

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد ابن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Hamaizi Nassera

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Production et Transformation Laitière

Etude du Pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques autochtones à partir de
blé fermenté vis-à-vis d'une souche lactique *Pediococcus acidilactici* et
de souches pathogènes de référence

Soutenu publiquement le:15/9/2019

DEVANT LES MEMBRES DU JURY

Président	Dr RECHIDI SIDHOUM Nadra	Maître Assistante	U. Mostaganem
Encadreur	Dr TAHLAITI Hafida	Maître Assistante	U. Mostaganem
Examinatrice	Dr DAHOU A. El-Amine	Maître Assistant	U. Mostaganem

*Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales
Année universitaire 2018-2019*

Remerciements

Je remercie en premier lieu DIEU, le Clément, le Miséricordieux, le tout Puissant. louange à ALLAH Seigneur des mondes, qui m'a permis de réaliser ce travail, ainsi que ses innombrables bienfaits.

Je tiens avant tout à remercier mon promoteur Dr.TAHLAITI. H. qui a accepté de m'encadrer, qui m'a guidé par ses précieux conseils et suggestions pertinentes et m'a bien expliqué les étapes de ce travail. Qu'elle trouve ici, L'expression de mon profond respect et mes sincères remerciements.

Je tiens également à remercier :

Dr. RECHIDI SIDHOUM NADRA pour l'honneur qu'elle à fait de présider le jury et d'évaluer ce travail.

Dr. DAHOU A.EL-AMINE pour avoir accepté d'examiner ce travail.

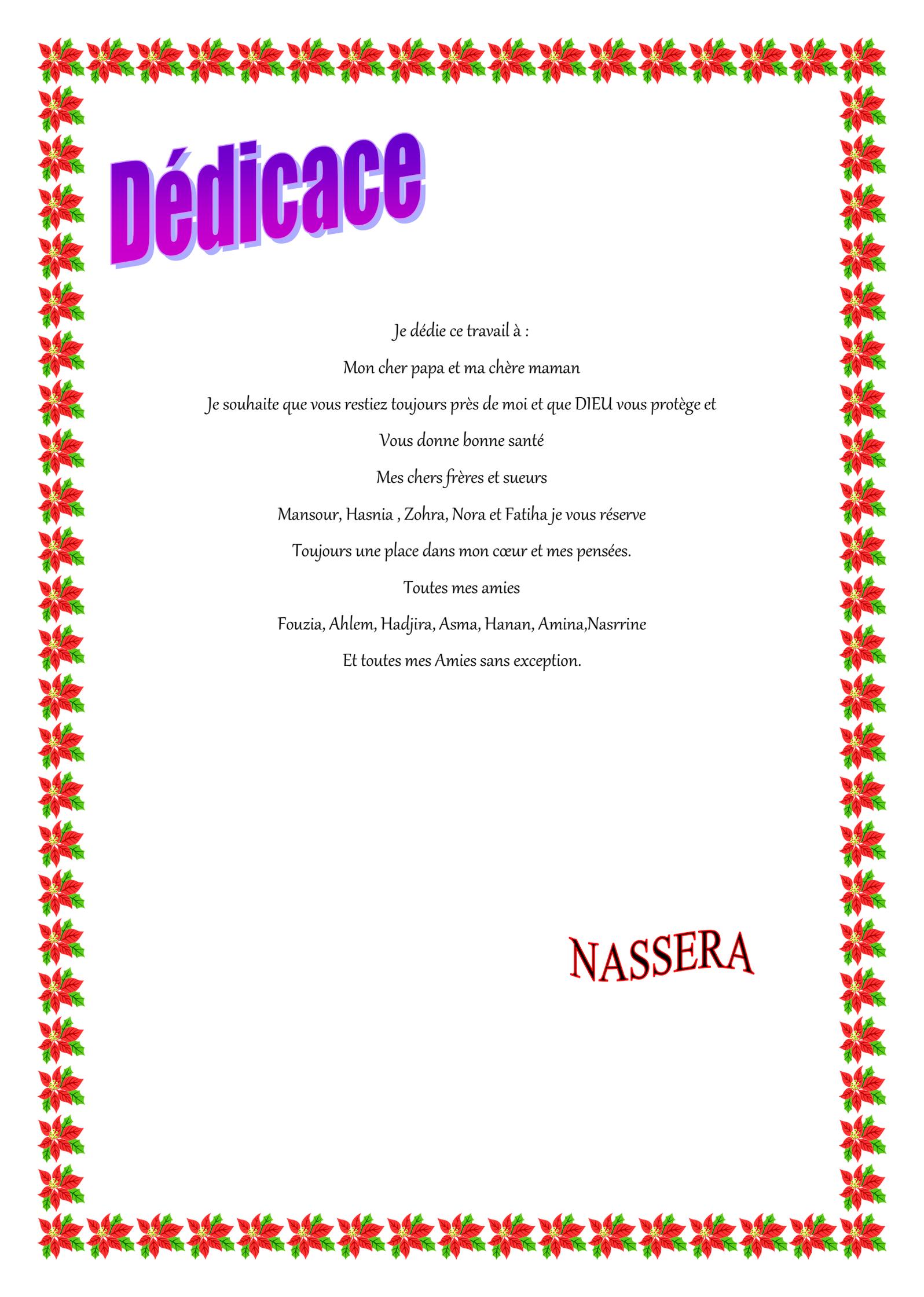
Je remercie Pr .HOMRANI responsable du laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animale.

Je remercie l'ingénieur du laboratoire Mr .BENHARAT NOREDINE qui a aidé avec une grande patience

Enfin je remercie tous ceux et celles qui ont contribués de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qu'ils trouvent l'expression de mes profonds gratitudes et respects.

Merci

NASSERA



Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mon cher papa et ma chère maman

Je souhaite que vous restiez toujours près de moi et que DIEU vous protège et

Vous donne bonne santé

Mes chers frères et sœurs

Mansour, Hasnia , Zohra, Nora et Fatiha je vous réserve

Toujours une place dans mon cœur et mes pensées.

Toutes mes amies

Fouzia, Ahlem, Hadjira, Asma, Hanan, Amina, Nasrine

Et toutes mes Amies sans exception.

NASSERA

Résumé

Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation et la bioconservation des aliments grâce à la production des acides organiques et d'autres substances antibactériennes.

Le but de cette étude caractéristique physiologique et biochimique et la recherche des bactéries lactiques productrices des substances antimicrobiennes chez dix neuf isolats lactiques qui ont été déjà isolées à partir du blé fermenté « Hamoum » de la région de Mazouna.

L'étude des caractères morphologiques a montré deux formes, bacille et coque à des proportions (21,05% des bacilles et 78,94% des coques).

L'étude physiologique et biochimique des isolats (lait bleu de Sherman, type fermentaire, profil fermentaire des sucres.....) a permis d'identifier cinq genres : *Lactobacillus* (21,05%), *Pediococcus* (5,26%), *Enterococcus* (52,63%), *Lactococcus* (10,52%), *Streptococcus* (10,52%).

L'étude du pouvoir antagoniste de dix neuf souches isolées du blé fermenté vis-à-vis des souches pathogènes (*Escherichia coli* ATCC 25122, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), et d'une bactérie lactique du genre *Pediococcus acidilactici* a donné les résultats suivants (97,36% présence d'inhibition et 2,63% absences d'inhibition).

L'emploi d'un milieu tamponné a permis de détecter les inhibitions dues à l'acidité dont le taux est de 5,26%, et celles dues à la production d'autres agents est de 94,73%.

Mots clés : Bactéries lactiques, bactéries pathogènes, activité antimicrobienne, acide lactique, bactériocine.

Abstract

Lactic acid bacteria are used in the fermentation and bioconservation of foods through the production of organic acids and other antibacterial.

The purpose of this characteristic physiological and biochemical study and the search for lactic acid bacteria producing antimicrobial substances in nineteen lactic isolates that have already been isolated from fermented « Hamoum »wheat from the Mazouna region.

The study of the morphological characters showed two forms, bacilli and shell to proportions (21,05% of the bacilli and 78,94% of the shells). The physiological and biochemical study of the isolates revealed that they belong to five genera: *Lactobacillus* (21,05%), *Pediococcus* (5,26%), *Enterococcus* (52,63%), *Lactococcus* (10,52%), *Streptococcus* (10,52%). The study of the antagonistic power of nineteen isolated strains of fermented wheat against four Gram-positive pathogenic strains (*Escherichia coli* ATCC 25122, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), and a lactic acid bacterium of the genus *Pediococcus acidilactici*.

Have allowed results (97,36% presence of inhibition and 2,63% inhibition absences).

The use of a buffered medium detected the acidity inhibitions at the rate of 5.26%, and those due to the production of other agents was 94.73%.

Key words: lactic acid bacteria, pathogenic bacteria, antimicrobial activity, lactic acid, bacteriocin.

ملخص

تستخدم بكتيريا حمض ألبينيك في التخدير و الحفظ الحيوي للأطعمة من خلال إنتاج الأحماض العضوية و غيرها منالمواد المضادة للبكتيريا الأخرى

الغرض من هذه الدراسة الفسيولوجية و البيوكيميائية المميزة والبحث عن البكتيريا حمض اللبنيك التي تنتج مواد مضادة للمكروبات في تسعة عشر عزلة لبنية تتم عزلها بالفعل من القمح "حموم" المخمر من منطقة مازونة أظهرت دراسة الشخصيات المورفولوجية شكلين العصيات و القشرة بنسب : 78,94% من العصيات و من القذائف (21,05%).

كشفت الدراسة الفسيولوجية والكيميائية الحيوية للعزل أنها تنتمي إلى خمسة أجناس:

Lactobacillus(21,05 %), *Pediococcus* (5,26%), *Enterococcus*(52,63%), *Lactococcus*(10,52),
Streptococcus (10,52%)

دراسة القوة المعادية لسلاسل التسعة عشر المعزولة من القمح المخمر ضد أربع سلالات مسببة للأمراض ايجابية الغرام (*Escherichia coli* ATCC 25122, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785).
سمحت النتائج وجود 97, 36% تثبيط وغياب تثبيط 2, 63%

اكتشف استخدام وسط ضابط للحموضة مثبت الحموضة بمعدل 5.26 % وتلك الناجمة عن إنتاج عوامل أخرى بمعدل 94.73 %

الكلمات المفتاحية:

بكتيريا حمض ألبينيك، بكتيريا المسببة للأمراض، نشاط مضادات الميكروبات، حمض ألبينيك
Bacteriocine.

LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC : American Type Culture Collection

ADH : Arginine Di hydrolase

ADN : Acide Désoxyribonucléique M5 :*Pediococcus acidilactici*

ARN_r 16S : Acide ribonucleique ribosomique 16S.

ATP : Adénosine triphosphate

A_w : activité d'eau

BM : bleu de méthylène

FAO : Food and Agriculture Organization- Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

G+C : Guanine + Cytosine

KDa: KiloDalton

MRS : Man, Rogosa et Sharpe

NaOH : Hydroxyde de sodium.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pH : potentiel hydrogène

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les Différents genres des bactéries lactiques d'intérêt en microbiologie des aliments et leurs principales caractéristiques	15
Tableau 2 : Les Souches pathogènes.....	41
Tableau 3 : Aspect macroscopique et microscopique et de la catalase des bactéries lactiques.....	48
Tableau 4 : Aspect macroscopique et microscopique des bactéries pathogènes.....	49
Tableau 5: Caractéristiques physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques.....	54
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des résultats des tests de pré-identification des bactéries lactiques.....	55
Tableau 7 : Effet antibactérien de dix neuf bactéries lactiques vis-à-vis de M5.....	57
Tableau 8: Activité antibactérienne des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes à Gram négatif.....	60
Tableau 9 : Activité antibactérienne des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes à Gram positif.....	62
Tableau 10 : Les inhibitions dues à la production d'acides organiques.....	66
Tableau 11 : Activité antimicrobienne des bactéries pathogènes à Gram positif par les isolats lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).....	70
Tableau 12 : Activité antimicrobienne des bactéries pathogènes à Gram négatif par les isolats lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).....	70

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Enterococcus faecalis</i> observé au microscope électronique	17
Figure 2 : <i>Lactobacillus casei</i> observé au microscope électronique	18
Figure 3 : <i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> observé au microscope électronique	19
Figure 4 : <i>Leuconostoc mesenteroïdes</i> observé au microscope électronique.	20
Figure 5 : <i>Pediococcus</i> observé au microscope électronique	20
Figure 6 : <i>Streptococcus thermophilus</i> observé au microscope électronique	21
Figure 7 : <i>Bifidobacterium sp</i> observé au microscope électronique	22
Figure 8 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S.....	22
Figure 9 : Différents types de fermentation.....	23
Figure 10 : Système protéolytique des bactéries lactiques.....	24
Figure 11 : Principales voies de la lipolyse	25
Figure 12 : Morphologie cellulaire de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
Figure 13: Morphologie cellulaire de <i>Staphylococcus aureus</i> observée en microscopie électronique à balayage	38
Figure 14: <i>Escherichia coli</i> observé au microscope électronique (G×10000).....	40
Figure 15 : Aspect macroscopique de souche M5.....	47
Figure 16 : Aspect microscopique des colonies après coloration de Gram (×100), (A: coque B : bacille)	47
Figure 17 : Proportion des bactéries lactiques.....	48
Figure 18 : Aspect microscopique des bactéries pathogènes après la coloration de Gram (A : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , B : <i>Staphylococcus aureus</i> C: <i>Escherichia coli</i> D: <i>Bacillus cereu</i>	49
Figure 19 : Tests physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques.....	52
Figure 20 : Répartition des genres à partir des différents isolats de blé fermenté.....	55
Lb <i>Lactobacillus</i> ; En : <i>Enterococcus</i> ; L: <i>Lactococcus</i> ; P: <i>Pediococcus</i> ; Str : <i>Streptococcus</i>	
Figure 21 : Effet inhibiteur des isolats vis-à-vis de la souche M5	57
Figure 22 : Inter-inhibition et auto-inhibition des bactéries lactiques	57
Figure 23 : Activité antibactérienne des bactéries lactiques contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
Figure 24 : Activité antibactérienne des bactéries lactiques contre <i>E. coli</i>	59

Figure 25 : inhibitions <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 et <i>E. coli</i> ATCC 25122 par des bactéries lactiques.....	61
Figure 26 : Activité antibactérienne des bactéries lactiques contre <i>Staphylococcus aureus</i> ...	62
Figure 27 : Activité antibactérienne des bactéries lactiques contre <i>Bacillus cereus</i>	62
Figure 28 : Inhibitions <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862 et <i>Bacillus cereus</i> ATCC par des bactéries lactiques.....	63
Figure 29 : Inhibitions des bactéries pathogènes par des bactéries lactiques.....	64
Figure 30 : Taux d'inhibition des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques.....	65
Figure 31 : Test d'inhibition de M5 par les bactéries lactiques sur milieu tamponné (T).....	65
Figure 32 : Taux des inhibitions de souche M5 par les bactéries lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné.....	67
Figure 33 : Taux d'inhibition de M5 par les isolats lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).....	68
Figure 34: Test d'inhibition de <i>P.aeruginosa</i> par les bactéries lactiques sur milieu tamponné (T).....	68
Figure 35 : Test d'inhibition de <i>B.cereus</i> les bactéries lactiques sur milieu (T).....	69
Figure 36 : Test d'inhibition de <i>S. aureus</i> les bactéries lactiques sur milieu tamponné (T)...	69
Figure 37 : Test d'inhibition d' <i>E. Coli</i> les bactéries lactiques sur milieu tamponné (T).....	69
Figure 38 : Taux des inhibitions des isolats lactiques en milieu tamponné.....	72



REMERCIEMENTS

DEDICACE

RESUME.....2

ABSTRACT.....3

.....4

LISTE DES ABREVIATIONS.....5

LISTE DES TABLEAUX.....6

LISTE DES FIGURES7

Introduction.....13

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les bactéries lactiques

1.1. Généralités14

1.2. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques14

1.3. Habitat et origine des bactéries lactiques.....16

1.4. Taxonomie et classification des bactéries lactiques.....16

1.5. Caractéristiques des principaux genres de bactéries lactiques.....16

1.5.1. Genre *Enterococcus*.....16

1.5.2. Genre *Lactobacillus*.....17

1.5.3. Genre *Lactococcus*.....18

1.5.4. Genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*.....19

1.5.5. Genres *Pediococcus*, *Tetragenococcus*.....20

1.5.6. Genre *Streptococcus*.....20

1.5.7. *Bifidobacterium*.....21

1.6. Métabolisme des bactéries lactiques.....22

1.6.1. Définition.....22

1.6.2.	Glycolyse.....	23
1.6.2.1.	Principales voies fermentaires des bactéries lactiques.....	24
1.6.2.1.1	Voie homofermentaire ou EM.....	24
1.6.2.1.2.	Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate.....	24
1.6.2.1.3.	Voie Bifide ou FPC (Fructose 6-hospho-cétolase).....	24
1.6.3.	Protéolyse.....	24
1.6.4.	Lipolyse.....	25
1.7.	Intérêts des bactéries lactiques.....	25
1.7.1.	Dans le domaine alimentaire.....	25
1.7.2.	Dans le domaine thérapeutique.....	26
1.8.	Les activités antimicrobiennes des bactéries lactiques	26
1.8.1	.Les acides organiques	26
1.8.2.	Le peroxyde d'hydrogène.....	27
1.8.3.	Le dioxyde de carbone.....	27
1.8.4.	Le diacétyl.....	27
1.8.5.	La reutéline.....	27
1.8.6.	Acétaldéhyde.....	28
1.8.7.	Les bactériocines.....	28
1.8.7.1.	Historique.....	28
1.8.7.2.	Définition et propriétés des bactériocines.....	28
1.8.7.3.	Classification.....	28
1.8.7.3.1.	Classe I: Les lantibiotiques.....	29
1.8.7.3.2.	Classe II : peptides non modifiés.....	31
1.8.7.3.3.	Classe III : protéines > à 10 KDa.....	32
1.8.7.3.4.	Classe IV : peptides à structure cyclique.....	32
1.8.7.4.	Limites d'utilisation des bactériocines.....	32
1.8.7.5.	Conditionnement des bactériocines.....	33
1.8.7.6.	Les applications des bactériocines.....	33
1.8.7.6.1.	Les bactériocines en agroalimentaire.....	33
1.8.7.6.2.	Les applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire	33
1.8.7.6.2.1.	Les propriétés des bactériocines pour une application alimentaire.....	33
1.8.7.6.2.2.	Les applications des bactériocines dans le secteur alimentaire.....	34
1.8.7.6.3.	Applications médicales des bactériocines.....	34

Chapitre II : Les interactions

II. Les interactions

1. Définition.....	35
2. Interactions entre les souches de bactéries lactiques	35
3. culture mixte des bactéries lactiques.....	35
4. Différents types d'interactions.....	36
4.1. Les Interactions positives : stimulation.....	36
4.2. Les interactions négatives : l'antagonisme.....	36
5. Rôle des bactéries lactiques dans l'altération des aliments.....	36

Chapitre III : Bactéries pathogènes

1. Bactéries pathogènes alimentaires	37
2. présentation des souches pathogènes.....	37
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
2.1.1. Pouvoir pathogène.....	37
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	38
2.2.1. Pouvoir pathogène.....	38
2.3. <i>Bacillus cereus</i>	38
2.3.1. Pouvoir pathogène.....	39
2.4. <i>E. coli</i>	39
2.4.1. Pouvoir pathogène.....	39

Partie II. Étude expérimentale

I. Matériel et méthodes

1. Lieu d'étude	41
2. Origine des souches.....	41
2.1. Les souches lactiques	41
2.2. Les souches pathogènes	41
3. Milieux de culture	41
4. Purification des souches lactiques	41
5. Identification	41
6. Etude des caractères morphologiques	42
7. Conservation des bactéries lactiques	42
8. Purification et identification des souches pathogènes	42
9. Caractérisation biochimique et physiologique des isolats lactiques	42

9.1. Croissance sur lait bleu de Sherman	43
9.2. Détermination du Type fermentaire.....	43
9.3. Profil fermentaire des sucres	43
9.4. Recherche de l'Arginine dihydrolase (ADH)	43
9.5. Thermorésistante.....	44
9.6. Croissance à différentes températures	44
9.7. Croissance à pH 9,6 et pH 5	44
9.8. Croissance en présence de NaCl.....	44
9.9. Croissance en présence d'azide de sodium	44
10. Etude de l'activité antibactérienne des souches	45
10.1. Activité antibactérienne des souches lactiques contre une souche de l'espèce <i>Pediococcus acidilactici</i>	45
10.1.1. Méthode de double couche (méthode de Fleming et <i>al.</i> , 1975)	45
10.2. Activité antibactérienne des cultures lactiques contre des souches pathogènes.....	46
11. Recherche de substances inhibitrices	46

II. Résultats et discussion

2.1. Examen macroscopique et microscopique.....	47
2.2. Revivification de la pureté des bactéries pathogènes.....	48
3. Caractérisation physiologique et biochimique	49
3.1. Caractérisation biochimique.....	49
➤ Lait bleu de Sherman.....	49
➤ Les résultats du type fermentaire	50
➤ Profil fermentaire.....	50
➤ Test de l'ADH	50
3.2. Caractérisation physiologique.....	50
➤ Thermorésistante	50
➤ Croissance à différentes températures	50
➤ Croissance à pH 9,6 et pH 5	50
➤ Croissance à la concentration de NaCl (6,5%)	51
➤ Croissance en présence d'azide de sodium	51
4. Activité antibactérienne des souches	56

4.1. Pouvoir antibactérien de quelques cultures lactiques contre une souche de l'espèce <i>Pediococcus acidilactici</i>	56
4.2. Pouvoir antibactérien des isolats lactiques contre des souches pathogènes	58
4.2.1. Résultats de l'interaction entre les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes à Gram négatif	59
4.2.2. Résultats de l'interaction entre les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes à Gram positif.....	61
5. Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur.....	65
5.1. Inhibitions dues à la production d'acides organiques.....	65
Conclusion	73
Références bibliographiques	74
Annexes A	84
Annexes B	85

Introduction

INTRODUCTION

La sécurité alimentaire est une priorité de santé publique et un enjeu économique majeur qui préoccupe le consommateur, et les entreprises doivent être très conscient de leur responsabilité dans ce domaine. Les chercheurs et les industriels de l'agro-alimentaire sont de plus en plus contraints à réduire l'emploi de ce type de conservateurs, en utilisant des bactéries lactiques et leurs substances actives.

Les céréales sont la base de l'alimentation humaine (Multon, 1982 ; Molinié et Pfohl Les zhowicz, 2003), où ils ont des propriétés pouvant nous apporter des bienfaits pour la santé humaine (Doumandji et al., 2003).

Parmi ces microorganismes associés au blé fermenté (Gourchala et al., 2014), Les bactéries lactiques sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées. Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone et, à un moindre degré, de dégrader les protéines et les lipides mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exopolysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés **(Mozzi et al., 2010)**.

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique, naturellement produits par des bactéries à Gram négatif telles que les entérobactéries et plus souvent par des bactéries à Gram positif telle que les bactéries lactiques. Elles sont actives contre d'autres bactéries mais surtout contre des pathogènes. Aussi, les bactériocines produites par les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène de peptides antimicrobiens qui se distinguent par leur structure et leur mode d'action. De nombreuses recherches ont porté sur l'étude des bactériocines produites par les bactéries lactiques pour mieux comprendre leurs relations structure-fonction et favoriser ainsi leurs applications. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont déjà largement utilisées par l'industrie agroalimentaire pour leurs propriétés de bioconservation (Gálvez et al., 2011).

L'objectif de notre travail, est de réaliser une Identification de bactéries lactiques à partir d'un blé fermenté, et une recherche de l'effet antagoniste des isolats lactiques vis-à-vis de quatre bactéries Pathogènes et vis-à-vis une bactérie lactique *Pediococcus acidilactici* **(M5)**, cette étude activité antibactérien est représentée par une étude de la nature des substances inhibitrices.

partie I
partie I
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Les bactéries lactiques

I : les bactéries lactiques

1.1. Généralités :

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen (1919) et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acidelactique.

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène de microorganismes, produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. En dehors de ce trait commun, les nombreux genres et espèces qui constituent ce groupe présentent une grande diversité de caractéristiques morphologiques. Cela se traduit par l'existence au sein des espèces, de nombreuses souches possédant des propriétés technologiques différentes (Desmazeaud, 1996). Les bactéries lactiques colonisent de nombreux produits alimentaires, comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. (Stiles et al., 1997. Klaenhamer et al., 2005).

Les bactéries lactiques sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires et sont de ce fait largement utilisées en tant que starters dans les produits alimentaires fermentés, ou elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation. (Abée, 1995, Hugenholtz et al., 1999).

1.2. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques

Ce sont des microorganismes à la forme de cocci ou bâtonnets Gram positif, généralement immobiles et non sporulés. Il existe d'autres bactéries produisant de l'acide lactique mais qui ne sont pas considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques. C'est le cas, par exemple, de *Bacillus* et *Sporolactobacillus* qui sont des bactéries Gram(+) sporulées (Axelsson, 2004).

Les bactéries lactiques ne possèdent ni nitrate réductase, ni catalase, ni cytochrome oxydase mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène. L'absence de catalase est caractéristique, mais certaines espèces acquièrent une activité sur des milieux riches en hème (Larrent et al., 1997, Bourgeois et al., 1996).

Les bactéries lactiques synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. On les distingue en deux groupes biochimiques : les homofermentaires et les hétérofermentaires. Les homofermentaires produisent deux molécules d'acides lactiques par glucose consommé. Chez les hétérofermentaires ; seule une molécule d'acide lactique est produite à partir du glucose. Une autre molécule en C2 est produite (en général soit de l'éthanol soit de l'acide acétique) et une molécule d'oxygène. La différence entre ces deux groupes est détectable par le dégagement de CO₂ (Bourgeois et al., 1996).

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature, sur la peau, dans le système digestif, la muqueuse vaginale où elles accomplissent de nombreuses fonctions. Elles créent surtout un environnement hostile aux bactéries pathogène. Elles survivent dans un milieu à faible A_w , et résistent à l'éthanol (10-15% éthanol et à l'eau CO_2).

En général, les bactéries lactiques ont des besoins complexes de croissance tels que vitamine B, acides aminés, peptide, bases puriques et pyrimidiques. Les milieux de culture sont complexe et dites « riches ». Il est donc difficile d'obtenir de bons milieux sélectifs. Seul l'abaissement du pH est souvent utilisé comme agent de sélection. Les bactéries lactiques tolèrent en effet des pH acides (pH=5 et parfois moins).

A ces pH, beaucoup de bactéries communes ont leur croissance inhibée. Ces propriétés sont utilisées en agro alimentaire pour transformer la matière et empêcher le développement de la plupart des bactéries d'altération ou des pathogènes. Il apparaît donc que les produits fermentés puissent être considérés comme « à faible risque » vis-à-vis des pathogènes courants. Cependant, il n'est pas exclu que des souches particulières d'une espèce de bactéries indésirables puissent se développer. D'autres microorganismes sont également connus pour se développer à pH acide ; comme de nombreuses levures et moisissures (Nielsen et *al.*, 2008).

La production d'acide lactique par les bactéries lactiques conduisant à un abaissement important du pH du milieu est largement utilisée en industrie agro-alimentaire. Chez certains industriels, le suivi de l'acidification est une garantie, quand la cinétique est correcte, d'un produit bien fait et sans développement de pathogènes. La croissance excessive des bactéries lactiques pourrait, par contre, être néfaste dans certains cas, en entraînant par exemple un mûrissement du goût du vin, de la bière, des viandes, du jus de fruits....) (Guiraud et *al.*, 2003).

Tableau1 : les Différents genres des bactéries lactiques d'intérêt en microbiologie des aliments et leurs principales caractéristiques (Fidirighi, (2005)).

Genres	Morphologies	Fermentations	Caractéristiques principales	Habitats principaux
<i>Lactobacillus</i>	bacilles	Homofermentaires ou hétérofermentaires	Thermophiles ou mésophiles	Homme, produits laitiers carnés, végétaux
<i>Carnobacterium</i>	bacilles	hétérofermentaires	Psychrotrophes peu acidotolérants	Produits carnés, poissons, produits laitiers
<i>Lactococcus</i>	coques	homofermentaires	Mésophiles croissance à 45 et non à 10°C, thermorésistants	produits laitiers, végétaux
<i>Streptococcus thermophilus</i>	coques	homofermentaires	Thermophiles	produits laitiers
<i>Enterococcus</i>	coques	homofermentaires	Mésophiles, halophiles	Intestin de l'homme et des animaux, produit laitiers
Bifidobactérium	coques mobiles	homofermentaires	mésophiles	Intestin de l'homme et des animaux
<i>Pediococcus</i>	Forme irrégulier	Acide acétique lactique	mésophiles	Bière, produits végétaux, saucissons
<i>Tetragenococcus</i>	coques en tétrades	homofermentaires	mésophiles	saumures
<i>Leuconostoc</i>	coques	hétérofermentaires	mésophiles	produits végétaux, produits laitiers
<i>Oenococcus</i>	coques	hétérofermentaires	mésophiles	vin

1.3. Habitat et origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Hassan et Frank, 2001).

1.4. Taxonomie et classification des bactéries lactiques

L'élaboration de la taxonomie est basée sur un large ensemble de critères regroupant les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques (Pot, 2008).

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'aptitude de croître à de fortes concentrations de sels (6.5%, 18%), la tolérance aux pH acides, alcalins et à l'éthanol, la configuration de l'acide lactique produit à partir de glucose, l'hydrolyse de l'arginine, la formation d'acétone, etc. Les marqueurs chimio-taxonomiques comme la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire peuvent aussi être utiles dans la classification (König et Fröhlich, 2009).

L'identification des espèces de bactéries lactiques peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates à l'aide du système API 50 CHL (Curketal., 1993).

Selon la dernière édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology*(2009), les bactéries lactiques sont classées dans l'embranchement des *Firmicutes*, la Classe des *Bacilli* et l'ordre des lactobacillales, renfermant ainsi trente-cinq genres répartis sur six familles.

1.5. Caractéristiques des principaux genres de bactéries lactiques :

Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans le domaine de la biotechnologie, il s'agit de :

1.5.1. Le genre *Enterococcus*

Les *Enterococcus* représentent le groupe des entérocoques, ils sont composés de streptocoques fécaux (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*). Ce genre comprend des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes. Il se caractérise par sa tolérance à 6,5% de NaCl, au pH 9,6 et par la croissance à 10°C et 45°C avec une température optimale de croissance de 35°C à 37°C (Zhang et Cai, 2014). Les entérocoques peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol (Tamime, 2002 ; Ho et al., 2007)



Figure 1 : *Enterococcus faecalis* observé au microscope électronique (Wallace et al, 2003).

1.5.2. -Le genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004) :

Groupe I « *Thermobacterium* » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.

Groupe II « *Streptobacterium* » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. Sake* et *Lb. plantarum*.

Groupe III « *Betabacterium* » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. Brevis* et *Lb. anfrancisco*.

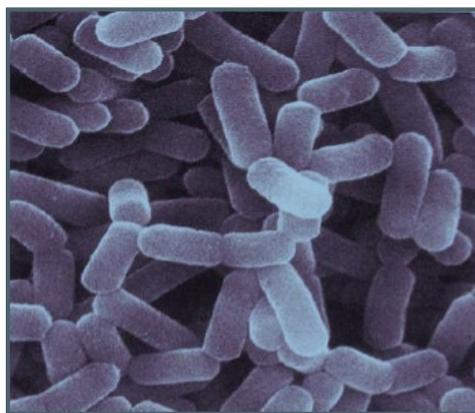


Figure 2 : *Lactobacillus casei* observé au microscope électronique (Corrieu & Luquet, 2008).

1.5.3. Le genre *Lactococcus*

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paires ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar *.Diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable à se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables à se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

Elles se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits (Zhang et Cai, 2014).

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp.

cremoris et *Lc. lactis* ssp. *Hordniae* (Pot et al., 1996 ; Pot, 2008). Selon Guiraud

(1998), le genre *Lactococcus* est représenté par les espèces suivantes : *Lc. Lactis* ssp.

cremoris, *Lc. Lactis* ssp. *Lactis* et *Lc. diacetylactis*. La sous espèce *Streptococcus Lactis* ssp. *diacetylactis* est remplacée par la sous espèce *Lactococcus Lactis* ssp. *Lactis*.

Le lait est un habitat privilégié des lactocoques (Dellaglio et al., 1994 ; Corroleret al., 1999). *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus étudiée et la plus fréquemment détectée dans les laits crus (Corroleret al., 1998 ; Dalmasso et al., 2008)



Figure3 : *Lactococcus lactis subsp lactis* observé au microscope électronique
(www.bioweb.usu.edu).

1.5.4. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrans, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et à température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al., 1998 ; Ho et al., 2007).

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des leuconostoc entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Les leuconostoc principalement *Ln. Mesenteroides* ssp. *cremoris* et *Ln. Lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyl et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Hassan et Frank, 2001 ; Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008).

Récemment, l'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été classée dans un nouveau genre, *Oenococcus oeni* et certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzappel, 1997).

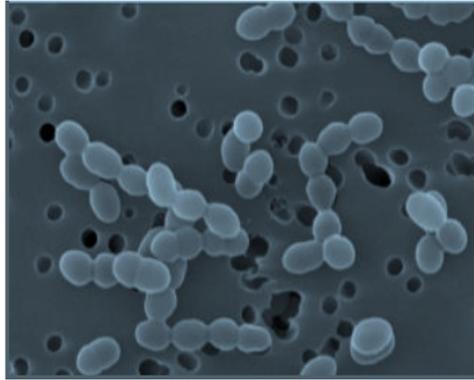


Figure 4 : *Leuconostoc mesenteroides* observé au microscope électronique. (Wallace et *al.*, 2003)

1.5.5. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement entétrade. Ils sont mésophiles, le plus souvent incapables d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et *al.*, 2005).

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les pediocoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Guiraud et Rosec, 2004 ; Tosukhowong et *al.*, 2005).

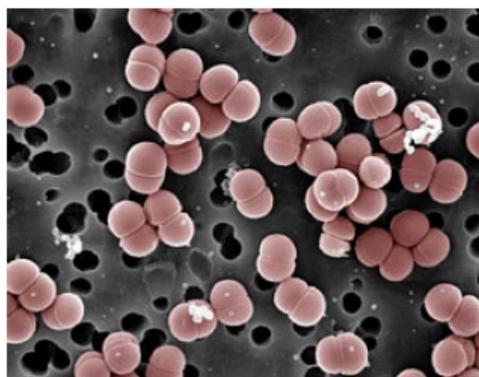


Figure 5 : *Pediococcus* observé au microscope électronique (Wallace et *al.*, 2003)

1.5.6. Le genre *Streptococcus*

Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres

streptocoques (Scheilfer, 1987). Les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH: 9,6. Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes.

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais a ensuite été transférée au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (Stiles et Holzappel, 1997). *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbone permettent de distinguer les *St. Thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Hadie, 1986 ; Pilet *et al.*, 2005).

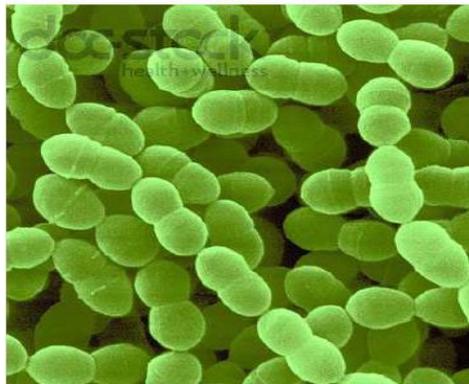


Figure 6 : *Streptococcus thermophilus*, observé au microscope électronique (Corrieu et Luquet, 2008).

1.5.7. Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G + C. Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme V mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de

l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36°C à 43°C (Axelsson et al., 2004 ; Pilet et al., 2005 ; Ho et al., 2007).



Figure 7 : *Bifidobacterium* sp observé au microscope électronique (Wallace et al., 2003)

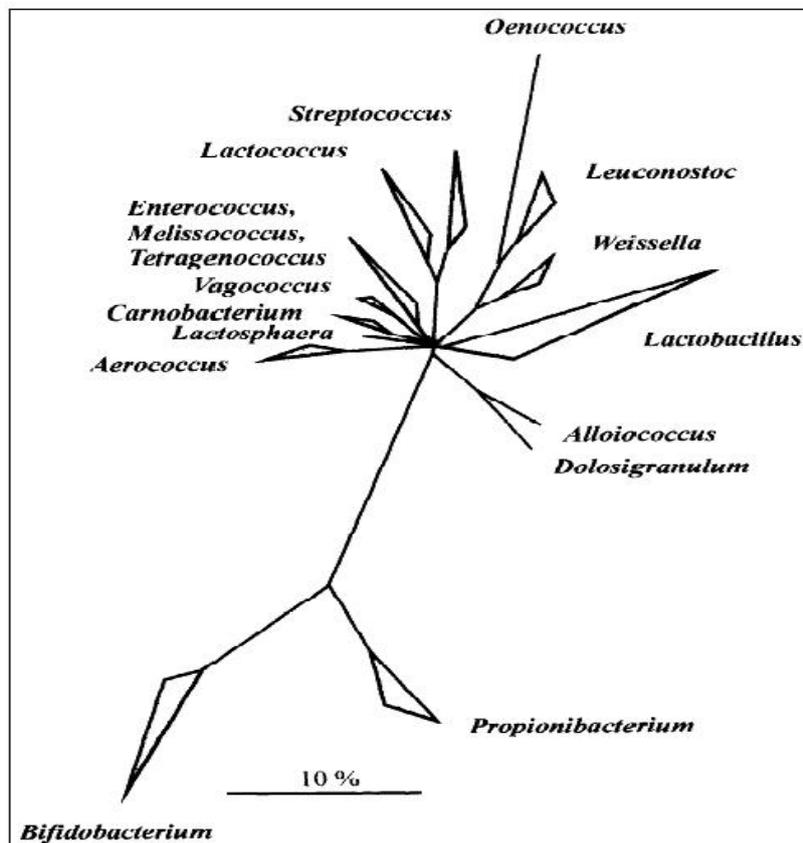


Figure 08 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr 16S (Stiles et Holzapfel, 1997).

1.6. Métabolisme des bactéries lactiques

1.6.1 .Définition :

La fermentation est un processus produisant de l'énergie par oxydation de composés organiques, principalement des glucides, où un donneur d'électron, NADH cède ses électrons à un accepteur endogène, le pyruvate. Dans la respiration les électrons sont donnés à un accepteur exogène, l'oxygène pour la respiration aérobie et le nitrate ou le sulfate pour la respiration anaérobie. (Prescott et *al.*, 2003)

1.6 .2.La glycolyse

Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle. Les hétérotrophes, elles tirent leur énergie de la fermentation de substrats carbonés. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), des hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccarides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose). La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (Atlan et *al.*, 2008):

- le transport du sucre à travers la membrane cellulaire,
- le catabolisme intracellulaire du sucre,
- formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (figure 09). Il s'agit des voies homofermentaire (Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (Atlan et *al.*, 2008).

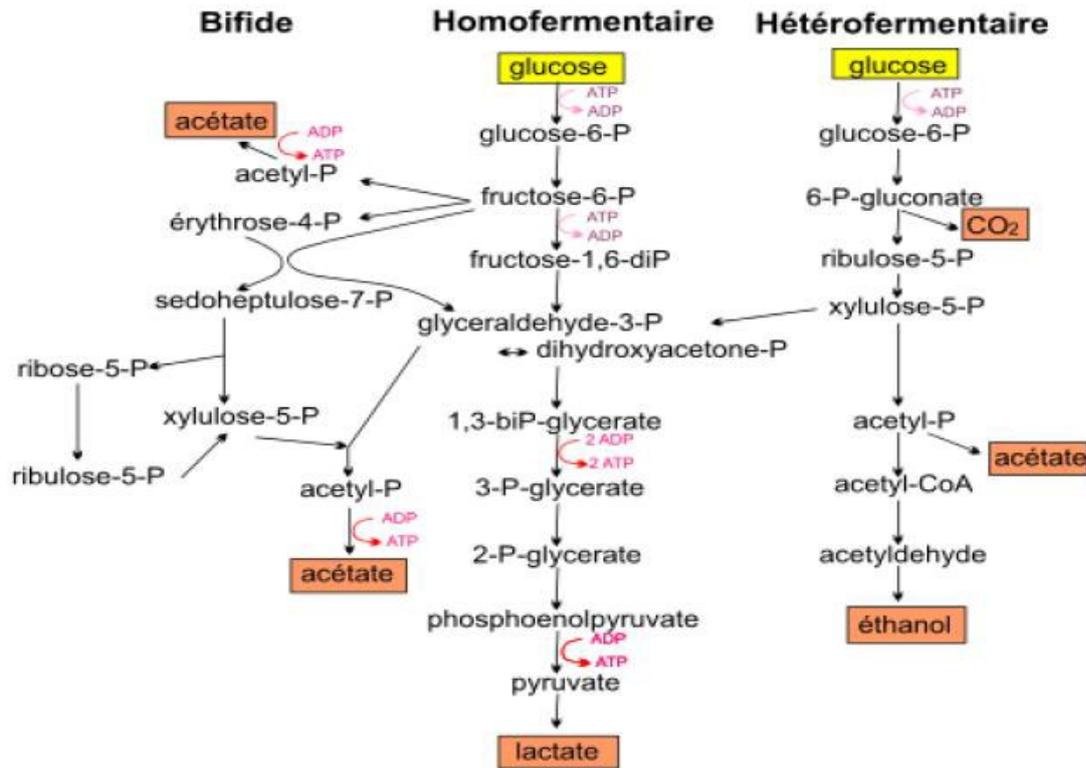


Figure 0 9: Différents types de fermentation (Axelsson, 2004)

1.6.2.1. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

1.6.2.1.1. La voie homofermentaire est généralement associée aux bactéries des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Le métabolisme est qualifié d'homolactique lorsqu'au moins 90% du glucose consommé est converti en lactate (Atlan et al., 2008). Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

1.6.2.1.2. La voie hétérofermentaire : Certaines bactéries des genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus* empruntent une voie hétérofermentaire qui conduit à la production d'un lactate, d'un éthanol, d'un CO₂ et d'un ATP par mole de glucose (Thompson et Gentry-Weeks, 1994)

1.6.2.1.3. La voie bifide : le genre *Bifidobacterium* suit une voie de fermentation particulière appelée voie bifide. Le bilan net de cette voie bifide est 1,0 mole de lactate, 1,5 mole d'acétate et 2,5 moles d'ATP par mole d'hexose, ce qui est légèrement supérieur au rendement de la glycolyse en terme énergétique (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

1.6.3. La protéolyse :

L'incapacité des bactéries lactiques à synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique nécessite un fonctionnement actif de leur système protéolytique dans les

environnements où les protéines constituent la principale source d'azote (Law et Haandrikman, 1997). Ces systèmes sont complexes de par le nombre et la nature des protéases et peptidases présentes, mais également de par leur localisation cellulaire.

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse des protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés (Law et Haandrikman, 1997). La figure 10 représente la synthèse protéolytique chez les bactéries lactiques.

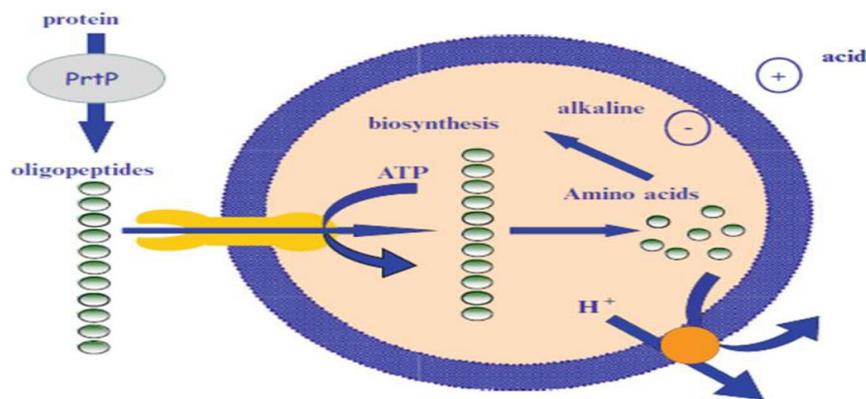


Figure 10. Système protéolytique des bactéries lactiques (Kunji *et al.*, 1996)

1.6.4. La lipolyse :

Les lipases bactériennes catalysent en partie la production des acides gras à longues chaînes à partir des mono et di glycérides, alors que les estérases permettent la libération des acides gras volatils. Les acides gras, dont la concentration augmente pendant l'affinage, seraient responsables en partie de la saveur typique des fromages à pâte pressée cuite. Ils sont également des précurseurs pour la formation de méthylcétone, alcools, lactones et esters (Siegumfeldt *et al.*, 2000). La figure 11 présente les différentes voies conduisant à la formation de ces composés.

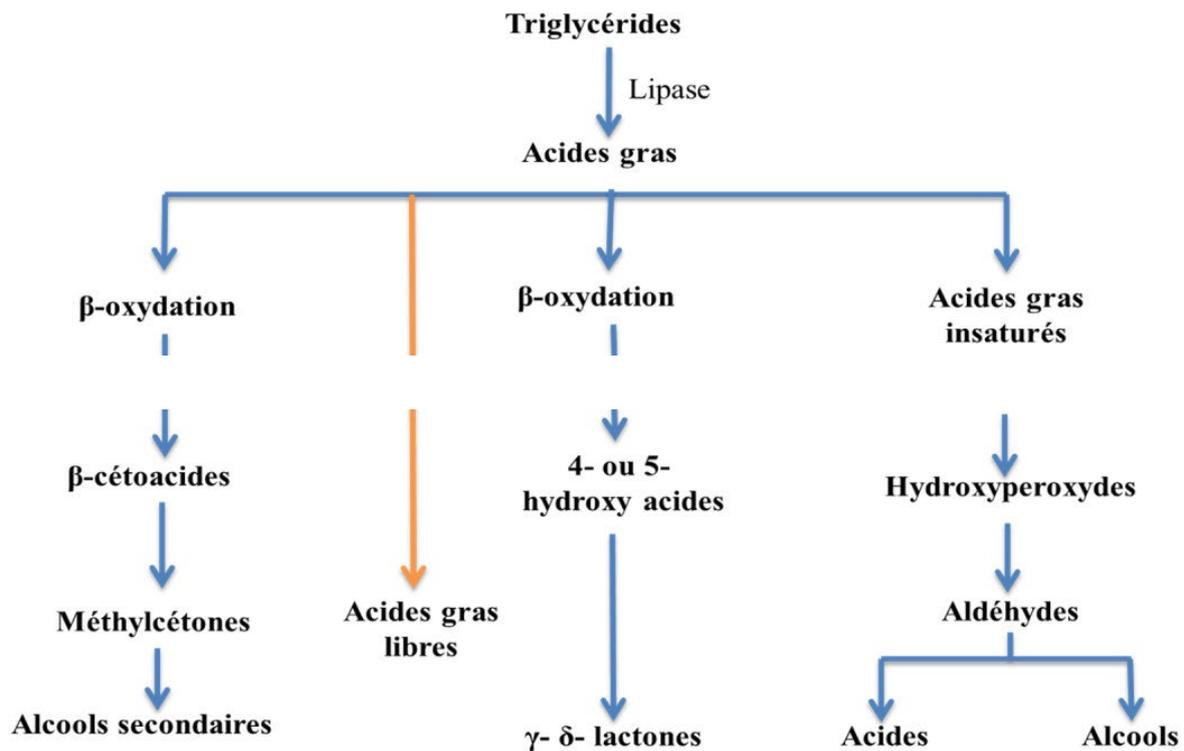


Figure 11. Principales voies de la lipolyse (Siegumfeldtetal.,2000).

1.7. Intérêts des bactéries lactiques

Le principal atout que représentent les bactéries lactiques pour l'industrie alimentaire réside dans l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques et en augmentant leur durée de conservation (Stiles et Holzpafel, 1997). Elles participent à l'inhibition de certains microorganismes pathogènes, en produisant des métabolites ayant une activité antimicrobienne (Dortu et Thonard, 2009).

1.7.1. Dans le domaine alimentaire

L'implication des bactéries lactiques dans la fermentation et la bioconservation des aliments est connue depuis la nuit des temps. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem *et al.*, 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain sont entre autres des produits de fermentation des bactéries lactiques (Yvette Soustre, 2009). L'utilisation de ces dernières a pour but d'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et par conséquent augmente la durée de leur conservation sans pour autant utiliser de conservateurs chimiques, et ce grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles produisent (Dortu et Thonart, 2009). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, innocuité, facilité de

culture, de conservation, et maintenance des propriétés désirables lors du stockage (Marth et Steele, 2001).

1.7.2. Dans le domaine thérapeutique

Les bactéries lactiques, considérées comme probiotiques, confèrent des bénéfices à l'hôte en maintenant une balance de la microflore intestinale (Yateem et al., 2001). Différentes études ont démontré aussi bien le rôle préventif que curatif de ces bactéries sur différents types de diarrhées (Mkrtychyan et al., 2010). D'autres ont cité leur capacité à diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish et al., 2011). Cependant, depuis quelques années l'usage des bactéries lactiques dans d'autres écosystèmes (vaginal, mammaire) a été évalué, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques (contre les métrites ou les mammites) (Bouchard, 2013), également dans l'élaboration des vaccins (Calvez et al., 2009). Uehara et al., (2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires à empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie, ainsi que des problèmes liés aux infections urinaires.

1.8. Les activités antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques constituent un moyen biologique efficace pour la préservation des qualités hygiéniques des aliments, du fait de leur aptitude inhibitrice vis-à-vis des microorganismes nuisibles (Caridi et al., 2003). En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes, comme des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, du dioxyde de carbone, de la reutéline, du diacétyle et des bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

1.8.1. Les acides organiques

Les acides organiques sont produits par les bactéries lactiques au cours de processus de fermentation alimentaires. Leur effets antimicrobiens sont bien connus à l'heure actuelle (Tou et al., 2006). Ces acides, sous leur forme dissociée ou non dissociée, agissent au niveau de la membrane et en inhibant les systèmes membranaires de transport actif (Annan Prah et Agyeman, 1997). L'activité antimicrobienne d'un acide organique dépend de sa nature (Acide fort, acide faible). L'acide acétique, par exemple, est plus inhibiteur que l'acide lactique ; il inhibe les levures, les moisissures et les bactéries (Blom et Mortvedt, 1991).

1.8.2. Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques sont dépourvues de catalases catalysant la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène (Condon, 1987). Le peroxyde d'oxygène peut s'accumuler et être inhibiteur de différents microorganismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (Zalan et al., 2005).

1.8.3. Dioxyde de carbone :

Le dioxyde de carbone est produit principalement par voie hétérofermentaire. Le mécanisme précis de ses propriétés antimicrobiennes est encore inconnu. Cependant, le CO_2 peut jouer un rôle dans la création d'un environnement anaérobie qui inhibe la décarboxylation enzymatique, et l'accumulation de CO_2 dans la bicouche lipidique de la membrane peut provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité (Ammor et al., 2006). Le CO_2 peut inhiber efficacement la croissance de nombreux micro-organismes responsables de la détérioration des aliments, en particulier les bactéries Gram négatives psychrotrophes. Le degré d'inhibition par le CO_2 varie considérablement entre les microorganismes. Le CO_2 à 10% pourrait réduire les charges bactériennes de 50%, et à 20-50%, il a une forte activité antifongique (Yang, 2000).

1.8.4. Le diacétyl :

Le diacétyl est un produit du métabolisme du citrate qui est responsable de l'arôme des produits laitiers. Le diacétyl a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (El Ziney et al., 1998).

1.8.5. La reutérine

Lactobacillus reuteri, une espèce de bactéries lactiques dont la niche écologique est le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux, convertit le glycérol en une substance antimicrobienne appelée reutérine (Axelsson et al., 1989) dans des conditions d'anaérobiose (Ganzle et al., 2000). La reutérine est un agent antimicrobien puissant à faible poids moléculaire, neutre et soluble dans l'eau (Axelsson et al., 1989), résistant aux enzymes. La reutérine est active contre les bactéries à Gram positif et négatif, ainsi que les levures, les moisissures et les protozoaires (Cleusix et al., 2007). Les microorganismes d'altération comprenant les espèces de *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida*, et *Trypanosoma* sont aussi sensibles à la reutérine (Yang, 2000).

1.8.6. Acétaldéhyde

Les bactéries lactiques sont capables de produire de l'acétaldéhyde à partir du glucose

(Devoyod et Poullain, 1988). Chez *Lb. Delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, l'action d'une thréonine aldolase, clive la thréonine en acétaldéhyde et en glycine. L'acétaldéhyde à une concentration de 10 à 100 ppm empêche la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella Typhimurium* et d'*E. Coli* dans les produits laitiers (Piard et Desmazeaud, 1991).

1.8.7. Les bactériocines :

1.8.7.1. Historique

L'histoire de bactériocines s'étend au début des années 1920. Bien que leur activité antimicrobienne ait été découverte en 1928, les bactériocines n'ont pas été utilisées dans les produits alimentaires jusqu'en 1951. Dans les années 1960, la première bactériocine, appelée nisine, qui est produite par *Lactococcus lacti* ssubsp *lactis*, a été purifiée et reconnu comme agent de conservation alimentaire par la FAO/OMS en 1969. En 1988, la FDA a approuvé l'utilisation de la nisine comme additif dans les produits en conserves aux États-Unis pour inhiber la croissance de *Cl. botulinum*. En outre, les résultats d'études de recherche indiquent que la résistance de *Listeria monocytogenes* à la nisine ne semble pas être stable.

1.8.7.2. Définition et propriétés des Bactériocines

Les bactériocines sont des protéines ou des complexes de protéines, avec une activité bactéricide dirigée contre des espèces proches de la souche productrice. Elles sont caractérisées par des propriétés biochimiques, mode et spectre d'action différents (Klaenhammer, 1988).

Ce sont des molécules qui sont synthétisées par voie ribosomale et sont considérées comme des métabolites primaires. Les gènes responsables de leur synthèse sont organisés en opéron (Hust, 1981 ; Jack et al., 1995).

1.8.7.3. Classification

La première classification des bactériocines revient à Klaenhammer (1993), cet auteur a proposé de classer ces bactériocines en quatre classes selon les caractéristiques communes telles que le poids moléculaire, les propriétés physicochimiques, leur mode d'action (large ou restreint), leurs propriétés génétiques et leur stabilité thermique : classe I (peptides modifiés), classe II peptides non modifiés, classe III (protéines thermolabiles) et classe IV (protéines complexes nécessitant une partie glucidique ou lipidique pour leur activité).

Avec la découverte de nouvelles bactériocines ayant une structure cyclique, une nouvelle classification est proposée par Cotteret al (2005). En effet, ces auteurs ont sauvegardé la classe I mais ont supprimé la classe IV et ont renommé la sous classe IIc (initialement cette classe était caractérisée par l'activation des bactériocines par la présence de groupement thiols). Cotter et al (2005) ont proposé ensuite la classification suivante : classe I

:lantibiotiques , classe II : Iia pediocine-like, I Ib bactériocine à deux ou plusieurs peptides, I Ic peptide cycliques, I Id autres peptides n'appartenant ni à I Ia ni à I Ib et enfin la classe III protéines.

Cependant, cette classification est légèrement remise en cause par Heng et *al* (2007) surtout pour les sous classe de la classe II. Ils proposent alors une autre classification qui est la suivante :

- **Classe I** : Lantibiotiques,
- **Classe II** : Bactériocines à deux ou plusieurs peptides
 - Sous classe I Ia : pediocine –like
 - Sous classe I Ib : deux ou plusieurs peptides
 - Sous classe I Ic : autres bactériocines
- **Classe III** : Protéines supérieures à 10 kDa
 - Sous classe IIIa : Bactériolysines
 - Sous classe IIIb : Protéines non lytiques
- **Classe V** : Peptides à structure cyclique.
 - **Classe I : les lantibiotiques**

Les lantibiotiques sont des peptides d'une taille qui varie de 19 à 38 résidus d'acides aminés. Ils sont caractérisés par la présence dans leur structure primaire d'acides aminés modifiés tels que : la lanthionine (Lan), ²-méthyl lanthionine (Met Lan), la dehydroalanine (Dha) et la dehydrobutyrine (Dhb). Ces derniers sont issus de modifications post-traductionnelles. Ils sont stables à la chaleur, hydrophobes et leur masse moléculaire est inférieure à 5 kDa (Morisset *et al.*, 2005 ; Heng et *al.*, 2007).

Les lantibiotiques du monde bactérien, ont été initialement divisés en deux sous classes en fonction de leur homologie structurale (sous classe A et B), par la suite, des chercheurs ont observés que certaines bactériocines des deux sous classes possédaient les deux modes d'action simultanément (formation de pore et blocage de la synthèse de la paroi) et d'autres étaient formés de deux peptides. Une nouvelle classification de cette classe a été proposée, actuellement cette classe est divisée en 11 sous classes (Weidemann et *al.*, 2001 ; Cotter et *al.*, 2005).

Cependant, les bactéries lactiques et plus particulièrement les *Lactococcus* produisent uniquement des bactériocines de deux sous classes A et B. De plus, les bactériocines des classes I et II sont les mieux étudiées car elles sont les plus abondantes et paraissent se prêter le mieux à des applications dans l'industrie alimentaire (Dacosta, 2000).

Récemment, une nouvelle classification des lantibiotiques produits par les bactéries lactiques a été proposée par Asaduzzaman et Sonomoto (2009). En effet, ces auteurs classent les lantibiotiques en trois sous classes principales : lantibiotiques type A avec deux sous classes AI (les résidus lanthionine et 3-méthyllanthionine sont formés par deux enzymes : LanB et LanC) et AII (les résidus modifiés sont formés par une seule enzyme : LanM), le type B ou lantibiotique globulaire et le type C qui regroupe les lantibiotiques à plusieurs peptides. Ces auteurs ont également proposé de classer les lantibiotiques en se basant sur l'homologie des séquences des loci codant pour ces peptides. En effet, ils ont fait ressortir deux classes : classe I caractérisée par la présence d'un motif très conservé à la position -20 et -15 et par la présence d'une proline à la position -2 tandis que la classe II est plutôt caractérisée par la présence de doublet GG et GA au niveau du site de clivage du peptide leader et initialement appelé «motif double glycine». Ils sont également caractérisés par la présence de plusieurs résidus Asp et Glu.

Les lantibiotiques de type A

Les lantibiotiques de type A sont des peptides linéaires, cationiques (chargés positivement), leur structure secondaire est en hélice \pm , amphiphiles et leur masse moléculaire est inférieure à 4 KDa (Arthur et Satu, 2004 ; Lorraine *et al.*, 2008). On distingue deux sous types : AI comme la nisine, peptide linéaire et AII comme la lacticine 481 organisée en queue et en anneau (Asaduzzaman et Sonomoto, 2009).

Le lantibiotique de type A le mieux caractérisé est la nisine synthétisée par *Lactococcus lactis*. Cette dernière existe sous deux formes (nisine A et nisine Z) qui se distinguent seulement par le fait que le résidu occupant la position 27 est de l'histidine pour la nisine A et de l'acide aspartique pour la nisine Z (Dacosta, 2000 ; Cheigh et Pyun, 2005).

Les lantibiotiques de type B

Cette sous classe comprend des peptides globulaires d'une structure plus compacte, chargés négativement. Ils peuvent contenir jusqu'à 19 résidus d'acides aminés. Leur masse moléculaire se situe entre 1,8 et 2,1 KDa (Twomey *et al.*, 2002).

Les lantibiotiques type C

Les lantibiotiques de cette sous classe sont constitués de deux ou plusieurs peptides qui sont nécessaires à leur activité. On en trouve aussi dans cette sous classe les lantibiotiques qui possèdent les deux modes de fonction (formation de pore et inhibition de la synthèse de la paroi).

La lacticine 3147 A1 et A2 produites toutes les deux par la *Lactococcus lactis* font partie de cette sous classe (Dortu et Thonart, 2009).

- **Classe II : Peptides non modifiés**

Ce sont des peptides non modifiés, de masse moléculaire inférieure à 10 KDa, très stables à la chaleur. Leur pHi se situe entre 8 et 10. Cette classe est également divisée en trois sous classes : IIa, IIb et IIc (Diep et Nes, 2002 ; Dortu et Thonart, 2009).

Sous classe IIa

Les bactériocines de cette sous classe sont composées de 27 à 48 résidus d'acides aminés, elles possèdent une extrémité N-terminale hydrophobe contenant une séquence consensus (Yngnv) très conservée au cours de l'évolution (Dridier *et al.*, 2006).

Elles sont également caractérisées par l'existence d'un pont disulfure au niveau de leur partie N-terminale et d'une ou de deux hélices \pm au niveau de leur partie C-terminale (Les bactériocines de cette sous classe possèdent toutes une activité anti-listeria (Fimland *et al.*, 2000, Richardet *et al.*, 2006).

La bactériocine représentative de cette sous classe est la pediocin PA-1 produite par *Pediococcus acidilactici*. Il y a aussi la divercin V41 produite par *Carnobacterium divergens* V41, la bavaricin A produite par *Lactobacillus sake* MI401 et la carnobacteriocin B2 produite par *Carnobacterium piscicola* LV17B (Fimland *et al.*, 2000 ; Rodriguez *et al.*, 2002).

Sous classe IIb

Les bactériocines de cette sous classe nécessitent la présence de deux ou de plusieurs peptides pour accomplir leur fonction. Deux types peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires (Eijsink *et al.*, 1998 ; Dridier *et al.*, 2006 ; Dortu et Thonart, 2009).

La lactococcine G produite par *Lactococcus lactis*, la thermophiline 13 produite *Streptococcus thermophilus*, l'enterocine L50 produite par *Enterococcus faecium* et la plantacine C11 produite par *Lactobacillus plantarum* font parties de cette sous classe (Nissen-Meyer *et al.*, 1992 ; Marciset *et al.*, 1997 ; Cintas *et al.*, 2000 ; Diep *et al.*, 2003).

Sous classe IIc

Dans cette classe on trouve les bactériocines qui ne sont classées ni dans la sous classe IIa ni dans la sous classe IIb. Ces dernières ont été initialement classées par Cotter *et al.* (2005) dans la sous classe IId (Heng *et al.*, 2007).

La sakacin Q produite par *Lactobacillus sake*, Mutacine IV et V produites par *Streptococcus mutans* ainsi que la sakacine T et X produite également par *Lactobacillus sake* sont classées dans cette sous classe (Qietal., 2001 ; Vaughan *et al.*, 2003 ; Mathiessen *et al.*, 2005 ; Hale *et al.*, 2005).

- **Classe III**

Les molécules de cette classe sont des protéines d'une masse moléculaire supérieure à 30 KDa, elles sont thermolabiles et ne possèdent pas d'acides aminés modifiés. Cette classe est divisée en deux sous classes.

Sous classe IIIa : bacteriolysines

La zoocine A produite par *Streptococcus equi ssp zooepidermicus*, la stellalysin produite par *Streptococcus constellatus sp contellatus*, la millericine B produite par *Streptococcus milleriet* l'enterolyne A produite par *Enterococcus faecalis* font partie de cette sous classe (Henget *al.*,2007).

Ces protéines à activité antimicrobienne sont des enzymes lytiques qui neutralisent la cellule cible par une lyse complète de la cellule bactérienne.

Sous classe IIIb : bactériocines non lytiques

Les bactériocines de cette sous classe agissent à l'opposé de la sous classe IIIa par dissipation de la force proton motrice et elles ne manifestent aucun pouvoir lytique vis-à-vis de la cellule cible. L'helveticine J produite par *Lactobacillus helveticus* et la *Streptococcine A-M57* produite par *Streptococcus pyogenes* font partie de cette sous classe (Henget *al.*,2007).

- **Classe IV**

Les bactériocines de cette classe sont caractérisées par une structure cyclique, elles sont synthétisées par voie ribosomale et subissent des modifications post-traductionnelles comme la création d'une liaison entre le premier et le dernier acide aminé. La bactériocine type de cette classe est l'enterocine AS-48 produite par *Enterococcus faecalis ssp liquefaciens* S 48. D'autres bactériocines à structure cyclique font également partie de cette classe comme la reuterine 6 produite par *Lactobacillus reuteri* (Galvez et *al.*,1985 ; Heng et *al.*, 2007).

1.8.7.4. Limites d'utilisation des bactériocines

L'application des bactériocines constitue certes une méthode « naturelle » de conservation des aliments, mais sa mise en œuvre n'est pas aisée. En effet, les nombreuses propriétés des bactériocines favorisant leur utilisation dans le domaine agroalimentaire et/ ou médical n'empêchent pas l'existence de contraintes relatives à leur utilisation. Le coût élevé de préparations de bactériocines pures prêtes à l'emploi entraîne de loin la limite la plus importante. D'où l'utilisation plus commune des souches productrices plutôt que des bactériocines isolées.

La composition de l'aliment représente le premier facteur pouvant réduire ou totalement dissiper l'activité inhibitrice de la bactériocine en raison de son adsorption sur des composants du produit, la limitation de sa solubilité et de sa diffusion, sa dégradation par des protéases,

l'interaction avec des additifs alimentaires ou des ingrédients et/ ou un pH inapproprié. Les traitements appliqués aux produits constituent un deuxième facteur pouvant limiter l'effet antimicrobien de la bactériocine dans un produit alimentaire. En effet, des traitements thermiques trop élevés peuvent dégrader les bactériocines bien que la majorité d'entre elles soient résistantes à la chaleur (Dortu et Thonart, 2009, Gálvez et *al.*, 2007). Le dernier facteur limitant l'activité des bactériocines est la présence de bactéries résistantes et de microorganismes qui dégradent les bactériocines par l'effet de protéases qu'elles produisent à l'état physiologique. De plus, dans les produits solides, les bactéries forment des biofilms dont la résistance aux bactériocines peut être plus élevée (Schöbitz *et al.*, 2003). D'autre part, il sera également important de considérer l'impact de la bactériocine sur la flore résidente. La sensibilité de la flore à la bactériocine entraîne un déséquilibre qui peut conduire à la croissance et la prolifération de microorganismes pathogènes résistants aux bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

1.8.7.5. Conditionnement des bactériocines

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous la forme purifiée. Les bactériocines semi-purifiées peuvent être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation (Parente et Riccardi, 1999). La nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif est commercialisée sous forme semi-purifiée (Dortu et Thonart, 2009).

1.8.7.6. Les applications des bactériocines

1.8.7.6.1. Les bactériocines en agroalimentaire

La bioconservation des aliments fait l'objet depuis 40 ans de nombreuses études. Elle consiste en une augmentation de la durée de vie et une amélioration de la sécurité sanitaire des produits alimentaires, en utilisant des microorganismes et/ ou leurs métabolites (Ross *et al.*, 2002, Stiles, 1996).

1.8.7.6.2. Les applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire :

1.8.7.6.2.1. Les propriétés des bactériocines pour une application alimentaire :

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (Wijaya et *al.*, 2006). Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou altérantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide. Les bactériocines doivent cependant être considérées comme un moyen de préservation complémentaire à ceux déjà existant (Deegan et *al.*, 2006).

1.8.7.6.2.2. Les applications des bactériocines dans le secteur alimentaire:

Les bactériocines sont employées dans plusieurs domaines. Leur utilisation dans le domaine alimentaire est devenue très intéressante grâce à leur potentiel d'assurer une sécurité microbienne et une bonne qualité du produit alimentaire (Delves-Broughton, 1990 ; Benech, et *al.*,2002).

L'utilisation des bactériocines comme additifs naturels dans les aliments a suscité l'intérêt du consommateur qui cherche à minimiser l'utilisation des additifs chimiques artificiels dans les produits alimentaires. Plusieurs études ont montré l'efficacité de la nisine en tant qu'agent de conservation dans les aliments comme la truite fumée (Nykanen et *al.*,1999), les produits à base d'oeufs liquides pasteurisés (Delves-Broughton et *al.*,1996), les fromages et d'autres produits laitiers (Delves-Broughton, 1990). En effet, la nisine est la plus étudiée des bactériocines et la seule utilisée commercialement dans les produits alimentaires.

Un autre mode d'application des bactériocines consiste en leur immobilisation sur les cellules productrices, dans des gels ou des films telle que la gélatine, la cellulose, les protéines de soja, des des films de polysaccharides, etc .La bactériocine sera alors libérée dans le produits au cours de la conservation (Luchansky et *al.*.,2004 ;Deegan et *al.*,2006 ;Ghalfi,2006 ;Galvez et *al.*,2007) .

1.8.7.6.3. Les applications médicales des bactériocines

L'émergence de la résistance aux antibiotiques conventionnels ces dernières années a orienté la recherche vers l'étude de nouveaux agents antimicrobiens. Le mode d'action des bactériocines qui diffèrent de ceux des antibiotiques conventionnels et l'innocuité des bactériocines permettraient leur utilisation comme alternative aux antibiotiques dans la prévention et/ ou le traitement des infections dues à des bactéries devenues résistantes aux traitements conventionnels (Dickset *al.*, 2011). Contrairement aux applications alimentaires des bactériocines, aucune de bactériocine n'est à ce jour commercialisée comme médicament. Cependant, quelques-unes d'entre elles sont en cours d'essais cliniques pour le traitement d'infections cutanées, respiratoires, systémiques et/ ou urogénitales ainsi qu'en tant qu'agents contraceptifs parmi elles la rBPI21 en phase clinique III pour le traitement de la méningite (Hancock, 2000).

Chapitre II

Les interactions

II : Les interactions :

1. Définition :

La fermentation est historiquement utilisée comme un mode de conservation des aliments.

Durant la fermentation du lait, différents agents antimicrobiens ayant la capacité d'inhiber le développement de bactéries pathogènes et/ou d'une flore de dégradation de l'aliment sont produits par les bactéries lactiques. Cependant, lorsqu'ils atteignent une certaine concentration, ces composés peuvent interrompre la croissance des souches productrices, il s'agit d'auto inhibition, et/ou des autres souches constituant le levain (Rodgers, 2004 ; Deegan *et al.*, 2006 ;Galvez *et al.*, 2007).

Les produits laitiers, en général, comme le lait fermenté ou les fromages sont le support d'écosystèmes dont la composition évolue avec le temps. Les facteurs de sélection qui gouvernent cette évolution sont générés par l'activité métabolique des micro -organismes eux-mêmes. Ceux à un instant donné, créent à la fois les conditions de leur déclin et celles favorisant l'installation d'autres groupes microbiens :

- Par la production de substances inhibitrices ou au contraire celles de facteurs de croissance
- Par la modification de facteurs physico-chimiques, dont le pH. (Leyre et vierling,2007)

Les interactions entre les micro-organismes associés peuvent être bénéfiques pour l'un des micro-organismes ou pour les deux, c'est le cas d'une symbiose ou de coopération entre les deux micro-organismes, si aucun effet n'apparaît, alors on considère que les deux micro-organismes se développent indépendamment l'un de l'autre .Si elles sont néfastes pour l'un des deux micro-organismes, on parle d'inhibition.

2. Interactions entre les souches de bactéries lactiques :

Lorsque les bactéries lactiques sont utilisées en cultures mixtes pour la fermentation du lait, des interactions entre les différentes souches se manifestent. Ces interactions sont généralement classées en deux groupes : l'antagonisme (Interactions négatives) et stimulation (Interactions positives)(Grattepanche, 2005).

3. Cultures mixtes des bactéries lactiques :

Dans la pratique industrielle, les bactéries lactiques sont très souvent associées, soit entre elles, soit avec d'autres microorganismes (bactéries non lactiques, levures ou moisissures) formant des cultures mixtes où différents types d'interactions peuvent se produire. L'ensemble de ces interactions gouverne la structure des communautés microbiennes et leurs activités. On les classe en deux catégories : les interactions positives qui se caractérisent par la stimulation

d'un ou de plusieurs micro-organismes et les interactions négatives qui correspondent à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique (Cholet, 2006 ; Monnet *et al.*, 2008).

4. Différents types d'interactions

4.1. Interactions positives

Quand on parle d'interactions positives, on différencie le commensalisme où l'un des partenaires est stimulé par la production d'une substance essentielle ou par la destruction d'un facteur inhibiteur, du mutualisme où, dans ce cas, l'interaction est bénéfique aux deux partenaires (Cholet, 2006).

4. 2. Interactions négatives

Il existe divers mécanismes d'inhibition des micro-organismes entre eux. Si l'inhibition intervient par la production de substances inhibitrices et si un seul des deux micro-organismes est inhibé par l'autre, il convient de parler d'amensalisme. En revanche, si les mécanismes d'inhibition sont réciproques, il s'agit alors d'un phénomène de compétition. Cette compétition peut s'exercer vis-à-vis de l'espace disponible (inhibition de contact) et/ou de la disponibilité en substrats.

L'antagonisme désigne une lutte réciproque des deux populations par la production de molécules inhibitrices, généralement spécifiques (Cholet, 2006 ; Monnet *et al.*, 2008).

5. Rôle des bactéries lactiques dans l'altération des aliments

Les bactéries lactiques sont fréquemment associées de manière positive à l'alimentation humaine, à travers la fermentation d'une grande variété de produits (Ross *et al.*, 2002). Elles sont présentes en temps que flore technologique dans les produits laitiers (yaourts, fromages), les produits carnés (charcuteries), les produits végétaux (choucroute, pickles, olives fermentées), les levains de panification et les boissons alcoolisées (vins, bières blanches, saké) (Leroy & De Vuyst, 2004). Cependant leur rôle en temps qu'agents altérants est aussi reconnu dans une vaste gamme de produits.

Sur les produits à base de viande, la croissance des bactéries lactiques entraîne l'apparition d'odeurs et de saveurs aigres ou rances (dus à la présence d'acide lactique ou d'acides gras volatils), de substance visqueuse (due à la production de polysaccharides) et de verdissement (dû à la présence de peroxyde d'hydrogène) (Labadie, 1999 ; Vermeiren *et al.*, 2005). Des bactéries lactiques des espèces *Lb. Divergens* et *Lb. Sakei* ont été retrouvées parmi la flore altérante de viande de boeuf réfrigérée (Ercolini *et al.*, 2006). De même il a été montré que *Lc. Mesenteroides* pouvait faire partie de la flore d'altération principale de produits de type jambon (Vermeiren *et al.*, 2005).

Chapitre III

Les bactéries pathogènes

III : Bactéries pathogènes :

1. Bactéries pathogènes alimentaires

Les aliments de consommation humaine sont rarement stériles. Ils contiennent des microorganismes bénéfiques appelés flore microbienne endogène. Cette dernière joue un rôle dans le développement de l'arôme, de la texture, ainsi que dans l'acidification et la conservation des aliments dans lesquels ils se développent (Zuliani & Garry, 2004). Cependant, l'existence d'autres microorganismes indésirables sur le plan hygiénique et organoleptique est possible. On distingue d'une part, les microorganismes d'altération, responsables des dégradations organoleptiques ou nutritionnelles et par conséquent de la diminution de la durée de vie des aliments. D'autre part, les microorganismes pathogènes, qui prolifèrent et libèrent des toxines, provoquent des toxi-infections alimentaires ou TIAC (Zuliani & Garry, 2004).

2. Présentation des souches pathogènes

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est l'espèce la plus répandue, la plus reconnue et la plus pathogène du genre *Pseudomonas*. C'est un fin bacille Gram négatif asporulé, acapsulé et extrêmement mobile. Cette bactérie vit à l'état saprophyte dans l'eau et les sols humides ou encore en commensale dans le tube digestif des Hommes et de divers animaux.

Le plus souvent, c'est une contamination progressive de l'environnement de traite (machine, lavette, eau) qui conduit à l'infection secondaire des vaches.

P. aeruginosa, reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique (Mavrodi et al., 2001).

2.1.1. Pouvoir pathogène :

P. aeruginosa est responsable d'infections graves communautaires et surtout nosocomiales. Cette espèce, se distingue par sa grande adaptation aux différentes conditions environnementales, par sa capacité à acquérir des résistances aux antibiotiques (ATB) et par la diversité de ces facteurs de virulence (Mérens et al., 2013).

P. aeruginosa est donc considéré comme l'exemple type des bactéries pathogènes opportunistes et pratiquement inoffensives chez l'individu sain (Figure 12) (Plesiat, 2008).

P. aeruginosa est capable de coloniser une grande diversité de tissus provoquant entre autres des bactériémies, ou des infections oculaires, intestinales, ou urinaires, des méningites et ostéomyélites en infectant le système nerveux central et les structures osseuses (Didier, 2005).

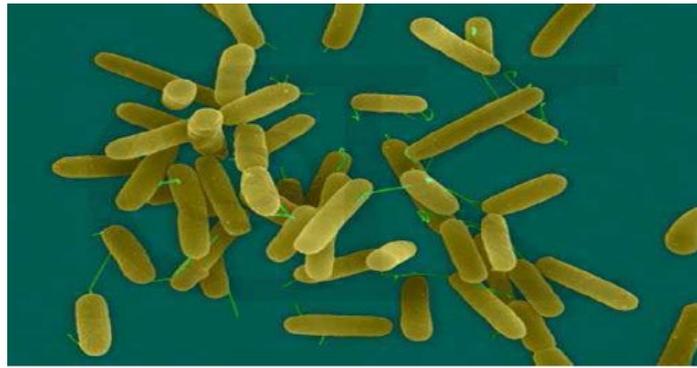


Figure 12. Morphologie cellulaire de *Pseudomonas aeruginosa* (Dubois, 2013).

2.2. *Staphylococcus aureus* :

Encore appelé staphylocoque coagulase+, c'est une bactérie Gram positif, immobile, non sporulée et dépourvue de capsule. Elle est présente presque partout à la surface de la peau, et en particulier jusqu'au bout du trayon. *Staphylococcus aureus* est résistante, transmissible et équipée d'un appareillage enzymatique complexe. Il est capable de produire des toxines diverses (hémolysines, leucocidines, entérotoxines) et des enzymes (coagulase, fibrinolysine, hyaluronidase, désoxyribonucléase, pénicillinase).

Au microscope optique, ce germe apparaît sous forme de cocci de 0.8 à 1 μm de diamètre en moyenne. Les colonies bactériennes se présentent isolées, en diplocoque (deux) ou le plus souvent en amas sous l'aspect d'une grappe de raisin.

2.2.1. Pouvoir pathogène : *Staphylococcus aureus* est à l'origine de toxi-infections alimentaires car c'est une bactérie toxigène, elle produit entre autres des toxines thermorésistantes dans les aliments comme le lait de chèvre



Figure 13 : Morphologie cellulaire de *Staphylococcus aureus* observée en microscopie électronique à balayage (Grosjean *et al.*, 2011).

2.3. *Bacillus cereus* :

le genre *Bacillus* renferme des germes telluriques, aérobies stricts ou aéro-anaérobies, sporogènes, se présentant sous forme de batonnets à Gram positif généralement mobiles.

Bacillus cereus est souvent considéré comme une bactérie pathogène pour les humains, étant donné que certaines souches sont responsables d'intoxications alimentaires. Cependant, toutes les souches de *Bacillus cereus* ne sont pas pathogènes. En effet, certaines d'entre elles ne possèdent pas les gènes permettant la synthèse d'entérotoxines et d'une toxine émétique¹, responsables de leur pathogénicité (Stenfors-Arnese et al. 2008; Kamar et al. 2013).

2.3.1. Pouvoir pathogène :

Les toxi-infections alimentaires à *Bacillus* sont presque exclusivement dues à *B. cereus*. Elle représente près de 5% de l'ensemble des toxi-infections alimentaires dans certaines statistiques anglo-saxonnes (Guillard, 1989).

2.4. *E. coli* :

Escherichia est un bacille à coloration Gram négative, aérobic-anaérobic facultatif (AAF), possédant une nitrate réductase et une catalase, dépourvue d'Oxydase et non halophile. *E. coli* est une bactérie immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche et non-sporulée. Sa température optimale de croissance est de 37°C. Bactérie non exigeante, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires.

E. coli constitue une espèce bactérienne sous-dominante du microbiote aérobic-anaérobic facultatif intestinale de l'Homme et des animaux. Cette bactérie représente 80 à 90 % des coliformes thermotolérants ou coliformes fécaux (capables de fermenter le lactose à 44,5°C) qui constituent un sous-groupe des coliformes totaux.

Enfin, l'espèce *E. coli* est une bactérie versatile qui comprend, à la fois, des bactéries commensales du tube digestif, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'environnement (Tenaillon et al., 2010).

2.4.1. Pouvoir pathogène :

E. coli est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires, elle peut provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales, initialement sensible à beaucoup d'antibiotiques, elle a acquis une résistance fréquente, surtout en milieu hospitalier (Nauciel et Vildé, 2005).

Les facteurs de virulence sont des flagelles et des pili, qui permettant l'adhésion à la muqueuse intestinale ainsi qu'une capsule qui prévient la phagocytose et les entérotoxines (Goubau et Pellegrini, 2000).

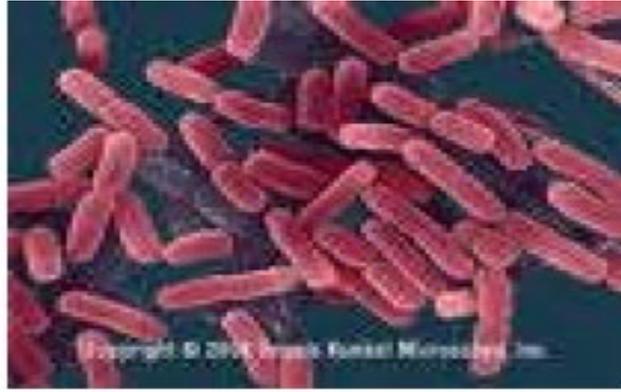


Figure 14: *Escherichia coli* observée au microscope électronique (G×10000) (Goubau et pellegrims, 2000)

Partie II

Etude expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthodes

1. Lieu d'étude :

Ce travail a été effectué au laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales (LSTPA), de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

2. Origine des souches:**2.1. Les isolats lactiques :**

Les bactéries lactiques étudiées ont été isolées à partir du blé fermenté de la région de Mazouna et font partie de la collection de l'enseignement chercheur de madame Tahlaiti.

2.2. Les souches pathogènes :

Nous avons travaillé sur quatre souches pathogènes à Gram positif et négatif, le tableau 2 indique le genre, le code, et l'origine de ces bactéries.

Tableau2: Les Souches pathogènes

genre	code	origine
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC33862	Institut Pasteur
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Institut Pasteur
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25921	Institut Pasteur
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	Institut Pasteur

3. Milieux de cultures :

Les milieux de culture utilisés dans cette étude pour la croissance des souches lactiques ou pathogènes sont sous forme liquide ou solide et semi solide. Les milieux sont les suivants :

- Le milieu MRS (De Man et *al.*, 1960)
- Le milieu tryptica –soja

Les milieux utilisés pour l'identification phénotypique des isolats lactiques comme le bouillon hypersalé, lait de Sherman à 0.1% et 0.3% de bleu de méthylène, milieu MRS BCP. La composition des milieux sont en annexes A.

4. Purification des souches lactiques :

Pour la purification de la souche *P.acidilactici* (M5) et des isolats lactiques, une succession d'ensemencements en stries sur gélose MRS a été effectuée, ce qui a permis d'obtenir des colonies uniformes, de même taille et de même forme.

5. Identification :

Les cultures bactériennes isolées ont été pré- identifiées par l'étude des caractères morphologiques, des tests physiologiques et biochimiques. Larpent et *al.*,(1997) .

6. Etude des caractères morphologiques :

➤ Observation macroscopique

Elle consiste à décrire les colonies obtenues après culture sur milieu MRS solide de l'aspect, la couleur et la forme.

➤ Observation microscopique

L'observation microscopique par coloration différentielle a permis de distinguer les isolats selon le type de Gram (positif ou négatif), leur morphologie (bacille ou coque) et leurs modes d'associations (isolés, en chaînettes ou en tétrades). Les bactéries lactiques sont Gram+(Annexe B).

➤ Recherche de la catalase :

La catalase est une enzyme qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$. Elle est mise en évidence en émulsionnant une colonie à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Une effervescence (dû à un dégagement de dioxygène) signe la présence d'une catalase (Larpent et *al.*, 1997).

Seules les bactéries Gram positives et catalase négatives sont retenues et conservées pour une identification phénotypique.

7. Conservations des bactéries lactiques :

Après purification, les isolats sont conservés selon deux méthodes :

a. Conservation de courte durée :

Les souches pures des bactéries lactiques sont ensemencées sur une gélose MRS inclinée et incubées à 37°C. Elles sont ensuite conservées à 4°. Le renouvellement des cultures se fait toutes les quatre semaines (Saidi et *al.*, 2002).

b. Conservation à longue durée :

Pour une conservation de longue durée, les souches pures sont conservées dans un bouillon MRS contenant 20% (v/v) de glycérol et maintenues à -20°C.

8. Purification et identification des souches pathogènes :

La purification des bactéries pathogènes a été effectuée par ensemencement en stries sur le milieu sélectif tryptica soja pour toutes les bactéries pathogènes. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h.

9. Caractérisation biochimique et physiologique des isolats lactiques :

L'identification biochimique des isolats lactiques a été réalisée selon des tests clés ayant été effectués et cités par Guiraud (1998).

9.1. Croissance sur lait bleu de Sherman :

Ce test permet de mettre en évidence le développement des bactéries lactiques en présence du bleu de méthylène et ainsi de différencier entre les genres *Streptococcus* et *Lactococcus*. Les espèces de lactocoques utilisent l'oxygène présent dans le bleu de méthylène donnant ainsi une couleur blanche au milieu (Devriese et Pot, 1995).

Les isolats purifiés sur MRS liquide ayant une forme cocci sont ensemencés dans deux séries de tubes contenant de 9ml de lait écrémé stérilisé additionné de 1ml de BM à 0.1% pour la première série et à 1ml de BM à 0.3% pour la deuxième série (Guiraud, 1998). Après une incubation à 37°C pendant 24h à 48h, on note les observations relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait.

9.2. Détermination du type fermentaire :

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires dont le produit final est essentiellement l'acide lactique des bactéries lactiques hétérofermentaires qui produisent en plus de l'acide lactique, de l'éthanol, de l'acétate et du CO₂ (De Roissart et Luquet, 1994).

L'ensemencement des colonies à tester s'effectue dans un milieu liquide MRS contenant des cloches de Durham et incubées à 37°C pendant 24h à 48h. La production de gaz (CO₂) se traduit par l'apparition de bulles dans la cloche.

9.3. Profil fermentaire des sucres :

L'identification des espèces de bactéries lactiques est basée essentiellement sur la fermentation des sucres. Dans ce cas, le milieu de base utilisé est le bouillon MRS (sans glucose et sans extrait de viande) additionné de 0,04g/l de pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH (MRS-BCP) (Mannu et al., 2000). La croissance des isolats et le virage de l'indicateur coloré traduit la fermentation du sucre. Un tube sans ajout de sucre ensemencé par l'isolat à tester a été utilisé comme témoin. Les sucres utilisés à une concentration de 1% sont les suivants : maltose, xylose, galactose, saccharose, tréhalose, cellobiose.

9.4. Recherche de l'Arginine dihydrolase (ADH).

Cette propriété est détectée en utilisant le bouillon de Möeller (Möeller, 1955), de base exempte d'arginine et un autre additionné d'arginine à 1%.

Cette enzyme ayant l'aptitude de libérer l'ammoniac et la citrulline à partir de l'arginine. Il s'applique de la façon suivante : Une colonie fraîche est ensemencée dans chacun des tubes. Après l'incubation à 37°C pendant 24 h. Les bactéries qui utilisent le lactose acidifient le milieu qui prend une coloration jaunâtre alors que celles qui utilisent l'arginine ré-alcalinisent le milieu en libérant l'ammoniac ce qui va permettre un retour à la coloration violette initiale. (Larpen, 1997).

9.5. Thermorésistante :

C'est un critère de classification qui permet d'étudier la résistance à un certain traitement thermique. Des cultures pures sont ensemencées dans du bouillon MRS et exposées à une température de 60°C pendant 30min puis incubées à 37°C pendant 24 à 48h. Les bactéries présentant une croissance sont considérées comme thermorésistantes (Stiles et Holzapfel, 1997).

9.6. Croissance à différentes températures :

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (Leveau et al., 1991). Les isolats purifiés sont ensemencés dans un milieu MRS liquide, puis les tubes incubés à différentes températures : de 25°C, 37°C, 45°C. Le développement des isolats est apprécié par trouble après 24 à 48 h par comparaison avec un tube témoin non ensemencé, incubé à la même température (appréciation visuelle de la turbidité) (Guiraud, 2003 ; Bjorkroth et al., 1998).

9.7. Croissance à pH 9,6 et pH 5:

Ce test permet de différencier entre les genres *Lactococcus* et *Enterococcus*.

A pH 9,6 : les lactocoques ne poussent pas à cette pH, ces tests sont réalisés sur les cultures bactériennes dans du bouillon MRS ajusté à pH 9.6 à l'aide d'une solution de NaOH (N/9) et incubés à 37°C pendant 48 h (Guiraud, 2003).

- **A pH 5 :** Ce test permet de distinguer les isolats qui se développent ou non en milieu acide. Le pH initial égal à 6.5 du milieu de culture est abaissé jusqu'à 5 avec une solution d'acide lactique (1N).

La croissance bactérienne est appréciée par un trouble dans les tubes et par comparaison avec une culture réalisée dans du MRS à pH 6.5 (Carr et al., 2002).

9.8. Croissance en présence de NaCl:

Ce test permet de savoir si les bactéries sont capables de croître dans un milieu hypersalé, ce qui permet de distinguer les entérocoques des lactocoques. En effet, les espèces d'entérocoques poussent dans ce milieu. Les cultures sont ensemencées dans un bouillon MRS à 6,5% de NaCl. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 72 h. La capacité à croître dans ce milieu hostile est appréciée par une croissance dans le milieu de culture et par comparaison avec un tube témoin réalisé avec une culture dans du MRS sans NaCl.

9.9. Croissance en présence d'azide de sodium :

Ce test permet de différencier entre les genres *Streptococcus* et *Enterococcus*. En effet, les espèces de *Streptococcus* ne croissent pas dans ce milieu. Le test consiste à réaliser

ensemencement des isolats purifiés dans des tubes de MRS additionné 0.015g d'azide de sodium .

Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 72 h .La présence du trouble indique la croissance des *Enterococcus* en comparaison avec un tube témoin non ensemencé.

10. Etude de l'activité antibactérienne des souches :

Dans cette partie, on a réalisé des interactions antagonistes entre les isolats isolées de blé fermenté comme inhibitrices (productrices de substances inhibitrices) et quatre bactéries pathogènes de références et une souche de l'espèce *Pediococcus acidilactici* comme indicatrice (sensible aux substances inhibitrice).

10.1. L'activité antibactérienne des souches lactiques contre une souche de l'espèce *Pediococcus acidilactici* :

10.1.1. Méthode de double couche (méthode de Fleming et al., 1975) :

Cette méthode permet de mettre en évidence les inhibitions par contact cellulaire, on procède comme suit :

- ✓ Des cultures jeunes de 18h d'isolats lactiques à tester en tant qu'inhibitrice sont ensemencées en touches sur milieu MRS solide, les boîtes sont séchées à la température ambiante, puis incubés à 37°C pendant 24 h.
- ✓ Après 24h, des tubes de 7ml de gélose molle de MRS en surfusion (45°C) ont été ensemencés avec 0,5 ml de la souche indicatrice(cultivée sur MRS liquide à 37°C pendant 18h) .Le mélange est ensuite versé à la surface des boîtes pré-incubées.
- ✓ Après solidification du milieu, une deuxième incubation a été effectuée à 30°C pendant 24h
- ✓ Après incubation, la lecture des résultats consiste à mesurer le diamètre des halos d'inhibitions apparus autour des isolats ensemencés en touche.

La souche *P.acidilactici* (M5) est utilisée comme inhibitrice et indicatrice.

- sur une boîte de milieu MRS gélosé, les isolats lactiques ont été ensemencés en touches, à partir d'une culture de 18h.
- après 24 h d'incubation des tubes de 7ml de gélose molle de MRS en surfusion ont été ensemencés avec 0,5 ml de la souche indicatrice **M5**, cultivée sur MRS liquide à 37°C pendant 18 h.
- Puis, le mélange est coulé sur la couche de gélose, en contact direct avec les spots. Une deuxième incubation a été effectuée à 37°C pendant 24 h.

Les isolats lactiques testées en tant qu'inhibitrices par cette méthode sont **BHC1, BHC2, BHC3 ,BHC4, BHC6,BHC8,BHC9,BHC13,BHC16,BHC18,BHC19, BHC23 ,BHC25 , BHC27,BHC28 ,BHL5,R27,BHC26.**

Le résultat se traduit par l'apparition des zones claires autour des spots.

10.2. L'activité antibactérienne des cultures lactiques contre des souches pathogènes

L'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolées contre quatre bactéries pathogènes, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25921, *Bacillus cereus* ATCC 10876. Cette activité a été évaluée par la méthode de Fleming et al. (1975). Nous avons procédé de la même façon que dans le paragraphe (10.1.1) sauf que les souches indicatrices sont des bactéries pathogènes.

11. Recherche des substances inhibitrices:

L'acide lactique est un facteur majeur dans les inhibitions. Ce test a pour but d'étudier l'effet de l'abaissement du pH sur le développement des souches indicatrices. Nous avons procédé selon la méthode de Fleming et al.,(1975) sauf que nous avons utilisé le milieu MRS tamponnée (tampon phosphate 0.2M à pH 7).

La lecture des boîtes s'effectue après 24h d'incubation à 37°C ; la lecture des résultats se fait par comparaison du milieu témoin non tamponné .le diamètre des zones d'inhibition produites a été mesuré en mm.

Chapitre II

Résultats et discussion

2.1. Examen macroscopique et microscopique

➤ Observation macroscopique

Un total de dix neuf isolats a été purifié. L'observation macroscopique, permet de décrire l'aspect, la taille, la couleur des colonies obtenues. L'aspect des colonies est représenté dans la (Figure15).



Figure15 : Aspect macroscopique de souche M5

➤ Observation microscopique

L'observation microscopique montre 2 formes des cellules bactériennes :

- En bâtonnets courts et isolés.
- En coques disposés en tétrade, en paire et en amas.

La figure16 montre les aspects des cellules bactériennes.

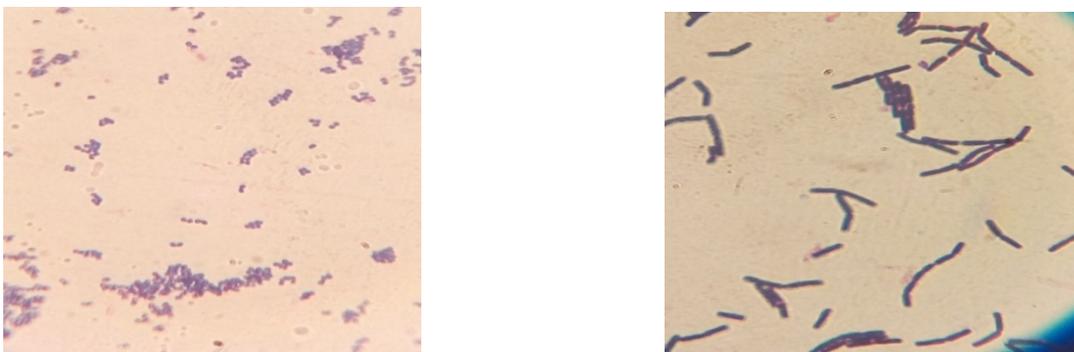


Figure16 : Aspect microscopique des cellules après coloration de Gram ($\times 100$), (A: coque B : bacille)

Les isolats bactériens sont désignés par la lettre **H** en référence au substrat « Hamoum » et codés selon la forme des bactéries :

BHL : en référence à la forme bacille ; **BHC** : en référence à la forme coque.

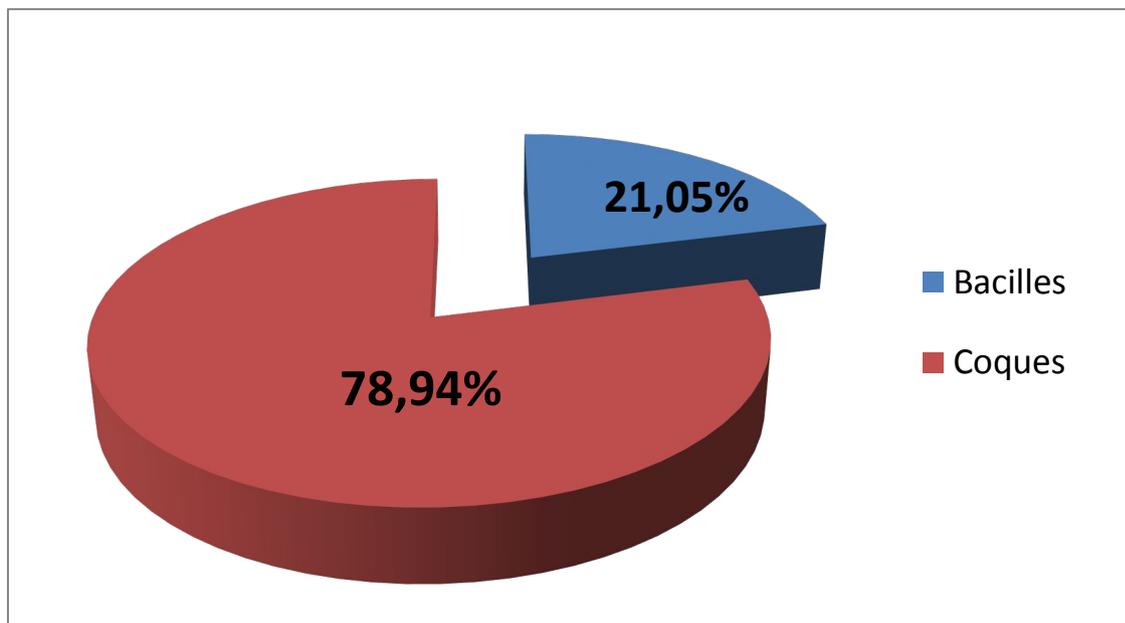
Les deux souches *Lb.plantarum* et *P.acidilactici* sont codées : **R27**, **M5**

Tableau3: Aspect macroscopique et microscopique et de la catalase des bactéries lactiques

isolats	Aspect de la colonie	forme	regroupement	Gram	catalase
BHL5.BHL25.R27 .BHL27	ronde Circulaire blanchâtre	Bacille	Bacille en petites chainettes	+	-
BHC2.BHC4.BHC26.M5	ronde Circulaire blanchâtre	coque	diplocoque /en tétrade	+	-
BHC1.BHC3.BHC6.BHC8.	ronde Circulaire blanchâtre	coque	En paire/en courtes chaines	+	-
BHC9.BHC13.BHC16.BHC18.	ronde Circulaire blanchâtre	coque	En paire/en courtes chaines	+	-
BHC19.BHC23.BHC28	ronde Circulaire blanchâtre	coque	En paire/en courtes chaines	+	-

- : résultat négatif

+ : résultat positif

**Figure17 :** Proportion des bactéries lactiques

Ce premier screening nous a permis de mettre en évidence la présence de lactobacilles et de coques à des proportions différentes (figure17).

2.2. Revivification de la pureté des bactéries pathogènes:

L'observation microscopique des souches pathogènes :

- *P.aeruginosa* : Fin bacille et isolé.
- *Staphylococcus aureus* : Coques en amas sous l'aspect d'une grappe.

- *E. coli* : Fin bacille et en amas.
- *B.cereus* : Bacille long et isolé.

Ces observations sont représentées dans les figure18.

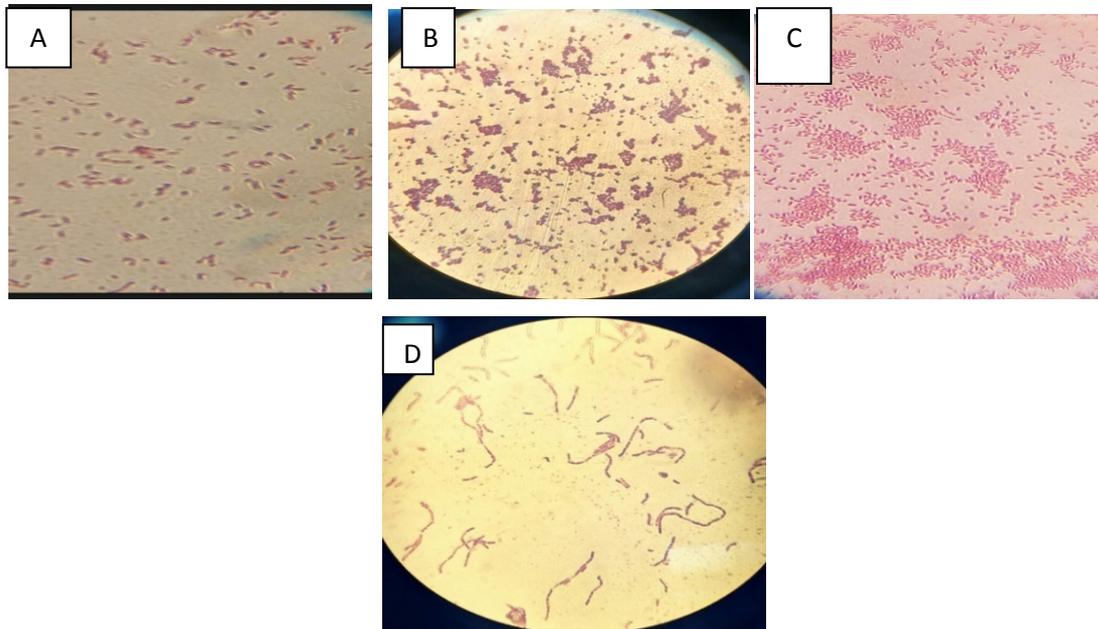


Figure18 : Aspect microscopique des bactéries pathogènes après la coloration de Gram (**A** : *Pseudomonas aeruginosa*, **B** : *Staphylococcus aureus* **C**:*Escherichia coli* **D**:*Bacillus cereus*)

Tableau4 : Aspect macroscopique et microscopique des bactéries pathogènes

souches	morphologie	Gram
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	bacilles	-
<i>Escherichia coli</i>	bacilles	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coques en amas	+
<i>Bacillus cereus</i>	bacilles	+

3. Caractérisations physiologiques et biochimiques :

3.1. Caractérisations biochimiques :

- **Lait bleu de Sherman :**

Les résultats obtenus, dans un lait écrémé stérilisé contenant le bleu de méthylène, ont montré que les isolats **BHC6,BHC13,BHC18,BHC2,BHC4** sont capables de croître en présence du bleu de méthylène à 0.1% à l'exception de **BHC1,BHC3,BHC8,BHC9,BHC16,BHC19, BHC23,BHC28,BHC26.**

Le résultat du test au lait de Sherman à 0. 3% montre que les isolats **BHC2, BHC4** sont capables de pousser, alors que les **BHC1, BHC3, BHC6, BHC8, BHC9, BHC13, BHC16,**

BHC18, BHC19, BHC23, BHC28, BHC26 sont incapables de croître à ce pourcentage.

➤ **Les résultats du type fermentaire :**

Ce permet d'apprécier le type du métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé pour différencier entre les souches homofermentaires et hétérofermentaires.

Les résultats montrent que tous les isolats ensemencés ne produisent pas de gaz (CO₂) à partir du glucose et donc sont considérés comme homofermentaires.

➤ **Profil fermentaire**

La détermination des genres et des espèces bactériennes, réside essentiellement dans leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique et autres acides organiques. En effet, la fermentation des carbohydrates entraîne une acidification qui se traduit par un virage de l'indicateur coloré du rouge pourpre au jaune attestant un résultat positif. Les résultats des profils fermentaires sont représentés dans le tableau 5.

➤ **Test de l'ADH :**

Tous nos isolats n'ont pas la capacité d'hydrolyser l'arginine. En effet, le catabolisme de l'arginine se manifeste par une coloration violette (ADH+).

3.2. Caractérisations physiologiques :

➤ **Thermorésistante :**

Tous les isolats ont résisté à un traitement thermique au bain marie à 60°C pendant 30 minutes à l'exception de **BHC19** et **BHC28**.

➤ **Croissance à différentes températures :**

L'emploi de ce test permet de diviser les bactéries lactiques en deux groupes : groupe de bactérie mésophile et le groupe de bactérie thermophile.

A 25°C : toutes les bactéries testées sont capables de pousser à cette température, à l'exception des isolats **BHC19** et **BHC23**.

A 37°C : toutes les bactéries testées sont capables de pousser à cette température.

A 45°C : la majorité des isolats testés sont thermophiles, elles croissent bien à cette température. Sauf les isolats **BHC19, BHC28** qui sont incapables de se développer à 45°C (type mésophile).

➤ **Croissance à pH 9,6 et pH 5 :**

❖ **À pH 9,6** : toutes les bactéries testées sont capables de croître à ce pH.

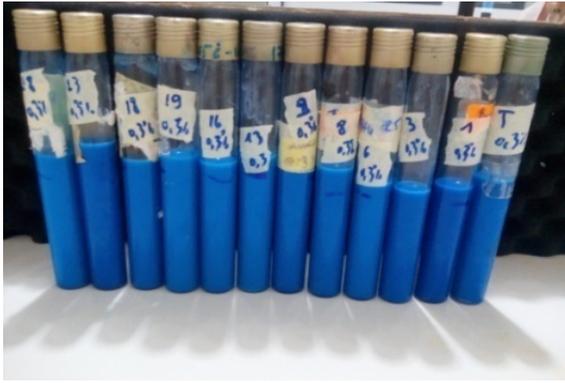
❖ À l'exception de **BHC2, BHC4, BHC26** qui poussent à pH 5.

➤ **Croissance en présence de NaCl 6,5% :**

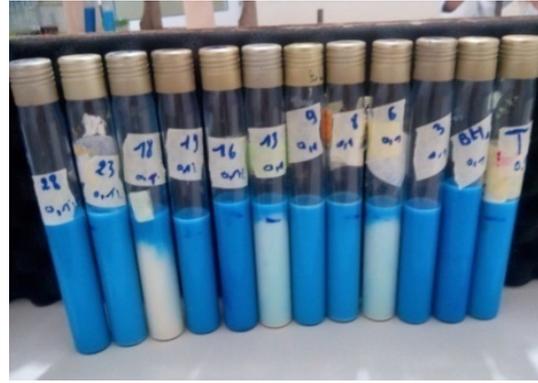
Toutes les bactéries testées sont capable de croitre à cette concentration de NaCl à l'exception des isolats **BHC2, BHC4**.

➤ **Croissance en présence d'azide de sodium :**

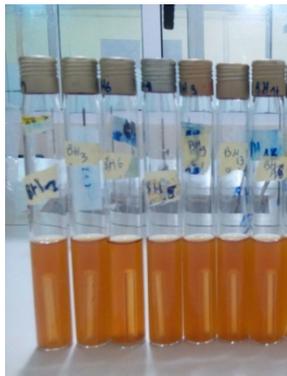
Ce test a permis de différencier entre les Entérocoques et Streptocoques, les Streptocoques ne croissent pas sur ce milieu. Toutes les cultures testées sont capable de pousser dans ce milieu, à l'exception des isolats **BHC18** et **BHC13**.



Réduction de BM 0,3%



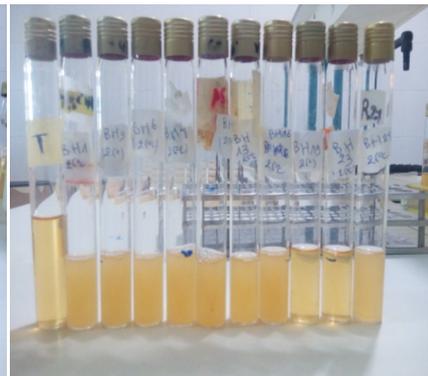
Réduction de BM 0,1%



Type fermentaire



Thermorésistance



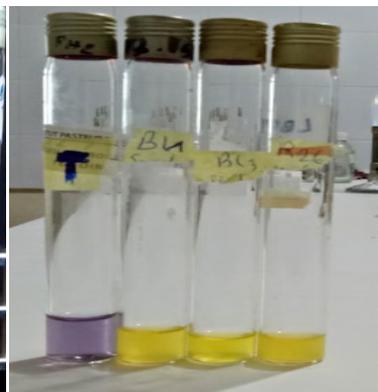
T° :25°C



T° :37°C

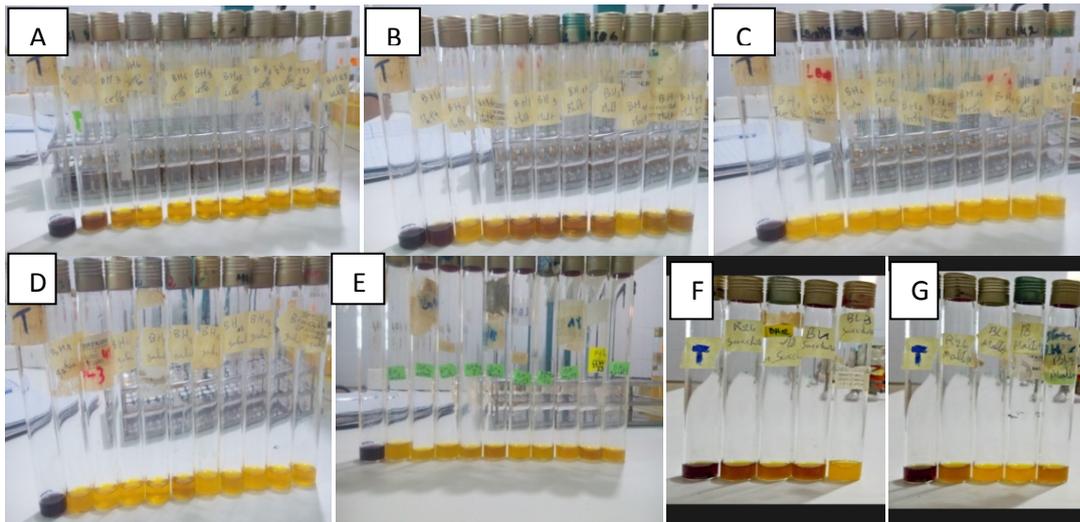


T° : 45°C



ADH

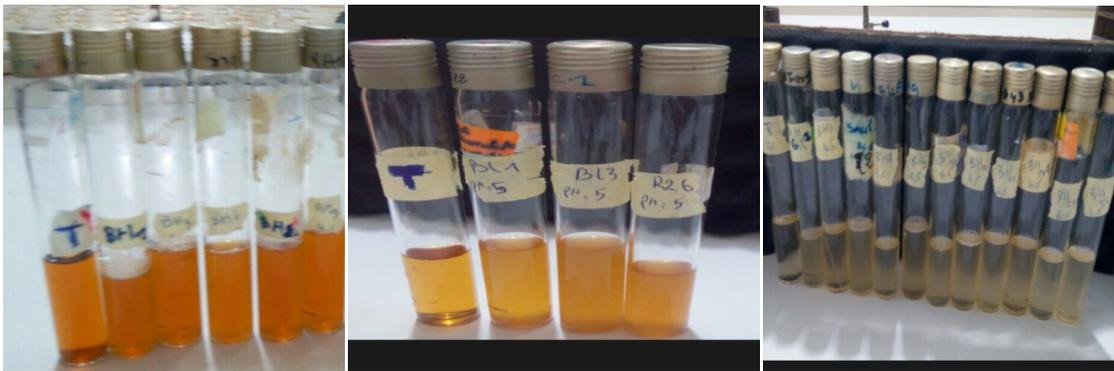
Figure19 : Tests physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques



Profil fermentaire

A.Cellobiose, B.Maltose, C.Trehalose, D.Galactose, E.Xylose

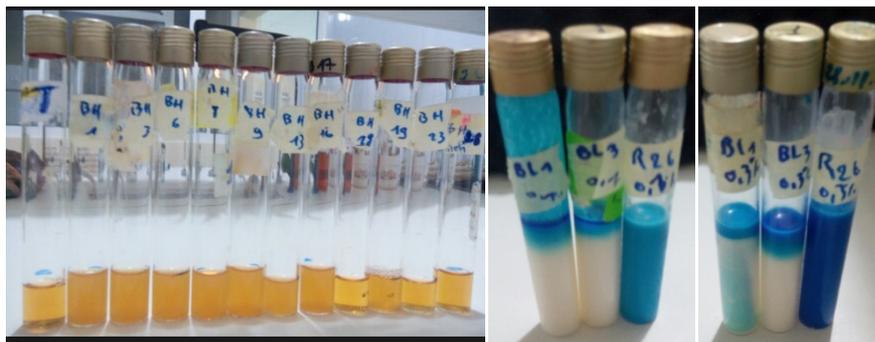
F .Saccharose,G.Maltose



pH 9,6

pH 5

croissance à 6,5% de NaCl



azide de sodium

Réduction de BM 0,1% et 0,3%

Figure19 : Tests physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques
(Suite).

Tableau 5: Caractéristiques physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques

isolats	BHC1	BHC2	BHC3	BHC4	BHC6	BHC8	BHC9	BHC13	BHC16	BHC18	BHC19	BHC23	BHC28	BHC26
Croissance sur lait « bleu de Sherman »	0.1%	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
	0.3%	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Résistance 30 min 60 °C	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Croissance à 25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Croissance à 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 45°C	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Croissance à pH 9,6	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Croissance à 6,5 % NaCl	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Azide de sodium	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellubiose	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+		+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+
sacchrose	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-

+ : réaction positive ; - : réaction négative ; Gaz : pas de production de gaz à partir du glucose ; +/- : variable

ADH- : pas de production de l'arginine dihydrolase .

D'après notre étude de pré-identification (cultureaux, physiologiques et biochimiques), nous pouvons rattacher nos dix neuf isolats à 5 genres par ordre croissant *Enterococcus* (52,63%), *Lacobacillus* (21,05%), *Streptococcus* (10,52%), *Lactococcus* (10,52%), *Pediococcus*(5,26%)
 Les résultats sont représentés dans la figure 20.

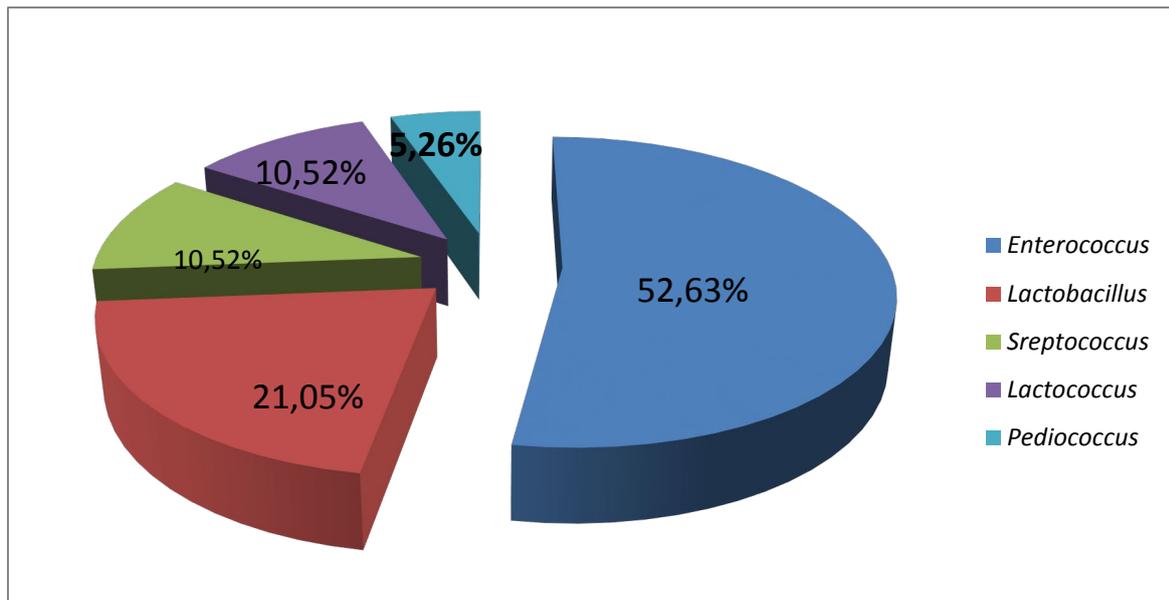


Figure 20: Répartition des genres à partir des différents isolats de blé fermenté.

Lb : *Lactobacillus* ; En : *Enterococcus* ; L : *Lactococcus* ; P : *Pediococcus* ; Str : *Streptococcus*

Les deux isolats codées **BHC2** et **BHC4** ont montré une capacité à croître à 25°C et 37°C mais pas à 45°C, pourvu d'un caractère homofermentaire et incapables de se développer à 6,5% NaCl et à pH 9,6, réduisent le bleu de méthylène à 0,1% et à 0,3%, ces isolats appartiennent au genre *Lactococcus* (figure 20).

Les douze isolats codées (**BH1 ,BHC3,BHC6,BHC8,BHC9 ,BHC13,BHC16 ,BHC18, BHC19 , BHC23, BHC28,BHC26**) ont une forme cocci homofermentaires , capables de se développer à 25°C, à 45°C et à pH 9,6 et en présence de 6.5% de NaCl , ne réduisant pas le BM à 0.1% et 0.3% à l'exception de BH6, BH13et BH18 sont classés par le genre *Enterococcus*.

Les isolats n'ayant pas poussés à 0.3% de BM sont mis en présence d'azide de sodium croissent dans ce milieu à l'exception de **BHC13** et **BHC18**. Ces deux isolats sont classés le genre *Streptococcus*.

Les quatre isolats **BHL5, BHC27, BHC25, R27** homofermentaires sont classés par le genre *Lactobacillus*.

Tableau6 : Tableau récapitulatif des résultats des tests de pré-identification des bactéries lactiques.

Genres	codes
<i>Enterococcus sp</i>	BH1, BHC3, BHC6, BHC8, BHC9, BHC16, BHC19, BHC23, BHC28, BHC26
<i>Streptococcus sp</i>	BHC13, BHC18
<i>Lactococcus sp</i>	BHC2 et BHC4
<i>Lactobacillus sp</i>	R27, BHL5, BHL25, BHL27
<i>Pediococcus acidilactici</i>	M5

4. L'activité antibactérienne des souches :

Afin de déterminer le spectre de l'activité antimicrobienne entre les bactéries lactiques, nous avons réalisé une mise en évidence des inhibitions entre bactérie par contact direct par la méthode de Fleming et *al.*, (1975). Cette méthode permet de mettre en évidence tous types d'inhibition, par production d'agents inhibiteurs et aussi celles qui sont dues à un contact cellulaire ou compétition vis-à-vis à des nutriments.

L'activité antagoniste des dix neuf bactéries lactiques isolées du blé fermenté a été évaluée vis-à-vis de 5 bactéries indicatrices, *Pediococcus acidilactici*, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25122, *Bacillus cereus* ATCC 10876.

L'activité inhibitrice des bactéries se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition autour des touches.

4.1. Pouvoir antibactérien de quelques cultures lactiques contre une souche de l'espèce *Pediococcus acidilactici* :

La mise en évidence des inhibitions vis-à-vis de la *Pediococcus acidilactici* a été réalisée selon la méthode de Fleming et *al.*, (1975). Cette méthode permet de détecter tous les types d'interactions, et qui a permis d'observer les taux d'inhibition.

Les isolats lactiques testés en tant qu'inhibitrices par cette méthode sont **BHC1, BHC3, BHC6, BHC8, BHC9, BHC13, BHC16, BHC18, BHC19, BHC23, BHC25, BHC27, BHC28, BH2, BHC4, BHL5, R27, BHC26.**

La souche *P. acidilactici* (**M5**) est utilisée comme inhibitrice et indicatrice.

Les résultats obtenus, révèlent la présence de zone claire autour des colonies **M5** après 24h d'incubation. Les inhibitions entre les isolats lactiques et la souche **M5** sont représentés par la figure 21.

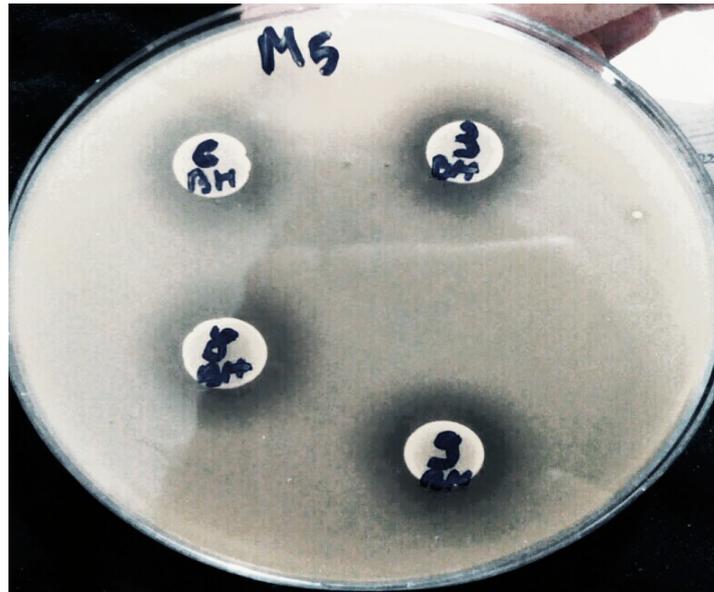


Figure 21 : Effet inhibiteur des isolats vis-à-vis de la souche de M5

Les diamètres des halos des bactéries cibles inhibées par les isolats de blé fermenté sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Effet antibactérien de dix neuf bactéries lactiques vis-à-vis de M5

M5 inhibitrices \ M5 indicatrice	M5 (zones d'inhibition en mm)
BHC1	5
BHC3	4
BHC6	3
BHC8	4
BHC9	3
BHC13	3
BHC16	6
BHC18	3
BHC19	3
BHC23	4
BHL25	3
BHL27	2
BHC28	3
BHC2	5
BHC4	5
BHL5	3
BHC26	7
R27	3
M5	2

Par la méthode de Fleming et *al.*, 1975, on observe que toutes les bactéries lactiques testées ont une activité inhibitrice contre la bactérie M5.

A partir de ces résultats obtenus et la figure22, on peut noter les points suivants :

- 94,73% de cas d'inter- inhibition et 5,26% d'auto-inhibition.

Les isolats **BHC1**, **BHC2**, **BHC4** **BHC16**, **BHC26**, ont montré un effet inhibiteur avec un diamètre qui varie entre 5 et 7mm. Quant à l'effet inhibiteur des isolats **BHC6**, **BHC9**, **BHC13**, **BHC18**, **BHC19**, **BHL25**, **BHL27**, **BHC28**, **BHL5 R27**, **BHC8**, **BHC23**, **BHC3**, le diamètre est compris entre 3 et 4mm.

La souche *P.acidilactici* (**M5**) s'est révélée auto-inhibitrice en produisant un halo de 2mm diamètre.

L'auto-inhibition de la souche indicatrice **M5** est due très probablement soit sélections de production d'agents d'inhibitions soit à une compétition vis-à-vis des nutriments soit au contact cellulaire.

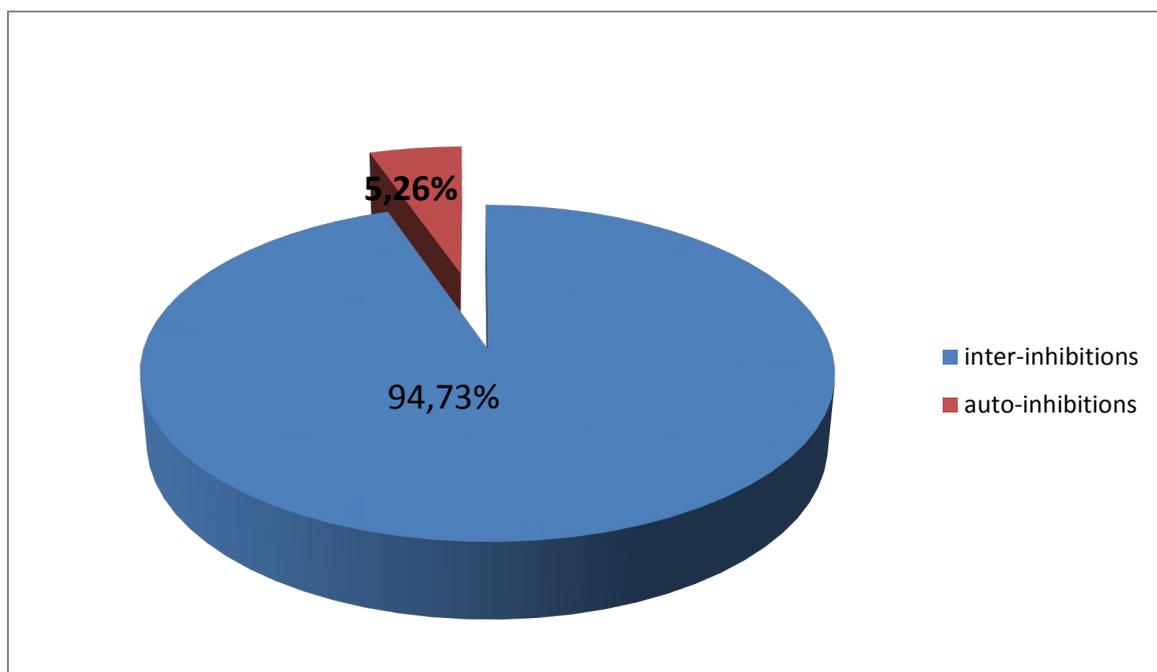


Figure22 : inter-inhibition et auto-inhibition des bactéries lactiques

4.2. Pouvoir antibactérien des isolats lactiques contre des souches pathogènes :

L'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolées du blé fermenté a été étudiée par l'effet antagoniste de nos isolats lactiques contre quatre souches pathogènes et/ou d'altérations.

Les résultats obtenus, ont montré que tous les isolats ont été inhibés contre les bactéries pathogènes Gram-positives, Les diamètres des zones d'inhibition varient entre (3 et 14mm), et Gram-négatives, Les diamètres des zones d'inhibition varient entre (2 et 12 mm).

4.2.1. Résultats de l'interaction entre les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes à Gram négatif :

Les résultats de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* ATCC 25122 sont montrés dans les figures 24, 25,26 et récapitulés dans le tableau 8.



Figure23. Activité antibactérienne des bactéries lactiques contre *Pseudomonas aeruginosa*



Figure24 : Activité antibactérienne des bactéries lactiques contre *E. coli*

Tableau 8: Activité antibactérienne des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes à Gram négatif

indicatrice inhibitrice	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
BH1	5	9
BH3	8	7
BH6	9	10
BH8	5	8
BH9	6	5
BH13	8	7
BH16	6	10
BH18	6	10
BH19	6	10
BH23	7	9
BH25	5	9
BH27	5	11
BH28	5	6
BL1	6	10
BL3	5	12
BL5	2	10
R26	5	10
R27	5	8
M5	0	8

N.P : Les diamètres des halos d'inhibitions sont mesurés en mm

Les bactéries à Gram négatif ont été inhibées par toutes les bactéries lactiques testées.

- 94,73% des isolats inhibent *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, avec une zone d'inhibition qui varie entre 2 et 9 mm.
- Absence d'inhibition avec un taux 5,26%.
- *E. coli* ATCC 25122 est inhibé par 100% des isolats, avec un zone d'inhibition qui varie entre 5 et 10 mm.

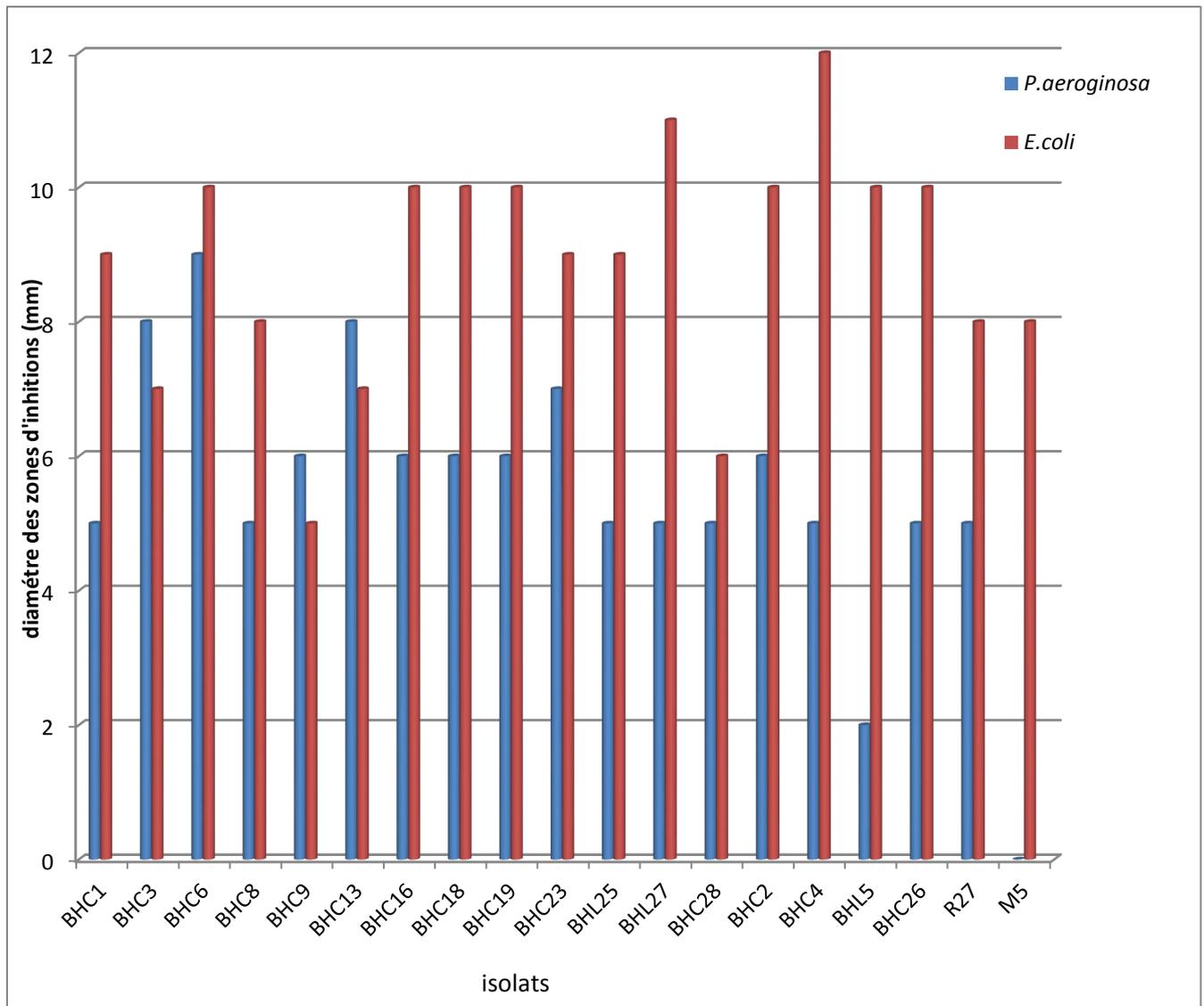


Figure25: Estimation de l'inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et d'*E.coli* ATCC 25122 par des bactéries lactiques

4.2.2. Les résultats de l'interaction entre les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes à Gram positif:

Les résultats de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques vis-à-vis, de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 et *Bacillus cereus* ATCC 10876 sont montrés dans les figures 27, 28, 29 et récapitulés dans le tableau 9.



Figure26: Activité antibactérienne des bactéries lactiques contre *Staphylococcus aureus*



Figure27: Activité antibactérienne des bactéries lactiques contre *Bacillus cereus*

Tableau9 : Activité antibactérienne des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes à Gram positif.

indicatrice inhibitrice	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BH1	13	9
BH3	6	7
BH6	5	8
BH8	6	6
BH9	6	6
BH13	7	7
BH16	14	7
BH18	6	7
BH19	6	5
BH23	5	6
BH25	6	7
BH27	6	7
BH28	5	6
BL1	3	5
BL3	5	6
BL5	10	3
R26	8	6
R27	6	8
M5	10	0

Les bactéries à Gram positif ont été inhibées par toutes les bactéries lactiques testées.

- 94,73% des isolats inhibent *Bacillus cereus* ATCC 10876, dont les diamètres d'inhibition varient entre 3 et 9mm.
- Les isolats lactiques sans effet inhibiteur sont de l'ordre de 5,26%.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 est inhibés par 100% des isolats avec des diamètres représentatifs entre 3 et 14 mm.

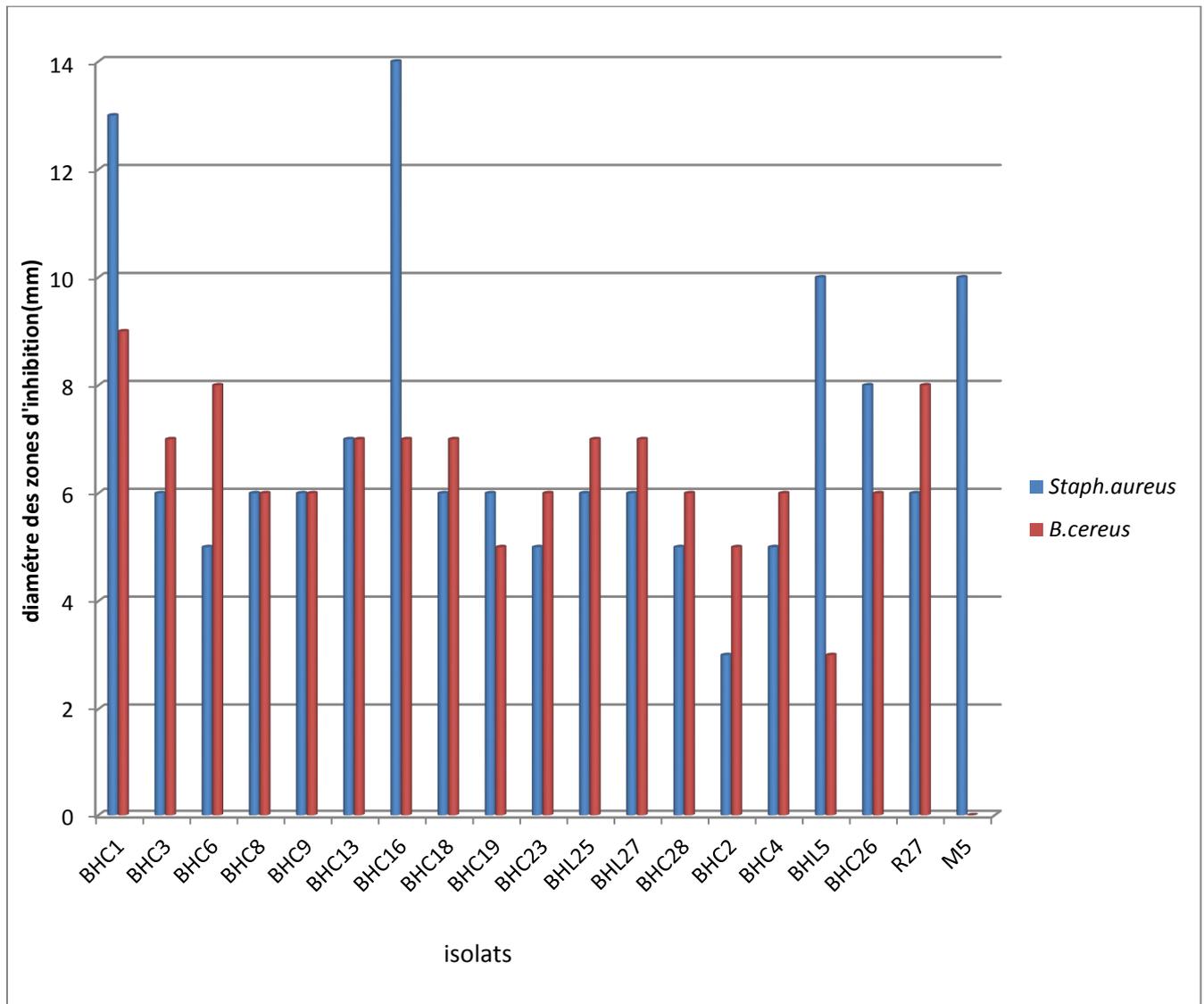


Figure 28: inhibitions *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 et *Bacillus cereus* ATCC par des bactéries lactiques

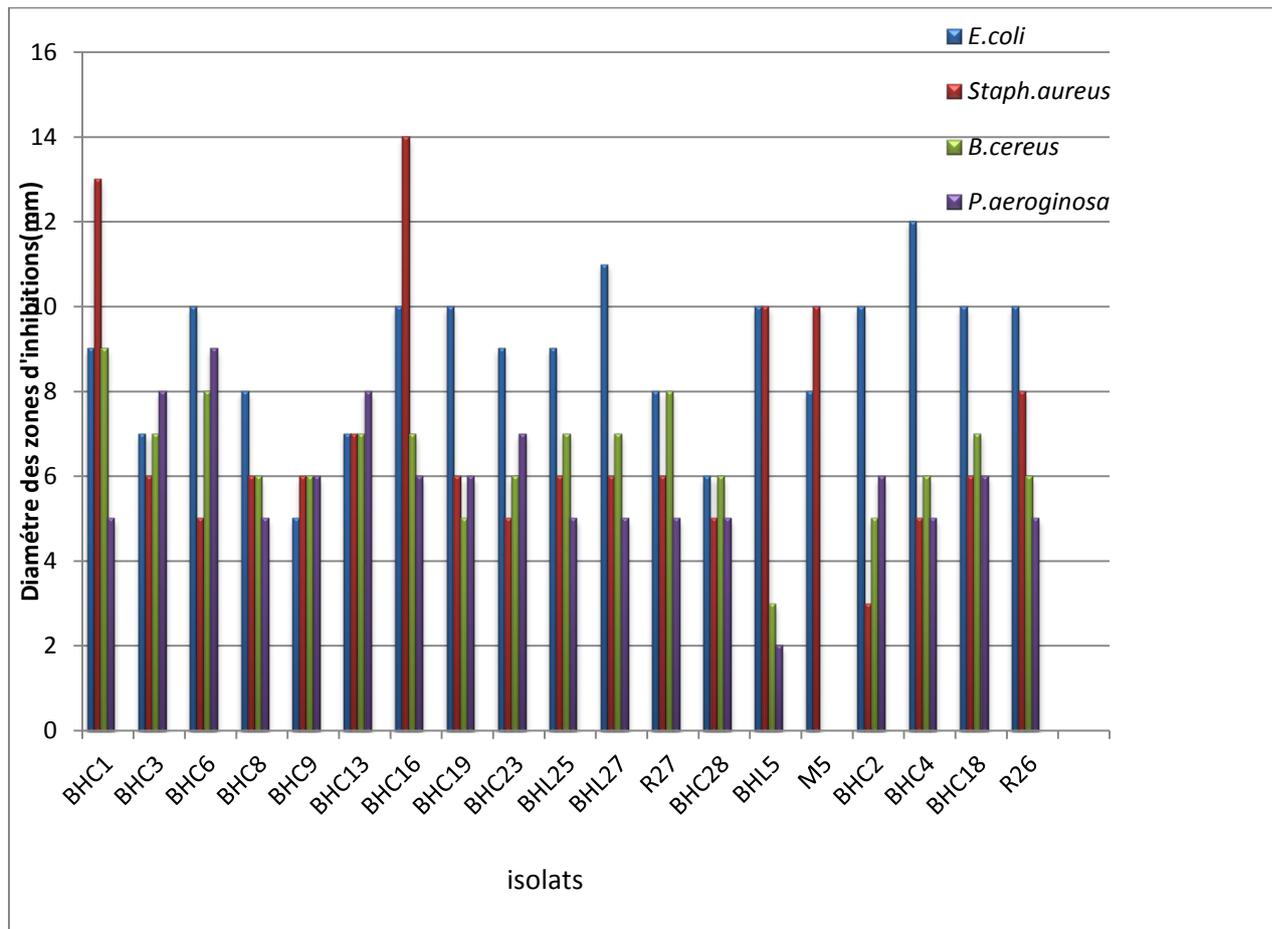


Figure29 : Inhibition des bactéries pathogènes par des bactéries lactiques

D'après les résultats des interactions obtenus, on observe que :

- 97,36% des isolats présentent une activité inhibitrice.
- 2.63% des isolats montrent une absence d'inhibition.

Les diamètres d'inhibitions maximales varient entre 13 et 14 mm pour les isolats (**BHC1** et **BHC16**) vis-à-vis de l'espèce *Staphylococcus aureus*. Les isolats **BHL5** et **BHC2** ont un diamètre qui varie entre 2 et 3 mm vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, d'*E. coli* et de *S. aureus*. On remarque néanmoins une absence d'inhibition par la souche **M5** vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Bacillus cereus*.

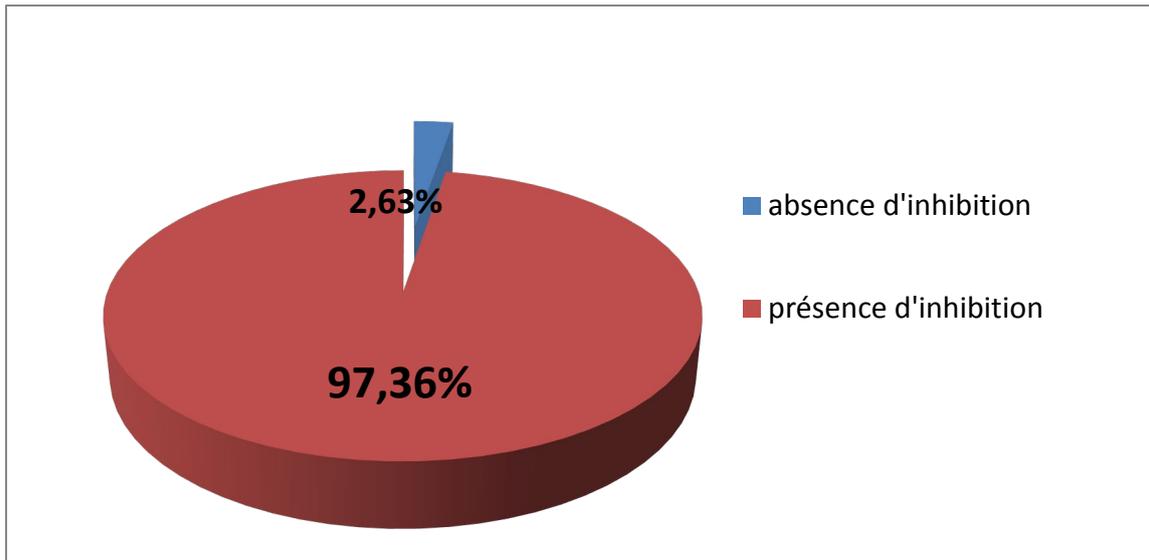


Figure30 : Taux d'inhibition des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques.

5. Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur

Les inhibitions peuvent avoir plusieurs origines parmi lesquelles : la production d'acide organiques, de peroxyde d'hydrogène, de phages et ou de bactériocines (Moreno et *al.*, 1999 ; Navarro et *al.*, 2000 . , Rodriguez et *al.*, 2002., Maldonado et *al.* , 2003., Todorov et Dicks., 2005 et Boumhira et *al.* ,2011).

5.1. Les inhibitions dues à la production d'acides organiques:

Les acides organiques ont une grande aptitude à inhiber les microorganismes surtout ceux qui sont sensibles aux pH bas.

Pour la mise en évidence des inhibitions par production d'acides organiques, l'emploi d'un milieu tamponnée a été utilisé et testés selon le méthode de Fleming et *al.*, 1975.

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 32, 33, 34, 42 et récapitulés dans le tableau 10.



Figure31 : Test d'inhibition de M5 par les bactéries lactiques sur milieu tamponné (T)

Tableau 10: Les inhibitions dues à la production d'acides organiques

M5 Inhibitrice \ M5 indicatrice	M5	
	Milieu non tamponné(NT)	Milieu tamponné(T)
BHC1	5	1
BHC3	4	0
BHC6	3	1
BHC8	4	1
BHC9	3	1
BHC13	3	1
BHC16	6	2
BHC19	3	1
BHC23	3	1
BHL25	4	1
BHL27	3	1
R27	2	0
BHC28	3	1
BHL5	5	1
M5	5	1
BHC2	3	3
BHC4	7	2
BHC18	3	2
BHC26	2	2

Pour les interactions qui ont gardé le même effet inhibiteur en conditions tamponnées et non tamponnées. On peut dire qu'il ne s'agit pas d'inhibitions dues aux acides organiques, mais fort probablement dues au peroxyde d'hydrogène ou à des bactériocines.

L'évaluation des résultats obtenus en milieu tamponné et non tamponné nous a permis de faire les observations suivantes :

- L'inhibition des bactéries lactiques a été levée dans 10, 52% (**BHC3, R27**). L'agent inhibiteur dans ce cas est très certainement un acide organique.

Les isolats lactiques qui ont gardé le même effet inhibiteur en conditions tamponnées représentent 10, 52% (**BHC26, BHC2**).

Ces inhibitions peuvent être dues à des facteurs d'inhibitions dont :

- soit au H_2O_2
 - Soit au bactériocine
 - soit au diacétyle
 - Les isolats lactiques dont les diamètres des zones d'inhibition ont diminués dans le milieu tamponné représentent 78,94% (**BHC1, BHC6, BHC8, BHC9, BHC13, BHC16, BHC19, BHC23, BHL25, BHL27, BHC28, BHL5, M5, BHC4, BHC18**).
- Dans ce cas, nous pouvons dire que les inhibitions sont partiellement dues à la production d'acides organiques et/ou à d'autres facteurs (H_2O_2 , bactériocine, diacétyle) ou à la faible concentration de l'agent inhibiteur.

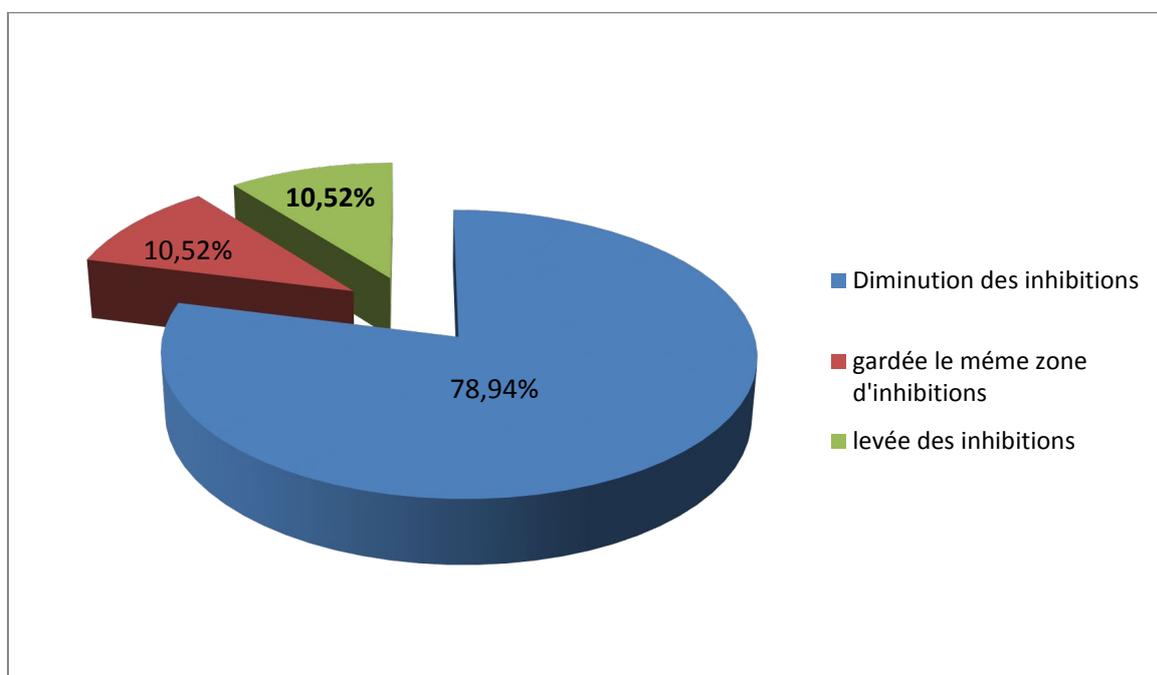


Figure32 : Taux des inhibitions de souche M5 par les bactéries lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné(NT).

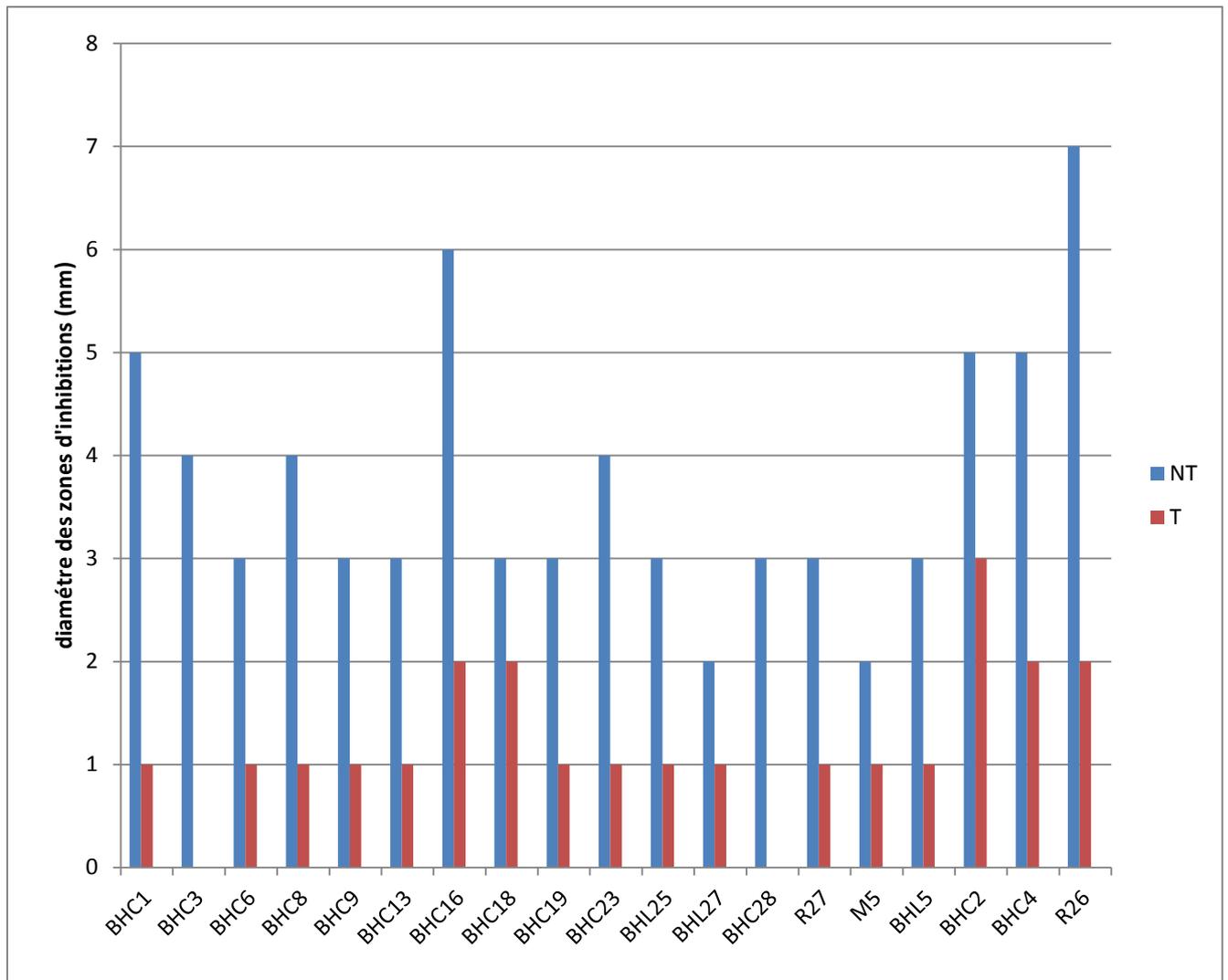


Figure33 : Estimation de taux d’inhibition de M5 par les isolats lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

Les figures 35, 36, 37 montrent les résultats des inhibitions des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques.



Figure34: Test d’inhibition de *P.aeruginosa* par les bactéries lactiques sur milieu tamponné (T)

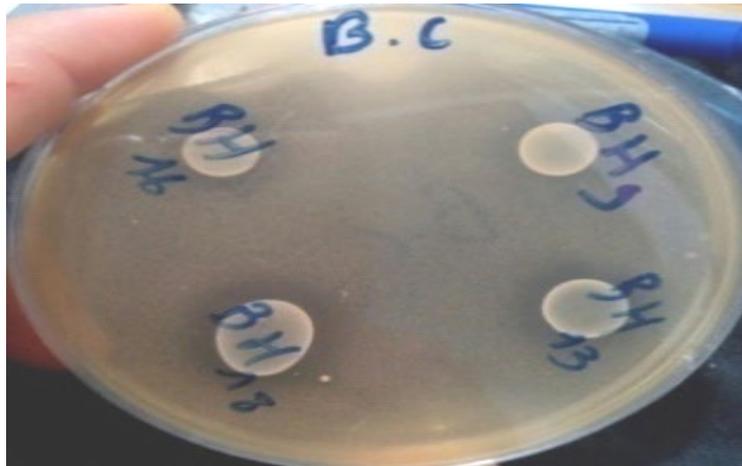


Figure35 : Test d'inhibition de *B.cereus* les bactéries lactiques sur milieu (T)



Figure36 : Test d'inhibition de *S. aureus* les bactéries lactiques sur milieu tamponné (T)



Figure 37 : Test d'inhibition d'*E. Coli* les bactéries lactiques sur milieu tamponné (T)

Tableau11: Activité antimicrobienne des bactéries pathogènes à Gram positif par les isolats lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

Inhibitrices \ indicatrices	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus cereus</i>	
	NT	T	NT	T
BHC1	13	4	9	2
BHC3	6	4	7	2
BHC6	5	4	8	2
BHC8	6	4	6	3
BHC9	6	4	6	3
BHC13	7	5	7	2
BHC16	14	5	7	2
BHC19	6	4	5	2
BHC23	5	3	6	2
BHL25	6	5	7	3
BHL27	6	4	7	2
R27	6	6	8	3
BHC28	5	5	6	2
BHL5	10	3	3	2
M5	10	4	0	2
BHC2	3	5	5	4
BHC4	5	4	6	3
BHC18	6	3	7	3
BHC26	8	3	6	3

Tableau12 : Activité antimicrobienne des bactéries pathogènes à Gram négatif par les isolats lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

Inhibitrices \ indicatrices	<i>E. coli</i>		<i>P.aeruginosa</i>	
	NT	T	NT	T
BHC1	9	8	5	2
BHC3	7	6	8	2
BHC6	10	9	9	2
BHC8	8	6	5	2
BH9	5	5	6	2
BH13	7	6	8	2
BH16	10	8	6	2
BHC19	10	9	6	2
BHC23	9	8	7	1
BHL25	9	8	5	2
BHL27	11	9	5	2
R27	8	8	5	3
BHC28	6	6	5	2
BHL5	10	10	2	0
M5	8	6	0	2
BHC2	10	9	6	2
BHC4	12	10	5	1
BHC18	10	8	6	2
BHC26	10	10	5	2

- **Activité antimicrobienne des bactéries pathogènes à Gram négatif par les isolats lactiques :**

A partir de ces résultats obtenus (figures 35 et 38) on peut noter les points suivants :

-*P.aeruginosa* :

L'inhibition des bactéries lactiques a été levée dans 5,26% des cas. Dont **BHL5**.

Les isolats lactiques dont les diamètres des zones d'inhibition ont diminué dans le milieu tamponné représentent 89,47% des cas (**BHC1, BHC3, BHC6, BHC8, BHC9, BHC13, BHC16, BHC19, BHC23, BHL25, BHL27, BHC28, BHC4, BHC18, BHC2, BHC26**).

Dans certains cas, en milieu tamponné, les diamètres des zones d'inhibitions des isolats lactiques ont augmenté de 5,26% des cas (**M5**).

-*E. coli* :

Les isolats lactiques dont les diamètres des zones d'inhibition ont diminué dans le milieu tamponné représentent 73,68% des cas. C'est le cas de **BHC1, BHC3, BHC6, BHC8, BHC13, BHC16, BHC19, BHC23, BHL25, M5, BHC2, BHC27, BHC18, BHC4**

- Les isolats lactiques qui ont gardé le même effet inhibiteur en conditions tamponnées et non tamponnées représentent 26,31% (**BHC28, BHL5, R27, BHC9, BHC26**).
- Les inhibitions obtenues contre les bactéries pathogènes peuvent être dues au diacétyle. Jay(1982), a prouvé que les bactéries à Gram négatif étaient plus sensibles au diacétyle que les bactéries à Gram positif.

- **Résultats de l'activité antimicrobienne des bactéries pathogènes à Gram positif par les isolats lactiques :**

A partir des résultats obtenus (figures 36 et 39) on peut noter les remarques suivantes selon la souche pathogène testée :

-*Staphylococcus aureus*

- Les isolats lactiques dont les diamètres des zones d'inhibition ont diminué dans le milieu tamponné représentent 89,47% des cas (**BHC1, BHC3, BHC6, BHC8, BHC9, BHC13, BHC16, BHC19, BHC23, BHL25, BHL27, BHC4, BHC18, BHC2, BHC26, BHL5, R27, M5**).
- Dans le cas de **BHC28**, en milieu tamponné, le diamètre de la zone d'inhibition a augmenté de 5,26%.
- Les isolats lactiques qui ont gardé le même effet inhibiteur en conditions tamponnées et non tamponnées représentent 5,26% (**BHC2**).

-Bacillus cereus

- Les isolats lactiques dont les diamètres des zones d'inhibition ont diminué dans le milieu tamponné représentent 89,47% des cas (**BHC1, BHC2, BHC3, BHC4, BHC6, BHC8, BHC9, BHC13, BHC16, BHC18, BHC19, BHC23, BHL25, BHC26, BHL27, BHC28**).
- Dans certains cas, en milieu tamponné, les diamètres des zones d'inhibitions des isolats lactiques ont augmentés de 5,26% des cas(**M5**).
- *S.aureus* et *B.cereus* sont catalase positif ce qui élimine l'effet inhibiteur du peroxyde d'hydrogène .Après les résultats obtenus, l'inhibition de *S.aureus* et *B.cereus* sont dues très probablement à une bacteriocine.

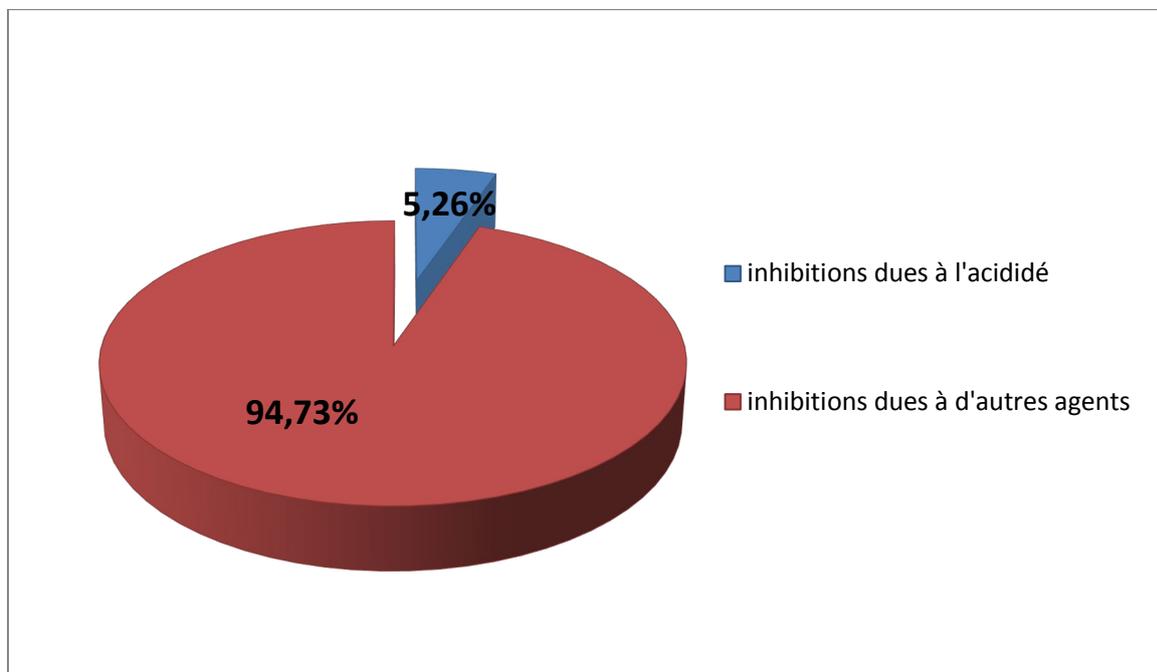


Figure38: Taux des inhibitions des isolats lactiques en milieu tamponné

D'après les résultats obtenus (figure 38), on remarque que 5,26%des inhibitions sont dues à la production d'acide lactique et 94,73% sont dues très probablement à un autre agent (H_2O_2 , bacteriocine, diacetyl,). Néanmoins, l'effet inhibiteur dépend essentiellement de la concentration de l'agent antimicrobien et de sa stabilité, pour cela il nous est nécessaire de trouver le milieu le plus adéquat pour déterminer l'agent inhibiteur.

Conclusion

CONCLUSION

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire. Ces bactéries ont la capacité de synthétiser des substances à effet inhibiteur, ce qui a attiré l'attention des chercheurs dans les dernières années afin de les utiliser comme bioconservateurs et d'augmenter ainsi la durée de conservation des denrées alimentaires.

Lapré-identification de nos dix-neuf (19) isolats (coques et bacilles) a été réalisée par la détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques. Les isolats identifiés étaient des coques et des bacilles appartenant aux cinq genres suivants : *Enterococcus* (52,63%), *Lactobacillus* (21,05%), *Lactococcus* (10,52%), *Streptococcus* (10,52%) *Pediococcus* (5,26%). Cette identification montre que la flore lactique existante dans le blé fermenté est très diverse et les proportions varient selon les genres.

L'étude de l'effet antagoniste des dix-neuf bactéries lactiques vis-à-vis d'une bactérie lactique de l'espèce *Pediococcus acidilactici* et quelques bactéries pathogènes, a été réalisée par la mise en évidence des inhibitions selon la méthode de Fleming et al., (1975).

Les dix-neuf isolats lactiques possèdent une activité antimicrobienne vis-à-vis de la souche de l'espèce *Pediococcus acidilactici*, a observé un taux 94,73% de cas d'inter-inhibitions et le reste 5,26% d'auto-inhibitions.

L'activité inhibitrice des isolats lactiques vis-à-vis de quatre souches pathogènes, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Escherichia coli* ATCC 25122, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Bacillus cereus* ATCC10876 par la méthode de Fleming et al., (1975) a été étudiée. A observé une activité inhibitrice de 97,36% vis-à-vis des bactéries pathogènes à Gram positives et négatives et 2,63% des isolats ne présentent pas d'inhibitions. L'emploi du milieu tamponné vis-à-vis de *Pediococcus acidilactici* a permis de détecter les inhibitions dues à l'acidité dont le taux est de 10,52%, avec **BHC3**, **R27** et celles dues à la production d'autres agents d'inhibitions sont de 89,46%.

L'emploi d'un milieu tamponné vis-à-vis de la souche pathogène *Pseudomonas aeruginosa* a permis de constater une levée d'inhibition de **BHL5**.

L'emploi du milieu tamponné vis-à-vis des souches pathogènes a permis de détecter les inhibitions dues à l'acidité dont le taux est de 5,26%, et celles dues à la production d'autres agents d'inhibitions sont de 94,73%.

Références bibliographiques

A

Abée, T. (1995). Pore-forming bacteriocins of gram-positive bacteria and selfprotection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiology Letters*. 129 :1-10.

Ammor ,S., Tauveron G., Dufour E et Chevallier I. (2006). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility : 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Microbial*. 17, 454-461.

Annan Prah, A., Agyeman J.A. 1997. Nutrient content and survival of selected pathogenic bacteria in Kenkey used as weaning food in Ghana. *Acta Trop*. 65:33-42.

ARTHUR, C.O. and SATU V. (2004). Antimicrobial components from lactic and Bacteria ; in : «lactic acid bacteria, microbiological and functional aspects». Marcel Dekker, 3ème Ed., New-York.

Asaduzzaman, M. S. et Sonomoto K. (2009). Lantibiotics: Diverse activities and unique modes of action. *J. biosci. Bioeng.*, 107 (05), 475-487.

Atlan, D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Cocaign-Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M., 2008. Métabolisme et ingénierie métabolique. *In* :Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*.Paris. 271-447.

Axelsson, L. T., Chung T .C., Dobrogosz X. J et Lindgren S .E. (1989). Production of a Broad Spectrum Antibacterial Substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2, 131-136.

Axelsson,L.(2004) .Lactic Acid Bacteria :Classification and Physiology.In :Salminen,S.Von Wright,A.and Ouwehand A.(Eds),Lactic acid bacteria :microbiological and functional aspects.3rd rev. And exp.ed.Marcel Dekker,Inc.,New York,pp.1-66 .

B

Beneche, R.O., Kheard, E.E., Laridi, R., Lacroix, C et Fliss, I. (2002). Inhibition of *Listeria innocua* in Cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mited culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:3683-3690 .

Boumhira, A.Z., Mami A., Hamedi A.R., Henni J.E et kihal M. 2011. Identification and characterization of Functional and Technological *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Raw Goat and camel milk Collected in Algeria.*J. Pure. APPL.Microbiol*.Vol.5(2): 553-566

Bourgeois, C.M.,Larpent J.-P.Microbiologie alimentaire :Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome1.2^e Ed.Tec & Doc .1996.704p. Bourgeois C.M., LARPENT J.-P.Microbiologie alimentaire-Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2.Tec &Doc.1996.704p.

C

Caridi, A., Micari P., Caparra P., Cufari A. and SarulloV. 2003. Ripening

and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal* 13, 191-200.

Cheigh, C.I. and PYUN Y.R. (2005). Nisin biosynthesis and its proprieties. *Biotechnol. Lett.*, 27, 1641-1648.

Cintas, L.M., Casaus P., Herranz C., Hanerstein L.S., Holo H., Cholet O. 2006. Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16.

Cleusix V., Lacroix C., Vollandweider S., Duboux M et Le Blay G. (2007). Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BioMed Central Microbiology*. 7, 101.

Condon S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 269-280.

Corrieu, G. & Luquet, F. M. (2008) Bactéries lactiques : De la génétique au ferment. Paris: Édition Tec et Doc p. 849.

Corroler, D., Mangin I., Desmasures N. and Gueguen M., 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. *Appl Environ Microbiol* 64, 4729-4735.

Corroler, D., Desmasures N. and Gueguen M., 1999. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 91-99.

Cotter, P.D., Hill C. and Ross R.P. (2005). Bacteriocins : developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.*, 3, 777-788.

D

Dacosta, Y. (2000). La bioprotection des aliments: l'antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologique des aliments. Ed. Yves Dacosta. Paris.

Dalmasso, M., Prestoz S., Rigobello V. and Demarigny Y., 2008. Behavior of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis* in a Four *Lactococcus* Strain Starter during Successive Milk Cultures. *Food Science and Technology International* 14, 469-477.

Deegan, L. H., Cotter. P. D., Hill. C., Ross. P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio preservation and shelf-life extension. *International. Dairy. Journal*.

Dellaglio, F., De Roissard H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D. 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage*. 1 : 25-116.

Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44, 100-117.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69, 193–202.

Desmazeaud M. (1996). Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine utilisation et innocuité *Cahiers Agricultures*.5 :331-334.

Devoyod, J. J et Poullain F. (1988). Les leuconostoc. Propriétés : Leur rôle en technologielaitière. *Le lait*. 68 (3), 249-280.

Devriese , L.A., et Pot, B.(1995).The genus *Enterococcus*. In the Genera of Lactic Acid Bacteria A.B, pp.327-367. Etuted by B.J.B.Wood et W.H. Holzapfel. London; Blackie Academic et Profesioonal.

Dicks, L. M. T., Heunis, D. A., van Staden, D. A., Brand, A., Sutyak Noll, K., and Chinkindas, M. L. (2011) Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Stellenbosch, South Africa. p 391-421.

Diep, D.B., Myhre R., Johnsborg O., Aakra A. and Nes I.F.(2003). Inducible bacterocin production in *Lactobacillus* is regulated by differential expression of pln operons and by two antagonist reponse regulators, the activity of which is enhanced upon phosphorylation. *Mol. Microbiol.*, 45, 483-494.

Dortu, C et Thonart P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques :caractéristiques et intérêt pour la biopreservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13 (1), 143-154.

Drider, D., Fimland H.Y., McMullen L. and Prevost H. (2006). The continuing story of class IIa bacterocin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 32, 101-107.

Dubois. (2013).*Pseudomonas aeruginosa* : réservoir, virulence et résistance. Laboratoire de Microbiologie, UMR CNRS 5234 « Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité ».

E

Eijsink, V.G., Sheie M., Middelhoven H.P., Brurberg M.B. and Nes I.F. (1998). Comparative studies of classe IIa bacteriocins of Lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microb.*, 64, 3275-3281.

El-Ziney, M.G., Uyttendaele M., Debevere J. et Jakobsen M. 1998. Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batchandcontinuous cultures. *Biotechnol. Lett.* 20 (10): 913-916.

Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P. and Villani, F. (2006). Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packagingconditions. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4663-4671.

F

Fimland, G. L., Johnsen L., Axelsson L., Bourberg M. B., Nes I. F., Eijsink V. A. H. and MAYER J. N. (2000). A C-terminal disulfide bridge in pediocin like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependant and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. bacteriol.*, 182, 2643-2648.

Fleming, H.P., J.L. Etchells and R.N. Coslilow, (1975). Microbiological inhibition of isolate of *Pediococcus* from cucumber brine. *Appl. Environ. Microbiol.* 30: 1040-1042.

G

Galvez, A., Valdivia E., Maquenda M. and Montoya E. (1985). Production of bacteriocin like substances by group D streptococci of human origin. *Microbiol.*, 43 (1985), 223-232.

Gálvez, A., Abriouel, H., Lopez, R. L., and Ben Omar, N. (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol.* 120: 51-70.

Ghalfi, H. 2006. Bacteriocin activity by *L. curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4 degrees C storage. *J. Food Protect.*, 69 : 1066-1071.

Ganzle, M. G., Holtzel A., Walter J., Jung G et Hammes W. P. (2000). Characterization of Reutericyclin Produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Applied and Environmental Microbiology.* 66 (10), 4325-4333.

Grosjean, J, Clavé, D., Archambaud, M. et Pasquier C. 2011. Bactériologie et Virologie pratique, de boeck. 2^{ème} Edition révisée. 290 : 73-76.

Goubau, P. et Pellegrims E. 2000. Repères en microbiologie, édition Garant. P : 391.

Gourchala, F., A.F. Hobamahoro, F. Mihoub and C. Henchiri, (2014). Effect of natural fermentation on the nutritional quality of "El hamoum" durum wheat (*Triticum durum*) fermented product of the Algerian country. *International journal of biotechnology and research (IJBTR)*, vol 4, 4, 9-18.

Guiraud, J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agroalimentaire, Eds. Dunod Paris, 652 p.

Guiraud, J.P. et Rosec J.P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR.* 237- 251.

Guiraud, J.P. 2003. Microbiologie Alimentaire. *Tec & Doc, Dunod.* Paris. 90-292.

H

Hadie, J.M. 1986. Other streptococci. *In: Bergey's manual of systematic bacteriology* (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). 1: 1070.

Hale, J.D.F., Ting Y-T., Jack R.W., Tagg J.R. and Heng N.C.K. (2005). Bacteriocin (mutacin) production by *Streptococcus mutans*, genome sequence reference strain UA 159. Elucidation of antimicrobial repertoire by genetic dissection. *Appl.*

Environ. Microb., 71, 7613-7617.

Hammes, W.P. and C. Hertel,(2006). The genera *Lactobacllus* and *Carnobacterium*. Prokaryotes. Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource Edited by M. D.workin.New York, Springer Verlag-Epub December.

Hancock, R. E. (2000) Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*.9: 1723-1729.

Hassan, A.N.et Frank J.F. 2001. Starter Cultures and their use. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.

Heng, N.C.K., Wescombe E P.A., Burton J. P., Jac R.W. and Tagg J.R. (2007). The diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria; in : "Bacteriocins: ecology and evolution". Ed Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg.

Hernandez P.E. and Nes I.F. (2000). Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces Enterocins L50A and L50 B, the sec dependent Enterocin P, and a novel Bacteriocin Secreted Without an N-Terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.*, 182, 6806-6814.

Ho, T.N.T., Tuan N., Deschamps A. et Caubet R.2007. Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology*. 134-142.

Hugenholtz, J. et Kleerebezem M. (1999).Metabolic engineering of lactic acid bacteria :overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations.*Curr.Opin.Biotechnol*.10(5) :492-497

Hurst, A. (1981). Nisin. *Adv. App. Microbiol.*, 21, 85-123.

J

Jack, R. W., Bierbaum C., Hiedrich C and Sahl H. G. (1995). The genetic of lantibiotic biosynthesis. *Bioassays*, 17, 193-802

Jay.J.M.Antimicrobial properties of diacetyl.*Appl.Env.Microbio*.1982.Lund B,Edlund C(2001) :probiotic *Enterococcus faecium* strain is a possible recipient vanA gene cluster.*Clin Infect Dis*,9 :1384-1385.

K

Kamar ,R., Gohar M., Jéhanno I., Réjasse A., Kallassy M., Lereclus D., Sanchis V. et Ramarao N. (2013). "Pathogenic potential of *Bacillus cereus* strains as revealed by phenotypic analysis." *Journal of clinical microbiology* 51(1): 320-323.

Khalid N.M. et Marth E.H., 1990. Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* 73 : 158-167.

Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337-349.

Klaenhammer, T.R. (1993). Genetic of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12 (1-3), 39-85.

Klaenhammer, T.R., Barrangou R., Buck B.L., Azcarate-Peril M.A et Altermann E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev* 29 :393-409.

Koning, H. and Frohlich J., 2009. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

Kunji, E.R., Mierau I., Hagting A., Poolman B. and Konins W.N., 1996. The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:187–221.

L

Labadie, J. (1999). Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science* 52, 299-305.

Larpent, J.P. (1997). Mémento technique de microbiologie. 3^{ème} Ed. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. Pp 910.

Larpent-Gourgaud, M., Michaux, O., Larpent, J.P., Desmasures, N., Mangin, I., Masson, F., Montel, M.C., et Talliez, P. (1997). Les ferments lactiques et bactéries apparentés. In microbiologie alimentaire : Technique de laboratoire. Larpent J P Tec et Doc, Lavoisier, pp : 199-255.

Law, J. and Haandrikman A., 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 7: 1-11.

Leclerc, H., Gaillard F L. et Simonet M., 1994. Les grands groupes de bactéries. In : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. *DOIN*. Paris. 445.

Leroy, F. and De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15, 67-78.

Leveau J.Y., Boiux M. et De Roissart H.B. (1991). La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. 2^e Ed., Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3: 240P.

Lorraine, A., Drapper R., Paul R., Colin H. and Cotter P.D. (2008). Lantibiotic immunity. *Curr. Protein. Pept. Sci.*, 9, 39-49.

Luchansky, J.B. and Call, J.E., 2004. Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *L. monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. *J. Food Prot.*, 67 :1017-1021.

M

Maldonado, A., Ruiz-Barba J.L et Jiménez-Díaz R. 2003. Purification and Genetic Characterization of Plantaricin NC8, a Novel Coculture-Inducible Two-Peptide Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1):383-389.

Mannu, L., Paba, A., Pes M., et Scintu M.F. (2000). Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional pecorino Sardo cheese. *J. Appl.*

*Microbiol.*89:191-197

Marciset, O., Jeronimus stratingh M.C., Malet B. and Poolman B. (1997). Thermophilin 13, a non-typical antilisterial poration complex bacterocin, that function without receptor. *J. Bio. Chem.*, 272, 14277-14284.

Mathiessen, G., Huchne K., Kroechel L., Axelsson L. and Eijssink V.G.(2005). Characterization of a new bacterocin operon in sakacin P Producing *Lactobacillus Sakei*, showing strong translational coupling between the bacteriocin and immunity genes. *Appl. Environ. Microb.*, 71, 3565-3574.

Mavrodi, O.V., McSpadden Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller, D.M. and Thomashow, L.S., 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol.* 91: 35–43.

Mérens, A., Jault P., Bargues L., Cavallo J.-D. (2013). Infections à *Pseudomonas aeruginosa*. *Résumé. Elsevier Masson SAS*.

Monnet, V., Latrille E., Beal C. et Corrieu G., 2008. Croissance et Propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. *In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 512-592.*

Morino, I., Lerayer A.L.S et de Freitas Leitao M.F. 1999. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus Lactis* strains. *Rev. Microbiol.*30:2-19.

Morisset, D., Berjeaud J.M., Frere J. et Hechrd Y.(2005). Bactériocines des bactéries lactiques et probiotiques. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.

Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M., 2010. Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. *Blackwell. Publishing.* 13.

N

Nauciel, C et Vildé J.L.2005.Bactériologie médicale : Abrégés Connaissances et pratique.Elsevier Masson .Paris ;p :257.

Nielsen, D.S., Jacobsen T., Jespersen L., Koch A.G., Arneborg N.(2008)Occurrence and growth of yeasts in processed meat products –Implications for potential spoilage .*Meat Science.*,vol.80.919-926.

Nissen-Meyer, J., Holo H., Harvastin L.S., Sletten K. and NES I.F. (1992). A nouvel lactococcal bacteriocin whose activity depend on the complementaryaction of two peptides. *J.Bacterol.*, 174, 5686-5692.

O

Ogier, J.C., Casalta E., Farrokh C. et Saihi A., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126 : 286-290.

P

Piard J C et Desmazeaud M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* 71,525-541.

Parente, E. et Riccardi, A (1999). Production, recovery and purification of bacteriocines from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52. 628-638.

Pilet, M.F., Magras C., Federighi M., 1998. Bactéries lactiques. *In : Manuel de bactériologie alimentaire* (Sutra L., Federighi M., Jouve J.L.). *Polytechnica*. Paris. 235-260.

Pilet, M.F., Magras C. et Federighi M., 2005. Bactéries lactiques. *In : bactériologie alimentaire* (Federighi M.). *2e Ed., Economica*. Paris. 219-240.

Pot, B., Devriese L.A., Uris D., Vandamme P., Haesebrouck F. and Kersters K., 1996. Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 213-222.

Pot, B. 2008. The taxonomy of lactic acid bacteria. *In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 1-106.

Prescott et al (2003). microbiologie. 2^{ème} Edition française. Traduction de la 5^{ème} Edition américaine par Claire-Michelle-Bacq-Calberg et Jean Dussart. Edition de Boeck.

Q

Qi, F., Chen P. and Caufield P.W. (2001). The groupe I strain of *Streptococcus mutans* UA 140, produced both the Lantibiotic mutacin I non lantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Appl. Environ. Microb.*, 67, 15-21.

R

Riccardi, A., Parente, E., Piraino, P., Paraggio, M., Romano, P. (2005). Phenotypic characterization of lactic acid bacteria from sourdough for Altamura bread produced on Apulia (Southern Italy). *Int. J. Food. Microbiol.*, 98:63-72.

Richard, C., Canon R., Naghmouchi K., Bertrand D., Prévast H. and Drider D. (2006). Evidence on correlation between number of disulfids bridge and foxicity of class II bacteriocins. *Food Microbiol.*, 23, 175-183.

Rodriuez, J.M., Martinez M.I. and Kok J. (2002). Pediocin PA-1 a wide spectrum bacteriocin from lactic and bacteria. *Cri. Rev. Food Sci.*, 42, 91-121.

Ross, R. P., Morgan, S., and Hill, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *Int J Food Microbiol.* 79: 3-16.

S

Saidi, N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadi M., Henni D.E., Prevost H. et Kihal M. 2002. Caractéristique des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides.* 1 : 1-11 .

Schleifer, K.H., 1987. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters.* 46 : 201-203.

Schöbitz, R., Suazo, V., Costa, M., and Ciampi, L. (2003) Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 84: 237-244.

Siegumfeldt, H., Rechner K.B. and Jakobsen M., 2000. Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl Environ Microbiol*, 66: 2330-2335.

Stenfors-Arnesen, L. P., Fagerlund A. et Granum P. E. (2008). "From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins." *FEMS microbiology reviews* 32(4): 579-606.

Stiles, M.E. et Holzappel W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36 : 1-29.

T

Tamime, A.Y., 2002. Microbiology of starter cultures. In : Dairy microbiology handbook(Robinson R.K.). 3rd Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York.261-366.

Tenaillon, O., D. Skurnik, B. Picard, and E. Denamur. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 8 (3):207-217.

Teuber, M. (1994). Lactic acid bacteria. *Biotechnology*, 1 :325-364.

Thompson, J. et Gentry-Weeks C.R. 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : De Roissart H. et Luquet F.M., Bactéries lactiques. *Lorica, Uriage*. 1 : 239-290.

Todorov, S.V., et Diks L.M.T. 2005. Production of bacteriocin ST33LD, produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*, as recorded in the presence of different medium components. *World J.Microbiol. Biotechnol.* 21 : 1585-1590.

Tosukhowong, A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D. et Sonomoto K., 2005. Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. *J. Biosci.Bioengin.* 99: 30-37.

Twomey, D., Ryan M., Meaney B. and Hill C. (2002). Lantibiotics produced by Lactic acid bacteria : structure, function, and applications. *A. Van leeuw.*, 82, 165-185.

V

Vaughan, A., Eijsink V.G.H., Osullivan T.F., Ohanlon K. and Vansindersen D. (2003). An analysis of bacteriocin produced by Lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 131-138.

Vermeiren, L., Devlieghere, F., De Graef, V. and Debevere, J. (2005). In vitro and in situ growth characteristics and behaviour of spoilage organisms associated with anaerobically stored cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology* 98, 33-42.

W

Wallace, T. D., Bradley, S., Buckley, N. D. & Green-Johnson, J. H. (2003). Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. *Journal of Food Protection* 2003. Vol. 66 (3) : 466-472

Weidemann, I., Breukink E., Van Kraaij C., Kuipers O.P., Bierbaum G. and de Kruijff B. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan

precursor lipid II combines of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Bio. Chem.*, 276, 1772-1779.

Wijaya et al.(2006). In Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires. Base. Volume13.

www.bioweb.usu.edu

Y

Yang, Z. (2000). Antimicrobial compound and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties. MSc Thesis, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Food Technology University, University of Helsinki. 61p.

Z

Zhang, H. and Cai Y., 2014. Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice. *Springer Dordrecht Heidelberg*. New York London. 536p.

Zalan Z., Barath A et Halasz A. 2005. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains. *Food Technol. Biotech.* 43(3): 219- 225

Zuliani, V, and P Garry. "Les germes pathogènes dans l'industrie agroalimentaire." *Revue "Salles propres"*, no. 31 (2004): 12-16.

annexes

Annexe A**Milieu de culture**➤ **Milieu MRS (milieu de Man, Rogosa et Sharpe, de Man *et al*, 1960)**

Peptone	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80.....	1ml
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium.....	0.2g
Sulfate de manganèse.....	0.5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

Le pH a été ajusté à $6,5 \pm 0,2$

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

➤ **Milieu Tryptica-Soja :**

Peptone De Caséine	17g
Peptone De Farine De Soja.....	3 g
Glucose	2,5 g
Chlorure De Sodium.....	.5 g
Phosphate Dipotassique.....	2,5 g
Eau	1000 ml

Ph : $7,3 \pm 0,2$

➤ **Bouillon hypersalée :**

Employée pour différencier les lactocoques et streptocoques thermophiles.

Peptone.....	15g
Extrait de viande	5g
Glucose.....	5g
NaCl.....	65g

ANNEXES

Eau distillée.....1000ml

On ajuste le pH à 6,5

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20min

Annexe B :**➤ Solution tampon**

La solution tampon est obtenue par le mélange de deux solutions A et B

Solution A

KH₂ PO₄5,44g
 Eau distillée200ml

Solution B

Na₂PO₄11,36g
 Eau distillée400ml

-Ph: 7,3 ± 0,2

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20min

➤ Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- ✓ Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- ✓ Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- ✓ Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- ✓ Décolorer avec de l'alcool, puis rincer à l'eau ;
- ✓ Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- ✓ Laver à l'eau ;
- ✓ Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion

(x100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.