation des acides organiques de l'échantillon *H. pylori* + *St*₁

	RT (Min)	Aire ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	% Aire	Hauteur (μV)	% Hauteur
01	2,76	4037930	10,31	424433	20,59
02	3,11	701121	1,79	92233	4,47
03	3,43	1526177	3,90	101609	4,93
04	4,11	477431	1,22	59053	2,86
05	4,50	421623	1,08	22270	1,08
06	5,03	1793738	4,58	107140	5,20
07	5,57	3893866	9,94	326191	15,82
08	6,03	7767677	19,83	432602	20,98
09	6,67	776380	1,98	57840	2,81
10	8,15	8999261	22,97	284857	13,82
11	12,62	1200580	3,06	24305	1,18
12	14,59	1033730	2,64	25119	1,22
13	16,42	6541713	16,70	104151	5,05

Tableau 8 : Séparation des acides organiques de l'échantillon *H. pylori* + *Lb*^{*}

	RT (Min)	Aire ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	% Aire	Hauteur (μV)	% Hauteur
01	2,78	6551676	17,05	599125	34,47
02	3,13	485081	1,26	73758	4,24
03	3,37	228226	0,59	34151	1,96
04	3,60	209819	0,55	31104	1,79
05	4,14	1290155	3,36	86439	4,97
06	4,61	907085	2,36	66153	3,81
07	4,99	5398536	14,05	295746	17,02
08	5,60	1890160	4,92	128912	7,42
09	6,17	1073019	2,79	69213	3,98
10	8,32	9989518	25,99	208762	12,01
11	13,46	2677754	6,97	48258	2,78
12	16,91	7729335	20,11	96379	5,55

Tableau 9 : Séparation des acides organiques de l'échantillon *E. coli* + *Lp*

	RT (Min)	Aire ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	% Aire	Hauteur (μV)	% Hauteur
01	2,77	5793455	14,55	555457	31,59
02	3,16	420320	1,06	71735	4,08
03	3,37	260600	0,65	40176	2,29
04	3,60	236161	0,59	34610	1,97
05	4,13	1490157	3,74	93310	5,31
06	4,60	7227498	1,94	66250	3,77
07	4,96	6633903	16,66	352137	20,03
08	5,57	2067763	5,19	145562	8,28
09	8,23	10387408	26,08	225753	12,84
10	13,27	1468129	3,69	363624	2,07
11	14,78	883386	2,22	21178	1,20
12	16,63	8729733	21,92	104266	5,93
13	20,58	682964	1,71	11428	0,65

Tableau 10 : Séparation des acides organiques de l'échantillon *E. coli* + (*St** + *Lb** + *Bl*)

	RT (Min)	Aire ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	% Aire	Hauteur (μV)	% Hauteur
01	2,76	234637	0,70	35396	2,99
02	3,14	409953	1,22	71329	6,03
03	4,13	1365474	4,06	94208	7,96
04	4,58	1086687	3,23	85867	7,26
05	4,96	6986558	20,77	372761	31,50
06	5,57	2070683	6,16	147641	12,47
07	8,25	9623465	28,61	208818	17,64
08	13,30	2126298	6,32	44713	3,78
09	14,90	879565	6,61	20792	1,76
10	16,73	8852451	26,32	101993	8,62

Tableau 11 : Séparation des acides organiques de l'échantillon *S. typhi* + (*St*₃+*Lb*₁+ *Bl*)

	RT (Min)	Aire (μV*sec)	% Aire	Hauteur (μV)	% Hauteur
01	2,759	9508792	21,78	865478	42,71
02	3,142	729942	1,67	92070	4,54
03	4,135	693380	1,59	71355	3,52
04	4,575	1184702	2,71	86012	4,24
05	4,969	6555628	15,01	358526	17,69
06	5,584	2048687	4,69	141537	6,99
07	6,117	1335510	3,06	66681	3,29
08	8,293	8248086	18,89	169776	8,38
09	13,347	3904888	8,94	58334	2,88
10	14,987	947581	2,17	21463	1,06
11	16,827	8505154	19,48	94965	4,69

Tableau 12 : Séparation des acides organiques de l'échantillon *S.typhi* + (*St*₂ +*Lp*+ *Bl*)

	RT (Min)	Aire (μV*sec)	% Aire	Hauteur (μV)	% Hauteur
01	2,757	11707428	24,15	1019197	45,94
02	3,137	446964	0,92	79745	3,59
03	4,116	716336	1,48	75757	3,41
04	4,557	1316855	2,72	90120	4,06
05	4,949	7135789	14,72	385714	17,39
06	5,556	1842562	3,80	138949	6,26
07	6,050	1185470	2,45	58294	2,63
08	8,212	9600255	19,80	181823	8,20
09	12,975	3973624	8,20	56652	2,55
10	14,783	1038459	2,14	23759	1,07
11	16,650	9519485	19,63	108533	4,89

ABSTRACT

The favourable impact of certain lactic acid bacteria strains on the man's health has been demonstrated by researches done during these last years.

Thus, the aim of this work is to investigate the inhibitory effect of lactic acid bacteria strains on the pathogen bacteria (*E. coli*, *S. typhi* and *H. pylori*) which caused gastrointestinal diseases, *in vitro* and to analysis organic acids involved in this inhibition.

Interaction experiments between lactic acid bacteria in pure and mixed (added or no of bifid bacteria) and pathogen bacteria (*E. coli*, *S. typhi* and *H. pylori*) were performed. Antagonistic effect has been valued by agar diffusion method. An important inhibition of *E. coli* has been noted in presence of both cultures *Lp* (diameter = 10 mm) and *St*^{*} + *Lb*^{*} + *Bl* (diameter = 10 mm), both combinations *St*₃ + *Lb*₁ + *Bl* and *St*₂ + *Lp* + *Bl* presented an inhibitory effect of *S. typhi* whose diameters are respectively 8mm and 7 mm, for *H. pylori*, *St*₁ strain and *Lb. acidophilus* (*Lb*^{*}) have demonstrated an inhibitions whose diameters are 12 mm and 8 mm.

The qualitative and quantitative organic acid analysis by two methods of chromatographic (TLC and HPLC) showed the presence of the lactic acid in the bacterial cultures where there was an inhibition.

This study suggests a beneficial role for lactic acid bacteria in gastrointestinal diseases (diarrhoea and ulcer). The antibacterial properties of lactic acid bacteria may be a function through production of lactic acid.

Key words: lactic acid bacteria, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, interaction, antibacterial activity, organic acids, TLC, HPLC.

RESUME

L'impact favorable de certaines souches de bactéries lactiques sur la santé de l'homme a été démontré par des recherches effectuées au cours de ces dernières années.

Ainsi, l'objectif de ce travail est de chercher les souches des bactéries lactiques qui pourraient inhiber la croissance des bactéries pathogènes impliquées dans les maladies gastro-intestinales, *in vitro*, et analyser les acides organiques qui seraient à l'origine de cette inhibition.

Pour cela, plusieurs interactions ont été réalisées entre des bactéries lactiques en culture pure ou mixte (additionnée ou non de bifidobactéries) et des bactéries pathogènes (*E. coli*, *S. typhi* et *H. pylori*). L'effet antagonique a été évalué par la méthode de diffusion en gélose. Une inhibition importante d'*E. coli* a été constatée en présence des deux cultures *Lp* (diamètre = 10 mm) et $St^* + Lb^* + Bl$ (diamètre = 10 mm) ; les combinaisons $St_3 + Lb_1 + Bl$ et $St_2 + Lp + Bl$ ont montré un effet inhibiteur de *S. typhi* dont les diamètres sont de 8mm et 7 mm, respectivement ; pour *H. pylori*, la souche St_1 et *Lb. acidophilus* (Lb^*) ont démontré des inhibitions dont les diamètres sont de 12 mm et 8 mm, respectivement.

L'analyse qualitative et quantitative des acides organiques par deux méthodes de chromatographie (CCM et CLHP) a montré la présence de l'acide lactique dans les cultures bactériennes où il y a eu inhibition.

Cette étude suggère un rôle bénéfique des bactéries lactiques dans les maladies gastro-intestinales (diarrhée et ulcère). Leur activité antibactérienne pourrait être due à la production de l'acide lactique.

Mots clés : bactéries lactiques, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, interaction, inhibition, acides organiques, CCM, CLHP.

