

Les probiotiques et leur métabolites : une alternative de traitement des pathologies gastro-intestinales.

Guetarni Hassina

Département des sciences biologiques, Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre, Université Djilali Bounaama, Khemis Miliana, 44225, Ain Defla, Algérie.

Correspondance avec : Guetarni Hassina: kmhg2009@yahoo.fr

Résumé

Les probiotiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes. L'objectif de ce travail est d'analyser des métabolites sécrétés par des bactéries lactiques responsables de l'inhibition des bactéries pathogènes impliquées dans les infections gastro-intestinales.

Des concentrations d'acide lactique varient de 0,075 g/l et de 0,077 g/l ont été enregistrées par HPLC. L'acide lactique est responsable de l'inhibition des souches d'*Escherichia coli* et *Salmonella typhi*. Une bactériocine stable à pH acide et basique et thermorésistante a montré un net effet inhibiteur des souches de référence, cliniques et souches d'*Helicobacter pylori* caractérisées par PCR en temps réel.

Mots clés : Probiotiques, métabolites, bactéries pathogènes, PCR, HPLC.

Abstract

Probiotics produce many metabolites with antimicrobial properties. The aim of this work is to analyze metabolites secreted by lactic acid bacteria responsible for the inhibition of pathogenic bacteria involved in gastrointestinal infections.

Lactic acid concentrations of 0.075 g / l and 0.077 g / l were recorded by HPLC. Lactic acid is responsible for the inhibition of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. A bacteriocin stable at acidic and basic pH and heat resistant showed a clear inhibitory effect of reference, clinical and strains of *Helicobacter pylori* characterized by real time PCR.

Key words: Probiotics, metabolites, pathogenic bacteria, PCR, HPLC.

Introduction

Les bactéries lactiques sont généralement reconnues comme étant saines, de statut "GRAS" (Generally Recognized As Safe) et jouent un rôle important dans la fermentation et la conservation des aliments, que ce soit en tant que microflore naturelle ou comme cultures ajoutées sous des conditions contrôlées (MECHAI, 2009).

Elles sont largement employées dans la préparation de nombreux aliments fermentés (yaourts, laits fermentés, fromages, etc.). En plus de leur rôle technologique, la contribution la plus importante de l'ajout de ces souches au produit est l'amélioration de sa qualité (saveur, texture) et son innocuité par l'intermédiaire de l'allongement de sa durée de vie et de l'inhibition de la flore compétitive d'altération et des bactéries pathogènes (MECHAI, 2009).

Les probiotiques peuvent exercer une influence positive sur la santé de l'hôte. Des probiotiques ont été rapportés pour traiter les diarrhées causées par les antibiotiques et d'origine infectieuse. L'effet secondaire le plus commun de l'antibiothérapie est la diarrhée. Des études suggèrent que les probiotiques, en particulier les bactéries lactiques, pourraient être efficaces traitement et la prévention de *Helicobacter pylori*, la bactérie citée comme agent causal ulcères. Des études *in vitro* ont suggéré que les bactéries lactiques peuvent inhiber ou tuer *H. pylori* en agissant comme un bactéricide (Brown A-C et Valiere A, 2004).

L'utilisation des bactériocines n'est pas restreinte au domaine alimentaire, plusieurs études ont démontré que l'utilisation répandue des antibiotiques pour traiter et prévenir les infections, engendrait de sérieux problèmes de toxicité et de résistance (Allgaier et al. 1986).

L'inhibition des bactéries pathogènes ne dépend pas de la quantité d'acide organique produite par les bactéries lactiques, mais liée au type et à la forme dissociée ou non de l'acide organique (Midolo et al., 1995).

Les objectifs de ce travail visent à déterminer l'effet :

-*in vitro* des bactéries lactiques sur des souches impliquées dans la physiopathologie gastrointestinales : *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Helicobacter pylori*.

-caractériser par chromatographie phase liquide HPLC l'acide organique responsable de l'inhibition de *E.coli* et *S.typhi*.

-déterminer des propriétés physico-chimiques de la bactériocine responsable de l'inhibition *in vitro* et *in vivo* de *H.pylori*.

2. Partie expérimentale

2.1. Bactéries lactiques

-*Streptococcus thermophilus* (St1, St2, St3) et *Lactobacillus bulgaricus* (Lb1, Lb2, Lb3) isolées du lait de vache cru et identifiées dans le laboratoire lactologie, Département des Sciences Alimentaires, Université de Chlef (Guetarni, 2017 a).

-*Streptococcus thermophilus* (St *), *Lactobacillus acidophilus* (Lb *), *Bifidobacterium longum* (Bl) et *Bifidobacterium adolescentis* (Ba) ; isolées des selles des enfants et identifiées dans l'université de Bejaia (Guetarni, 2017 a).

-*Lactobacillus paracasei* (LP) isolées du lait de vache et identifiées en laboratoire lactologie, Université Pamplona - Navara Espagne (Guetarni, 2017 a).

Les streptocoques ont été comptés dans l'agar M17, les lactobacilles dans l'agar MRS (De Man, Rogosa et Sharpe) et les bifidobactéries dans l'agar cystéine MRS (De Man, Rogosa et Sharpe) (Guetarni, 2017 a).

Les cultures ont été mélangées en utilisant des combinaisons avec *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus paracasei* 1 et incubées pendant 48 h à 45 ° C pour Stx + Lby, à 30 ° C pour Stx + Lp (Guetarni, 2017 a).

Après le dénombrement, les meilleures combinaisons ont été additionnées avec *Bifidobacterium adolescentis* ou *Bifidobacterium longum* et incubées à 37°C pendant 48 h (Guetarni, 2017 a).

-Des échantillons de lait cru de vache, de chèvre et de brebis ont été prélevés dans deux régions : Miliana et Ain Defla. D'autres échantillons de lait de chamelle ont été recueillis à Biskra et à Tamanrasset. L'isolement des bactéries lactiques a été réalisé sur milieu sélectif M17 pour les lactocoques (Guetarni et al., 2012a).

2.2. Bactéries pathogènes

-Deux bactéries pathogènes très communes dans la wilaya de Ain Defla ont été isolées des échantillons de selles sur milieu Hektoen: *Escherichia coli* responsable des diarrhées chez les enfants et *Salmonella typhi* de la fièvre typhoïde (Guertarni, 2017a).

-*Helicobacter pylori* : Les souches bactériennes utilisées sont issues du Centre National de Référence des *Campylobacters* et *Helicobacters*, Bordeaux (souches de référence : 26695, J99, HPAG1 et souche clinique : HSA3068) (GUETARNI *et al.*, 2012a).

L'effet pathogène de TN2GF4 et probiotique des bactéries lactiques a été étudié *in vivo* chez trente-six souris femelles, holoxéniques et âgées de deux mois (réduction de 42,86% de *H.pylori* après administration des bactéries lactiques) (Guertarni *et al.*, 2012a).

-Des souches de *Helicobacter pylori* (Hp 1 et Hp 3) sensibles à la clarithromycine ont été isolées sur gélose pylori (Biomerieux, France) et gélose maison à partir des biopsies gastriques prélevées des patients algériens dans le laboratoire de bactériologie de l'hôpital Cochin (Paris, France) (Guertarni, 2013b, Guertarni et Bensoltane, 2013a).

Ces souches ont provoqué des pathologies gastriques chez 100 patients observés lors de l'examen anatomopathologique et cytologique des biopsies colorées par Giemsa lent et à l'hématoxiline éosine (Guertarni et Bensoltane, 2013a ; Guertarni, 2013b).

Dans notre étude, la PCR en temps réel est utilisée pour détecter à la fois la présence de *H. pylori* dans les biopsies gastriques et sa sensibilité à la clarithromycine. L'extraction de l'ADN a été réalisée dans le PLC easyMAGNucliSens® (00982, Biomerieux, France). Nous avons utilisé des amorces de sens HPYS (41-6018-3 / 4, Eurofins mwg / Operon), 5'-AGG-TTA-AGAGGA-TGC-GTC-AGT-C-3, nucléotides 1931-1952 ') et antisens HPYAS (41-6018-4 / 4, Eurofins mwg / Opéron), 5'-CGC-ATG-ATA-TTC-CCA-TTA-GCA-GT-3 ', nucléotides 2197-2175) (Guertarni et Bensoltane, 2013a ; Guertarni, 2013b).

Le produit amplifié a été détecté avec les deux sondes: la sonde de détection HP-LCR (41-6018-1 / 4, Eurofinsmwg / opéron), marquée en 5' avec LCRed 640 et phosphorylée au 3' (5'-GGC-AAG-CAG -GAA-AGA-CC-3 ', nucléotides 2504-2520) et une sonde d'ancrage HP-FLU (24-66592 / 2, Eurofinsmwg / Opéron) marquée à la fluorescéine 3' (24- 66592/2, 5'-AGT-TGT -GGA-GGT-GAA-AAT-TCCTCC-TAC-CC-3 ', nucléotides 2473-2501) (Guertarni et Bensoltane, 2013a ; Guertarni, 2013b).

Dans ce type de PCR deux témoins ont été utilisés : « Quinet » pour les souches de type sauvage et « Alves » pour les souches avec des mutations en 2143 (Guertarni et Bensoltane, 2013a ; Guertarni, 2013b).

2.3. Préparation de la culture bactérienne

Nous avons inoculé dans cette étude :

- Les bactéries lactiques dans les bouillons MRS, M17 et MRS cystéine.
- E. coli* et *S. typhi* dans deux tubes contenant 5 ml de bouillon nutritif.
- H. pylori* dans le bouillon Brucella.

2.4. Méthode de diffusion sur gélose

Les géloses ont été inoculées par quelques millilitres de culture bactérienne pathogène. Après, nous déposons sur la surface de la gélose des disques de papier buvard (6mm de diamètre) préalablement imprégnés par des souches de bactéries lactiques et laissés séchés à 37°C pendant 30 min. Enfin, nous incubons les boîtes de Pétri à 37°C (Guertarni *et al.*, 2012 ; Guertarni et Bensoltane, 2014 ; Guertarni, 2017a).

L'inhibition est considérée comme positive si le diamètre de la zone d'inhibition (Z_i) est supérieur à 2 mm :

Z_i (mm) = diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm) - diamètre du disque (Guetarni et *al.*, 2012a; Guetarni et Bensoltane, 2014 ;Guetarni, 2017a).

2.5. Détermination de l'activité bactériocinogénique des bactéries lactiques

Un volume de 100 mL de préculture des bactéries lactiques donnant la meilleure zone d'inhibition est centrifugé à 10 000 tr / min pendant 20 minutes à 4 ° C. Après de nombreuses préparations, l'effet inhibiteur du surnageant (fraction extracellulaire) et du culot (extrait cellulaire) vis-à-vis des souches de *H. pylori* a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose (Guetarni et Bensoltane, 2014).

2.6. Influence du pH, de la température et des enzymes sur l'activité de la bactériocine

La stabilité de la substance antagoniste au pH acide et basique a été étudiée en ajustant le pH aux valeurs souhaitées du surnageant (pH 4 et pH 8) par l'ajout des tampons préparés pour ces valeurs avec double concentration (Guetarni et Bensoltane, 2014).

Pour déterminer l'effet de la température sur les substances inhibitrices, le surnageant obtenu de la culture bactérienne a été traité thermiquement à 60 ° C pendant 30 minutes, à 80 ° C pendant 10 minutes et à 100 ° C pendant 5 minutes (Guetarni et Bensoltane, 2014).

La nature de la bactériocine est déterminée par l'ajout des enzymes suivantes : pepsine (Merck 2000UI / g), trypsine (du pancréas bovin Merck 40 UI / mg) et α amylase (Merck 20 160 UI / g) à une concentration finale de 1 mg / mL. Ensuite, l'activité inhibitrice du surnageant vis-à-vis les souches de *H. pylori* a été testée par la méthode de diffusion sur gélose (Guetarni et Bensoltane, 2014).

2.7. Analyses d'acides organiques par HPLC

2.7.1. Préparation de l'association bactéries lactiques- bactéries pathogènes

Pour cette étape, nous avons inoculé :

- Un tube de 5 ml de bouillon MRS avec 250 μ l de *Lb** et 250 μ L de bactérie pathogène.
- Un tube de 5 ml de bouillon M17 avec 250 μ l de *Sc.tr* et 250 μ l de bactérie pathogène.
- Un tube de 5 ml de bouillon MRS avec 250 μ l de Stx + Lby et 250 μ l de bactérie pathogène.
- Un tube de 5 ml de bouillon MRS avec 250 μ l de Stx + Lby + Bifz et 250 μ l de bactérie pathogène (Guetarni, 2017a) .

Les cultures ont été centrifugées à 12400 rpm / min pendant 10 min pour éliminer les cellules bactériennes du milieu. Le surnageant obtenu a été traité à 100°C / 60min, 100°C / 30min et 121°C / 15min pour éliminer les bactériocines (Guetarni et *al.*, 2012b; Guetarni, 2017a).

2.7.2. Chromatographie

L'analyse des échantillons a été réalisée à 25°C en utilisant la pompe HPLC Waters 1525 binaire, les détecteurs Waters 2487 pour les UV et les eaux pour l'AF du dégazeur. Le temps d'élution est court, il est obtenu en appliquant une pression élevée d'environ 300 bars,

avec un volume égal de 20,00 µl d'injection et un temps de rétention (RT) égal à 40, 00 minutes (Guertani et al., 2012b; Guetrani, 2017a).

Une cartouche remplie de silice liée à l'octadécyle a été préalablement lavée avec 10 ml de méthanol puis avec 10 ml d'eau. L'échantillon dégazé a été filtré à travers une membrane de cellulose (diamètre des pores = 0,45 mm). Une seringue préalablement rincée avec l'échantillon est utilisée pour recueillir 8 ml. Dans le chromatographe, on injecte successivement 10 µl de solution de référence (acide lactique, acide acétique) et 10 µl de l'échantillon préparé en répétant trois fois les injections dans le même ordre (Guertani et al., 2012b; Guetrani, 2017a).

Analyse qualitative : L'analyse qualitative consiste à déterminer le temps de rétention de chaque composé élué. Les des acides organiques standards sont séparées dans l'ordre d'élution suivant : acide lactique, acide acétique (Guertani et al., 2012b; Guetrani, 2017a).

Analyse quantitative : L'analyse quantitative consiste à mesurer les zones de pics (solution de référence et échantillon) et à déterminer la concentration d'acide organique dans l'échantillon selon l'équation (Guertani et al., 2012b; Guetrani, 2017a):

$$[\text{Sample}] = \frac{\text{Area sample}}{\text{Standard area}} \times [\text{standard}] \times \text{dilution}$$

3. Résultats

3.1. Interaction bactéries lactiques-bactéries pathogènes

Les taux de croissance des bactéries lactiques sont plus élevés avec l'addition de *Bifidobacterium longum*. Dans les cultures pures, 70% des bactéries lactiques inhibent la croissance d'*E. coli*, d'autres zones d'inhibition sont trouvées avec des cultures mixtes (Tableau1).

La souche *Lb. paracasei* 1 et la combinaison *St* * + *Lb* * + *Bl* ont donné un grand effet inhibiteur (diamètre = 10mm) dans toutes les cultures bactériennes.

Nous avons enregistré la plus grande zone d'inhibition avec *St1* + *Lb3* (7mm) (Tableau1). Pour les cultures mixtes additionnées avec *B. longum*, les combinaisons *St3* + *Lb1* + *Bl* et *St2* + *Lp* + *Bl* donnent les meilleures zones d'inhibition (diamètre = 8 mm et 7mm, respectivement).

Les résultats montrent que l'inhibition observée dans les cultures mixtes additionnées de *Bifidobacterium longum* est supérieure à celles trouvées dans les cultures mixtes additionnées de *Bifidobacterium adolescentis*.

Les genres bactériens trouvés dans les échantillons de lait cru sont représentés par des souches de *Lactococcus* et d'*Enterococcus*. Onze souches de *Lactococcus lactis subsp. lactis* (B01, B03, B06, B07, B08, B09, B12, B15, B21, B26 et B29), neuf souches de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (B04, B14, B16, B20, B22, B24, B25, B28 et B30), quatre souches de *Lactococcus garvieae* (B02, B11, B18 et B23) et six souches d'*Enterococcus faecium* (B05, B10, B13, B17, B19 et B27).

L'interaction *in vitro* de bactéries lactiques avec *H. pylori* a montré que sur 30 souches de bactéries lactiques, seulement 14 ont un effet inhibiteur (Tableau 2).

D'après les résultats obtenus, les deux souches *E. faecium* (B13) et *Lc. lactis subsp. lactis* (B01) ont donné des zones d'inhibition importantes avec des diamètres de 20 et 18 mm, enregistrées avec la souche TN2GF4, 16 et 13 mm avec la souche HSA3068, 15 et 11 mm avec la souche 26695 et 15 et 13 mm avec la souche J99. Pour la souche HPAG1, la meilleure zone d'inhibition a été trouvée avec *Enterococcus faecium* (B19) (diamètre = 7

mm). Avec la souche Hp1, 10 zones d'inhibition ont été enregistrées en présence des souches d'*Enterococcus faecium* (B10), *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (B04), *E. faecium* (B19), *Lactococcus lactis subsp. lactis* (B12), *Enterococcus faecium* (B13), *Lactococcus lactis subsp. lactis* (B29), *Lactococcus lactis subsp. lactis* (B01), *Lactococcus lactis subsp. lactis* (B07), *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (B25), *Lactococcus lactis subsp. lactis* (B26). Alors avec la souche Hp3, huit bactéries lactiques sur 30 ont un effet inhibiteur.

Tableau 1 : diamètres de zones d'inhibition (mm) des bactéries lactiques vis-à-vis les bactéries pathogènes

Bactéries lactiques \ Bactéries pathogènes	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>
	<i>St1</i>	0
<i>St2</i>	0	0
<i>St3</i>	5	0
<i>St*</i>	0	4
<i>Lb1</i>	7	0
<i>Lb2</i>	4	0
<i>Lb3</i>	3,5	4
<i>Lb*</i>	8	5
<i>Lp1</i>	10	0
<i>Ba</i>	5	0
<i>Bl</i>	6	4
<i>St2+Lp</i>	5	4
<i>St3+Lb1</i>	4	4
<i>St1+Lb3</i>	4	7
<i>St*+Lb3</i>	4	5
<i>St1+Lb1</i>	4	0
<i>St*+Lb*</i>	5	4
<i>St2+Lp+Ba</i>	0	0
<i>St3+Lb1+Ba</i>	0	0
<i>St1+Lb3+Ba</i>	0	5
<i>St*+Lb3+Ba</i>	0	4
<i>St1+Lb1+Ba</i>	0	0
<i>St*+Lb*+Ba</i>	5	4
<i>St2+Lp+Bl</i>	5	7
<i>St3+Lb1+Bl</i>	0	8
<i>St1+Lb3+Bl</i>	5	6
<i>St*+Lb3+Bl</i>	4	6
<i>St1+Lb1+Bl</i>	8	4
<i>St*+Lb*+Bl</i>	10	6

Tableau 2 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des bactéries lactiques vis-à-vis des souches d'*H.pylori*.

	Diamètre des zones d'inhibition (mm)						
	TN2GF4	J99	26695	HPAG1	HSA3068	Hp1	Hp3
B01	18	13	11	00	13	03	03
B02	00	00	00	00	00	00	00
B03	00	00	00	00	00	00	00
B04	00	00	00	00	00	09	07
B05	00	00	00	00	00	00	00
B06	00	00	00	00	00	00	00
B07	10	06	05	00	04	03	03
B08	00	00	00	00	00	00	00
B09	00	00	00	00	00	00	00
B10	00	00	00	00	00	10	08
B11	00	00	00	00	00	00	00
B12	08	00	00	00	00	04	03
B13	20	15	15	00	16	04	03
B14	04	04	03	00	00	00	00
B15	00	00	00	00	00	00	00
B16	00	00	00	00	00	00	00
B17	06	06	05	00	03	00	00
B18	00	04	00	00	00	00	00
B19	00	06	00	07	00	05	03
B20	00	00	00	00	00	00	00
B21	00	00	00	00	00	00	00
B22	03	00	00	00	00	00	00
B23	00	00	00	00	00	00	00
B24	00	00	00	00	00	00	00
B25	08	07	07	00	06	03	00
B26	05	00	00	05	00	03	03
B27	00	00	00	00	00	00	00
B28	00	00	00	00	00	00	00
B29	03	00	00	04	00	04	00
B30	00	00	00	00	00	00	00

3.2. Influence du pH, des températures et des enzymes sur l'activité bactériocinogénique

Les résultats de l'activité antibactérienne montrent que le surnageant de la culture *E. faecium* (B13) après ajustement de pH à 4 et 8 maintient la même activité d'inhibition vis-à-vis les souches TN2GF4, HSA3068, J99, 26695, Hp1, Hp3 et HPAG1 (20mm, 16mm, 15mm, 15mm, 4mm, 3mm et 0mm, respectivement) (Fig 1).

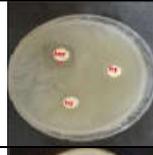
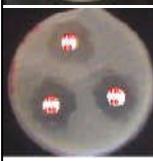
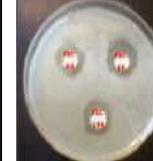
Souche Effet	Souche			
	TN2GF4	J99	HSA3086	26695
Effet du pH 4 et 8				
Effet de enzymes (Amy: Amylase Try: Trypsine, Pep: Pepsine)				
Effet du traitement thermique (60 ° C pendant 30min, 80 ° C pendant 10min et 100 ° C pendant 5 min)				

Fig. 1: Effet de l'extrait cellulaire (CE) et de la fraction extracellulaire (FEC) d'*Enterococcus faecium* (B13) sur les souches de *H. pylori* par la méthode de diffusion sur gélose: A: TN2GF4, B: J99 C: HSA3068, D: 26695

Ce composé est stable à pH 4 et pH 8 et au traitement thermique (60 ° C pendant 30 minutes, 80 ° C pendant 10 minutes et 100 ° C pendant 05minutes) (diamètres égaux à 20mm, 16mm, 15mm et 15mm, 4mm, 3mm et 0mm).

Ces résultats suggèrent que ce métabolite conserve son activité antagoniste après avoir été soumis à un traitement thermique relativement élevé comparable à la pasteurisation et stérilisation du lait.

Pour déterminer la nature de la substance inhibitrice extraite d'une culture de *E. faecium*, des enzymes ont été utilisés à cet égard : la pepsine, la trypsine et l' α -amylase. L'activité de cette substance a été testée par la méthode de diffusion sur gélose.

Après 24h d'incubation à 37°C, le surnageant de *E. faecium* traités avec de l' α amylase inhibe la croissance des souches de TN2GF4, HSA3068, J99, 26695, HP1, Hp3 et HPAG1 (20mm, 16mm, 15mm, 15mm, 4mm, 3mm et 0mm, respectivement).

La substance extraite perd son activité antibactérienne en présence des deux enzymes protéolytiques: la pepsine et la trypsine. Cela indique que la substance douée d'une activité antibactérienne est de nature protéique (Fig.2).

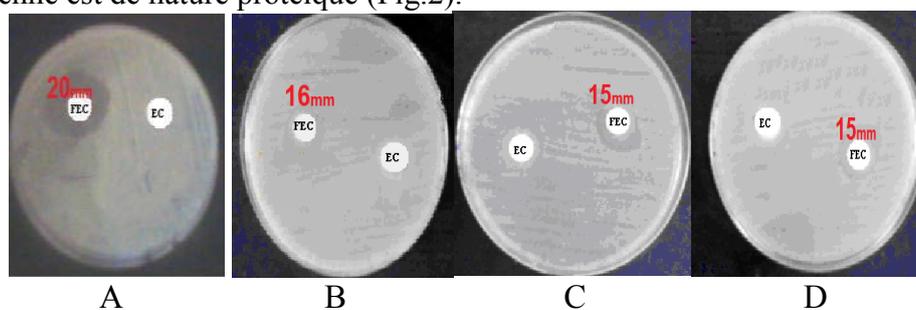


Fig. 2 : Influence du pH, des valeurs de température et des enzymes sur l'activité des bactériocines.

3.3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Analyse qualitative

Les deux standards injectés par spectrophotomètre ont donné deux pics, un pour l'acide lactique (RT = 4,887 min) et un pour l'acide acétique (RT = 5,344 min). L'analyse qualitative de l'acide lactique a donné de petites différences (D) par rapport au temps de rétention (RT) de l'acide lactique standard pour toutes les cultures bactériennes sélectionnées (Tableau 3). Alors que l'analyse qualitative de l'acide acétique, a donné de grandes différences (D) par rapport au temps de rétention de l'acide acétique standard dans toutes les cultures bactériennes sélectionnées (Tableau 4). Ces résultats démontrent que l'inhibition des souches pathogènes *E. coli* et *S. typhi* est due à la sécrétion d'acide lactique (Fig.3, 4, 5, 6).

Tableau 3 : Analyse qualitative de l'acide lactique

Echantillons	RT (min)	D (différence)
<i>E.coli</i> +Lp	4,961	0,074
<i>E.coli</i> + (St*+Lb*+Bl)	4,959	0,072
<i>S.typhi</i> + (St3+Lb1+Bl)	4,969	0,082
<i>S.typhi</i> + (St2+Lp+Bl)	4,949	0,062

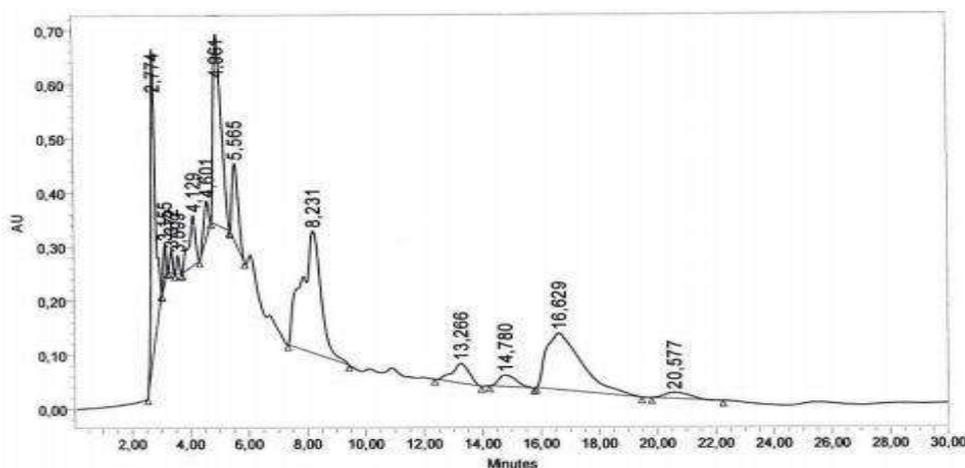


Fig.3 : analyse des acides organiques dans le surnageant de culture *E.coli* + *Lp*

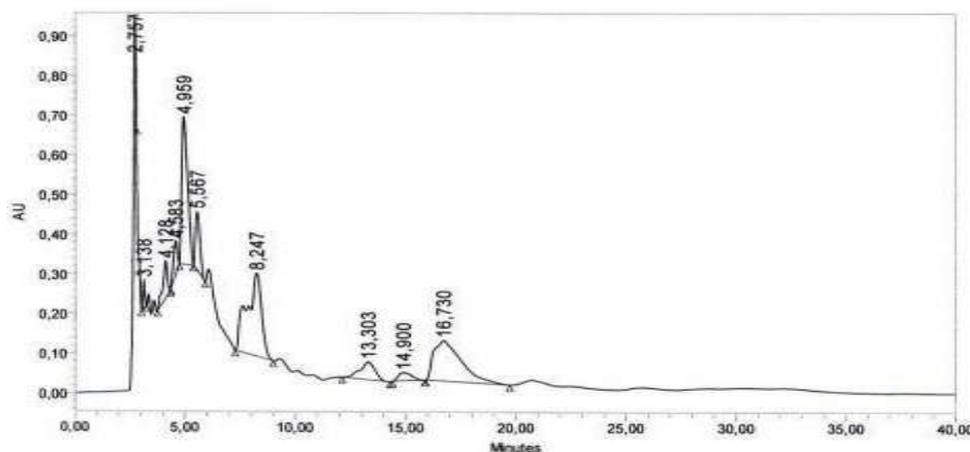


Fig. 4 : analyse des acides organiques dans le surnageant de culture *E.coli* + *St* * + *Lb* * + *Bl*

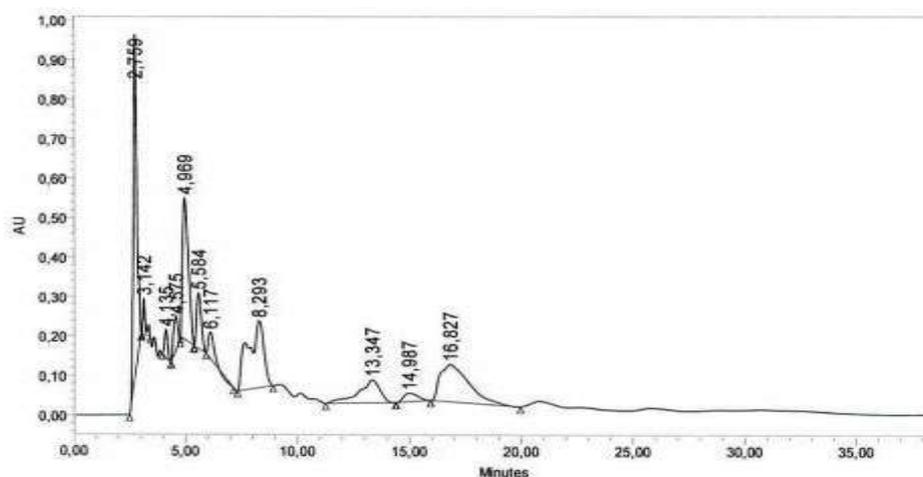


Fig.5 : analyse des acides organiques dans le surnageant de culture *S.typhi* + *St3* + *Lb1* + *Bl*

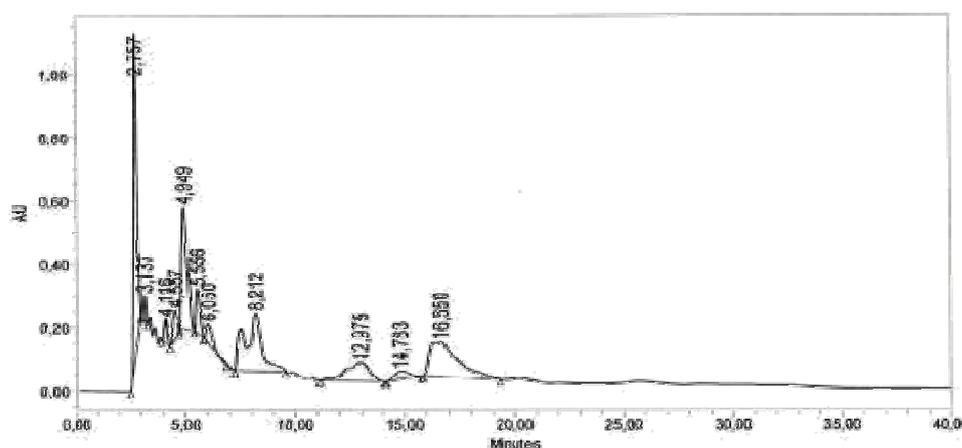


Fig.6 : analyse des acides organiques dans le surnageant de culture *S.typhi* + *St2* + *Lp* + *Bl*

Analyse quantitative

Dans les cultures bactériennes, nous ne détectons que l'acide lactique. Selon les résultats (Tableau 4), nous pouvons enregistrer des quantités d'acide lactique sécrété par *Lp* (0,069 g / L), *St* * + *Lb* * + *Bl* (0,075 g / L), *St3* + *Lb1* + *BL* (0,070 g / L) et *St2* + *Lp* + *BL* (0,077 g / L).

Tableau 4 : Analyse qualitative de l'acide acétique

Culture bactérienne	La concentration de l'acide lactique (g/l)
<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>St3</i> + <i>Lb1</i> + <i>Bl</i>)	0,007
<i>S. typhi</i> + (<i>St2</i> + <i>Lp</i> + <i>Bl</i>)	0,077

4. Discussion

Les bactéries lactiques (LAB), qui ont d'abord été défini par Orla Jensen sont couramment impliquées dans un grand nombre des fermentations spontanées de produits alimentaires et principalement utilisé comme starter dans les produits alimentaires fermentés, conduisant au développement de certaines caractéristiques organoleptiques (GUETARNI et al., 2017b).

En effet, LAB produisent de nombreux métabolites, y compris ceux ayant des propriétés antimicrobiennes, telles que le peroxyde d'hydrogène, reutéline, diacétyl, bactériocines et des acides organiques, tel que de l'acide lactique (GUETARNI et al., 2017b).

De nombreux mécanismes d'action ont été proposés afin d'expliquer l'impact des microorganismes probiotiques au niveau gastro-intestinal principalement l'exclusion compétitive, la compétition pour les nutriments, l'amélioration de la fonction barrière de l'épithélium, la réduction de l'inflammation, la stimulation du système immunitaire et la production de composés antimicrobiens (Fernandez, 2014).

L'acide lactique et les bactériocines sont responsables de l'inhibition des bactéries pathogènes impliquées dans la physiopathologie gastrointestinale (Allem et al., 2007; Guetarni et al., 2012a ; Guetarni, 2017b)

5. Conclusion

Les bactéries lactiques ont démontré un net effet inhibiteur des souches pathogènes responsables des maladies diarrhéiques tels que *Escherichia coli* et *Salmonella typhi* et de la maladie ulcéreuse due à *H.pylori*.

Ces bactéries produisent des quantités d'acide lactique varient entre 0,069 g / L et 0,077 g / L détectées par la chromatographie en phase liquide CLHP.

Une protéine extracellulaire sensible aux enzymes protéolytique, stable à l'effet de la chaleur et du pH a permet d'inhiber *in vitro* et *in vivo* des souches de références, cliniques et de wildtype de *Helicobacter pylori*.

Les bactéries lactiques ou leurs métabolites pourraient être utilisées comme une alternative de traitement des maladies causées par ses pathogènes

6. Références Bibliographiques

Guetarni H., Bensoltane A. 2013 a : Isolation and characterization of *Helicobacter pylori* strains from gastric biopsies of algerian patients. *OnLine Journal of Biological Sciences* ,13 (2): 41-49.

Guetarni H., Taibouni NE., Tahi S. 2017b: Isolation of the Lactic Acid Bacteria from Sigoise and Chemlale Olive Varieties in Ain Defla (Algeria). *Electronic Journal of Biology*, 13(4): 408-415.

Guetarni H. 2013 b : Effets antibactériens des bactéries lactiques isolées à partir des laits crus algériens sur la croissance de *Helicobacter pylori*. Thèse de doctorat en microbiologie, option microbiologie alimentaire, Université Es-Sénia, Oran. 276p.

Guetarni H., Bensoltane A., Aichour A., Benabdallah Z., Khouatria I-R., Khouatria N-K. 2012 a: *In vitro* and *In vivo* Activity of *Lactococci* Strains against *Helicobacter pylori*. *OnLine Journal of Biological Sciences*. 12(2): 38-43.

Guetarni H., Bensaïd A., Bensoltane A. 2012 b: Analysis of lactic acid responsible for inhibition *in vitro* of *Helicobacter pylori* by high performance chromatography (HPLC). *J Biotechnol Lett*, 3:34-36

Guetarni H. 2017a : HPLC Analysis of lactic acid inhibition of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* responsible of diarrheal diseases in Algeria: Alternative treatment. *Mor. J. Chem*. 5 (4): 534-543

Guetarni, H., Bensoltane A. 2014: Characterization of bacteriocin antihelicobacter *pylori* extracted from homofermentative lactic acid bacteria. *Egypt . J. of Appl. Sci.*, 29 (1): 19-30.

Allem R. ElKebir F-Z., Guetarni H. 2007: Effet des bactéries lactiques sur *Helicobacter pylori in vitro*. *Méd. Nut.*, 43 (3): 121-127.

Mechai A., 2009 : Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et biochimiques. Thèse de doctorat en Biochimie, Université de Annaba, 99p.

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.

Fernandez B., 2014 : activité biologique et impact sur le microbiote intestinal des bactéries lactiques bactériocinogènes. Thèse de doctorat en sciences et technologies des aliments. Québec, Canada, 143p.

Allgaier H., Jung G., Werner R. G., Schneider U., Zahner H., 1986: Epidermin Squencing of a heterodet tetracyclic 21- peptide amide antibiotic. *European Journal of Biochemistry*. 160: 9-22.