



DEPARTEMENT DE BILOGIE

N°/SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Makhlouf Sarah

Souane Asmae

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : MICROBIOLOGIE FONDAMENTAL ET APPLIQUÉE

THÈME

**Optimisation du milieu de culture pour la production
des bactériocines des bactéries lactiques**

Soutenu publiquement le 21/06/2017

DEVANT LE JURY

Président	Mme CHOUGRANI Fadela	Prof U. Mostaganem
Encadreur	Mr CHERIGUENE Abderrahim	Prof U. Mostaganem
Co encadreur	Mme ZERGOUG Amina	Doctorante U. Mostaganem
Examineur	Mr ZABOURI Younes	MAA U. Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire pédagogique de microbiologie au niveau de l'université de
Mostaganem*

Remerciements

Au début et avant tout, le remerciement et louange à Dieu le tout puissant, de nous avoir donné le courage, la santé de finaliser ce travail

Nous devons l'aboutissement de ce mémoire à de nombreuses personnes.

Tout d'abord, nous remercions notre encadreur **Mr CHERIGUENE Abderrahim**, professeur à l'université *Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem*, pour l'honneur qu'il nous a fait en dirigeant ce travail, de nous avoir permis de travailler sur un projet des plus intéressants.

Nos remerciements les plus sincères vont à **Mme ZERGOUG Amina** doctorante à l'université *Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem* pour l'honneur qu'elle nous a fait en codirigeant ce travail, nous tenons à lui exprimer notre reconnaissance pour sa grande disponibilité, ses conseils et pour son écoute attentive tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Nous remercions **Mme CHOUGRANI Fadela**, professeur à l'université *Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem*, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury.

Nous remercions également **Mr ZABOURI Younes**, MAA à l'université de *Mostaganem* d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un remerciement spécial s'adresse aux techniciens des Laboratoires de Microbiologie, à **Mr Mohammed, Mme Hafida** et **Mr Djilali** merci pour vos conseils.

En fin, nos remerciements vont également à l'ensemble de nos enseignants qui nous ont accompagnés pendant notre cursus universitaire.

Dédicace

C'est grâce à Dieu « الله », le tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail que je dédie :

A mon Père et ma très chère Mère que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement continu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices

A mes très chères sœurs Nacéra, Hafsa et Fatima Zahraa, et à mon Frère Abderrahmane, qui m'ont aidé et donné le courage

A ma très chère amie Soumia Aïssa

Je dédie aussi ce mémoire à mon binôme Sarah, à tous mes collègues de la promo et à Soumia Azreug.

Asmae

Dédicace

Je dédie ce travail

A ma très chère Mère pour tous ses sacrifices, et son amour.

A mon Père qui m'a toujours aidé et encouragé.

*Très chers parents. Recevez ici l'un des plus précieux cadeaux que
Je puisse vous offrir. Car c'est grâce à vous que je suis arrivée là où je suis.*

A mes frère Lakhdar, Kaki et Ilyes Et ma sœur Ikram.

Ainsi que ma nièce Razane que j'adore.

A toute ma famille.

A mes amis Nour el houda, Souria et Ahlam en particulier, Asmae.

Sarah

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Partie bibliographique

Chapitre I: Les bactéries lactiques

I. Les bactéries lactiques	3
I.1.Histoire	3
I.2.Définition	3
I.3. Habitat.....	3
I.4. caractéristique générale des bactéries lactique	4
I.5. Classification	4
I.6. Exigences nutritionnelles.....	7
I.6.1.Exigences en acides aminés.....	7
I.6.2. Exigences en bases azotées.....	8
I.6.3. Exigences en sels minéraux.....	8
I.6.4. Exigences en cations.....	8
I.6.5. Exigences en vitamines.....	8
I.6.6. Exigences en glucides.....	9
I.7.Intérêt des bactéries lactiques	9
I.7.1. Dans l'industrie alimentaire	9
I.7.2.Dans le domaine thérapeutique.....	9
I.8. Les agents inhibiteurs produits par les bactéries lactiques	10

I.8.1. Les acides organiques	10
I.8.2. Le peroxyde d'hydrogène.....	10
I.8.3. La production d'antibiotique.....	11
I.8.4. La production de bactériocine.....	11

Chapitre II : Les bactériocines

II .Les bactériocines.....	12
II.1. Définition et caractéristique.....	12
II.2. Classification des bactériocines	13
II.3. Mode d'action des bactériocines.....	14
II.4. Condition de production.....	16
II.5. Optimisation de la production de bactériocine.....	16
II.6. Facteur influençant la production	17
II.6.1. Température et pH	17
II.6.2. Composition du milieu de culture	17
II.6.3. Temps d'incubation	16
II.7. L'intérêt des bactériocines	18
II.7.1. Dans le secteur alimentaire	18
II.7.2. Dans le secteur sanitaire	19
II.8. Limites d'utilisation des bactériocines	20

Partie expérimentale

Matériel et Méthodes

I. Matériel et méthodes.....	22
------------------------------	----

❖ Lieu de travail	22
I.1.Matériel biologique.....	22
• Bactéries lactiques.....	22
• Bactéries pathogènes.....	22
I.2.Milieus de culture.....	22
II.Méthodes	22
II.1.Repiquage, revivification et vérification de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique	22
II.2.Conservation des souches	23
• Conservation à courte durée	23
• Conservation à longue durée	24
II.3.Orientation de l'identification et confirmation des bactéries lactiques	25
II.3.1.Tests morphologiques	25
A. L'aspect macroscopique.....	25
B. L'aspect microscopique	25
❖ Coloration de Gram	25
II.3.2.Tests physiologique biochimique	26
❖ Test catalase	26
❖ Type fermentaire.....	26
❖ La Thermorésistance.....	26
❖ Effet de NaCl, du pH et de la température	26
❖ Croissance sur lait bleu de Sherman	27
❖ Hydrolyse de l'arginine (ADH)	27
❖ Fermentation des sucres	27

I.I.I. Cinétique de croissance.....	28
IV. Optimisation du milieu de culture	28
IV.1. Source d'azote.....	29
IV.2. Source de carbone	29
IV.3. Source de potassium	29
IV.4.Effet de la température d'incubation.....	29
V. Interaction bactéries lactiques / bactéries pathogènes.....	30
V.1. Préparation des précultures des bactéries pathogènes (tests).....	30
V.2.Préparation des précultures des bactéries lactiques.....	30
V.3. La mise en évidence des inhibitions.....	30
•Méthode de Tagg et Mc Given (1971) - Méthode des puits AWD	31
•Méthode d'antagonisme différé.....	31

Résultats et discussions

I. Résultats et discussion.....	32
I.1.Confirmation de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique	32
I.1.1.Etude morphologique	32
➤ Test macroscopique	32
➤ Test microscopique	33
I.1.2.Tests physiologiques et biochimique.....	35
➤ Test de la catalase.....	35
➤ Le type fermentaire.....	36
➤ Tests de Température, pH, NaCl, Thermorésistance.....	36
➤ Croissance sur lait bleu de Sherman.....	38
➤ Test ADH	38
➤ Fermentation des sucres.....	40
I.2.Cinétique de croissance et la production de la bactériocine.....	42

I.3.Optimisation du milieu de culture	44
I.3.1. Effet de la composition du MRS sur la croissance bactérienne et la production de bactériocine.....	44
• Effet de la source d'azote.....	44
• Effet de la source de carbone	46
• Effet de la source de potassium	49
I.3.2.Effet de température d'incubation.....	52
I.4.Mise en évidence de l'effet antagoniste.....	53
Conclusion et perspectives	58
Références bibliographies.....	60
Annexe	76

Liste des abréviations

% : pourcentage.

ADH : Arginine Deshydroloase.

ADN: Acide Désoxyribonucléique.

ARN: Acide Ribonucléique.

ATB : Antibiotique.

ATCC : American Type of culture collection

ATP: Adénosine Triphosphate.

ATP : Adinosine triphosphate.

AWDA: Agar Well Diffusion Assay.

BCP : Bromocrésol pourpre.

BHI: BrainHeart Infusion (Infusion de cœur et de cervelle).

BL : Bactérie lactique.

BN : Bouillon nutritive.

C° : Degré celçus.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

D : Diamètre.

DO : Densité optique.

E.coli : *Escherichia coli*.

g : Gramme.

g.L⁻¹ : gramme par millilitre (Masse volumique).

GN : gélose nutritive.

GRAS: généralement considérées comme sûres.

H : Heure.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

K⁺ : potassium.

K₂HPO₄: Hydrogénophosphatedipotassique.

kDa : Kilo Dalton.

KH₂PO₄ : Dihydrogenophosphate potassique.

Lb:*Lactobacillus*.

Mg⁺² : magnésium.

ml : Millilitre.

MI7: Milieu complexe à base d'extrait de viande, de peptone et d'extrait de levure.

Mm : millimètre.

mn : Minute.

MRS : de Man, Rogosa et scharpe.

MRSm : de Man, Rogosa et schrpe modifié.

NaCl: Chlorure de sodium.

O₂: oxygène.

OMS : organisation mondiale de santé.

P :*Pediococcus*.

pH : Potentiel hydrogène.

rpm: tours par minute.

S : *Streptococcus*.

SP : Espèce inconnue.

UFC/ml : Unité formant colonies par millilitre.

V/V : volume sur volume.

µl : microlitre.

S.aureus : *staphylococcus aureus*.

P.mirabilis : *proteus mirabilis*.

Liste des figures

<u>Figure n°01</u> : Arbre phylogénétique de l'ordre de Lactobacillales	7
<u>Figure n°02</u> : Mode d'action des bactériocines des bactéries lactique	15
<u>Figure n°03</u> : Schéma de conservation à courte durée des bactéries lactiques purifiées	24
<u>Figure n°04</u> : Schéma de conservation à longue durée des bactéries lactiques purifiées	24
<u>Figure n°05</u> : Schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques	28
<u>Figure n°06</u> :Aspect des souches lactiques pures en milieu MRS liquide	32
<u>Figure n°07</u> : Aspect macroscopique des souches lactiques en milieu MRS solide.....	33
<u>Figure n°08</u> :Observations microscopiques des bactéries lactiques après une coloration de Gram avec un grossissement (G : x100)	34
<u>Figure n°09</u> : RésultatTest de la catalase	35
<u>Figure n°10</u> : Résultats obtenus pour le type fermentaire sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de durham	36
<u>Figure n°11</u> : Résultats obtenus pour les tests de température, pH, NaCl, thermorésistance.....	38
<u>Figure n°12</u> : Résultats du test de lait de Sherman.....	38
<u>Figure n°13</u> : Résultats du test ADH	39
<u>Figure n°14</u> : Résultat de la fermentation du sucre par les souches LCM 103, MVM 22, MGM 85 et LCM 17.....	41

<u>Figure n°15 :</u> Les courbes de croissance des souches lactiques cultivées dans le milieu MRS.....	43
<u>Figure n°16:</u> L'effet des différentes sources d'azote sur la production de bactériocine LCM 103 testée contre <i>E.coli</i>	44
<u>Figure n°17 :</u> L'effet de source de carbone sur la croissance des bactéries lactique.....	45
<u>Figure n°18 :</u> L'effet de la source de carbone sur la croissance des souches lactique.....	47
<u>Figure n°19:</u> L'effet de différentes sources de carbone sur la production de la bactériocine, A : LCM 103 testée contre <i>Staphylococcus aureus</i> , B : MVM 22 testée contre <i>Proteus mirabilis</i>	48
<u>Figure n°20 :</u> L'effet de la source de potassium sur la croissance de nos souches lactique.....	50
<u>Figure n°21 :</u> L'effet de différentes sources de potassium sur la production de la bactériocine, A : MGM 85 testée contre <i>E.coli</i> , B : LCM 17 testée contre <i>Staphylococcus aureus</i>	51
<u>Figure n°22:</u> Effet de la température d'incubation sur la croissance des souches lactiques.....	53
<u>Figure n°23 :</u> Aspect macroscopique des bactéries pathogènes après 24h d'incubation. A : <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 sur milieu Chapman, B : <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 sur milieu Mac Conkey, C : <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659 sur milieu GN.....	54
<u>Figure n°24 :</u> Diamètre des zones d'inhibition formée par les souches lactiques confrontées avec les bactéries pathogènes	56
<u>Figure n°25 :</u> Zones d'inhibitions des souches lactiques vis-à-vis de : A : <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 B : <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	58

Liste des tableaux

Tableau n°01 : Résultats de l'étude morphologique	35
Tableau n°02 : Résultats de l'identification du genre	39
Tableau n°03 : Profil fermentaire des sucres obtenu avec les souches étudiée	40

Résumé

Les bactéries lactiques font naturellement partie de notre environnement et notre alimentation. On reconnaît depuis longtemps, aux bactéries lactiques la propriété de produire des substances antimicrobiennes. En effet, les bactéries lactiques ont la particularité de synthétiser des substances inhibitrices, entre autre les bactériocines.

L'objectif de notre travail consiste à optimiser la production des bactériocines de 4 souches lactiques, et ce en étudiant différents paramètres pouvant être à l'origine de l'augmentation de la production des bactériocines.

L'études des caractéristiques macroscopique, microscopique, biochimiques ; et physiologiques (type fermentaire, d'hydrolyse de l'arginine (ADH), fermentation des sucre, croissance sur lait bleu de Sherman, thermorésistance, effet de NaCl : 4% et 6.5%, pH=9.6 et croissance à différentes température) a permis d'orienter l'identification vers : *Enterococcus sp.*

Par la suite, nous avons effectué une optimisation sur le milieu MRS basé sur la modification de diverse sources composant le milieu de culture : source d'azote, de carbone et de potassium en étudiant en parallèle le temps d'incubation qui consiste en l'élaboration de la cinétique de croissance, ainsi que l'effet de la température et du pH.

La mise en évidence du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques après chaque optimisation a été réalisé par la méthode des puits AWDA vis à vis de certains bactéries pathogènes à savoir *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *Staphylococcus aureus*.

Les résultats obtenus montrent que certaines sources composant le milieu de culture agissent seulement sur la croissance de la souche bactérienne alors que d'autres agissent sur la production de bactériocine.

Le milieu MRSm optimisé a donnée de bien meilleurs résultat comparativement au témoin qui est le MRS. Nous constatons d'importantes zones d'inhibitions entre 26 à 30 mm pour *S.aureus*, alors que les diamètres sont de 22 à 26 mm pour *E.coli* et des diamètres compris entre 27 à 32 mm pour *P.mirabilis*.

Mots clés : Bactéries lactiques – bactériocine – Optimisation du milieu de culture - bactérie pathogène - pouvoir antimicrobien.

Abstract

Lactic bacteria are naturally part of our environment. It has long been recognized that lactic acid bacteria have the property of producing antimicrobial substances. Indeed, lactic acid bacteria have the particularity to synthesize inhibiting substances, among others bacteriocins.

The aim of our work is to optimize the production of bacteriocins of 4 lactic strains by studying different parameters that may be responsible for the increase in bacteriocin production.

The study of macroscopic, microscopic, biochemical and physiological characteristics (fermentation type, arginine hydrolysis (ADH), sugar fermentation, growth on Sherman blue milk, heat resistance, NaCl effect: 4% and 6.5%, pH = 9.6 and growth at different temperatures) were used to orient identification to: *Enterococcus sp*

Subsequently, we performed an optimization on the MRS medium based on the modification of various sources composing the culture medium: source of nitrogen, carbon and potassium by studying in parallel the incubation time, Development of growth kinetics, as well as the effect of temperature and pH.

The antimicrobial activity of the lactic bacteria was demonstrated after each optimization by the AWDA method using pathogenic bacteria, namely *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Staphylococcus aureus*.

The results obtained show that some sources composing the culture medium act only on the growth of the bacterial strain while others act on the production of bacteriocin.

The optimized MRS_m medium gave much better result compared to the control which is the MRS. We find large zones of inhibition between 26 to 30 mm for *S. aureus*, while diameters are 22 to 26 mm for *E.coli* and diameters between 27 to 32 mm for *P.mirabilis*.

Key words: Lactic bacteria - bacteriocin - Optimization of the culture medium - pathogenic bacterium - antimicrobial power.

ملخص

البكتيريا اللبنية هي بطبيعة الحال جزء من بيئتنا والنظام الغذائي لدينا. وقد تم الاعتراف منذ فترة طويلة أن بكتيريا حمض اللاكتيك لديها خاصية إنتاج المواد المضادة للميكروبات. في الواقع، بكتيريا حمض اللاكتيك لديها خصوصية تركيب المواد المانع، من بين البكتيريا الأخرى و هي البكتريوسين.

الهدف من عملنا هو تحسين إنتاج البكتريوسين من 4 سلالات اللبنية من خلال دراسة المعلمات المختلفة التي قد تكون مسؤولة عن زيادة إنتاج البكتيريا.

دراسة الخصائص المجهرية والميكروسكوبية والكيميائية الحيوية والفسولوجية (نوع التخمر، التحلل المائي أرجينين، تخمير السكر، النمو على الحليب الأزرق شيرمان، مقاومة الحرارة، تأثير كلوريد الصوديوم: 4% و 6.5%، درجة الحموضة = 9.6 والنمو بدرجات حرارة مختلفة) لتوجيه تحديد الهوية إلى: *Enterococcus sp.*

في وقت لاحق، أجرينا تحسين على الوسط الغذائي MRS استنادا إلى تعديل مصادر مختلفة تُولف هذا الوسط : مصدر النيتروجين والكربون والبوتاسيوم من خلال دراسة بالتوازي مع الوقت الحضانة، تطوير حركية النمو، فضلا عن تأثير درجة الحرارة و درجة الحموضة.

وقد أظهرت قوة مضادة للميكروبات من البكتيريا اللبنية بعد كل التحسين من قبل طريقة أودا فيما يتعلق ببعض البكتيريا المسببة للأمراض، وهي *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis*.

أظهرت النتائج أن بعض المصادر التي تُولف الوسط الغذائي تعمل فقط على نمو السلالة البكتيرية بينما يعمل البعض الآخر على إنتاج البكتريوسين.

أعطى الوسط الغذائي المعدل نتيجة أفضل بكثير بالمقارنة مع السيطرة التي في وسط MRS , نجد مناطق كبيرة من تثبيط بين 26 إلى 30 ملم *S.aureus*، في حين أن أقطار 22-26 ملم ل *E.coli* وأقطار بين 27 إلى 32 ملم ل *P.mirabilis*.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا اللبنية - البكتريوسين - تحسين وسط الاستزراع - البكتيريا المسببة للأمراض - قوة مضادات الميكروبات.

INTRODUCTION

INTRDUCTION

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans la fermentation de différents aliments. Leur capacité à produire des acides organiques accompagnés de l'abaissement du pH est le majeur facteur par lequel ces dernières inhibent la croissance des autres microorganismes concurrents. D'autres métabolites tels que le peroxyde d'hydrogène, l'alcool et le diacetyl synthétisés par les bactéries lactiques. De plus ces dernières peuvent synthétiser des composés inhibiteurs de nature protéique appelés bactériocines. L'intérêt des bactériocines des bactéries lactiques réside d'une part dans leur effet antimicrobien à spectre large ou étroit et d'autre part dans leur sûreté pour la santé humaine, vue leur sensibilité aux protéases digestives, et leur non toxicité pour les cellules eucaryotes (Gálvez *et al.*, 2011).

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique, naturellement par des bactéries à Gram positif c'est à dire les bactéries lactiques. Elles sont actives contre d'autres bactéries, surtout les pathogènes majeurs tels que *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pneumoniae*.... 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 des bactéries lactiques sont déjà largement utilisées par l'industrie agroalimentaire pour leurs propriétés de bioconservation tel que la Nisine qui est déjà commercialiser, ceci dit la quantité produite de bactériocines reste tout de même faible (Gálvez *et al.*, 2011).

Dans ce contexte, ce travail consiste à optimiser le milieu de culture des souches lactiques afin d'augmenter la production de bactériocine, puis mettre en évidence l'activité antagoniste de ces souches lactiques vis à vis des bactéries pathogènes, l'étude est présentée comme suite :

- ❖ La première partie consiste à revivifier et repiquer les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes dans leurs milieux appropriés.
- ❖ Dans la deuxième partie, une orientation de l'identification des bactéries lactiques est établie, en ce en réalisant des tests physiologiques et biochimiques sur ces souches.
- ❖ Dans la troisième partie, une optimisation des milieux de cultures appropriés aux souches lactiques est effectuée sur la base de modification de diverses sources composant le milieu de culture ainsi que d'autres paramètres.
- ❖ Et enfin, la recherche de l'activité antagoniste des souches lactiques vis à vis des bactéries pathogènes est réalisée.

CHAPITRE I

LES BACTÉRIES LACTIQUES

I - Les bactéries lactiques

I.1. Historique

Les bactéries sont de très anciens micro-organismes dont les ancêtres (**Dridier et Prevost, 2009**). Ils ont été utilisés pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans, sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité (**Sallofe, 1994**).

Ce n'est qu'à la fin du 19^{ème} siècle, époque des grandes découvertes de la microbiologie, que certaines chercheuses ont isolé un *Streptocoque* (**Poulain, 1994**), comme **Von Freudeinreich en 1897**. La production des cultures de bactéries et l'emploi de ferment se développent au début du 20^{ème} siècle (**Dridier et Prevost, 2009**).

I.2. Définition

Les bactéries lactiques constituant l'un des groupes incontournables de la microbiologie alimentaire (**Dridier et Prevost, 2009**). Défini pour la 1^{ère} fois par **Orla-Jensen (1919)**, il réunit plusieurs genres caractérisés par leurs capacités à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (**Novel, 1993**).

Micro-organismes ubiquitaires, les bactéries lactiques se trouvent dans différents environnements (**Dellaglio et al., 1994; Matamoros, 2008**), ce sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (**De Roissart, 1986**). Elles jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers (**Raynaud, 2006**) produisant de l'acide lactique comme produit principal et vaginale (humain ou animale).

I.3. Habitat

Les bactéries lactiques sont très abondantes 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, de végétaux ou des alimentsensemencés par les 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 (**Leveu et Bouix, 1993; Hassan et Frank, 2001; Hadaf, 2012**). Ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (**Generally Recognized As Safe**).

I.4. Caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries possédant une réponse positive à la coloration de Gram, immobiles, non sporulées, au point de vue enzymatique catalase, oxydase et nitrate réductase négative, anaérobies ou aérotolérantes (Laurent *et al.*, 1998), se présentant sous formes différentes, cocci ou bâtonnets (Bourgeois et Larpent, 1996).

Elles ont des besoins complexes en facteur de croissance : vitamine B, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques. Elles se caractérisent par un métabolisme exclusivement fermentaire les conduisant à produire à partir du glucose des quantités importantes d'acide lactique, accompagné dans certains cas d'autres métabolites (éthanol, CO₂, autres acides organiques). Elles ont une faible capacité de biosynthèse (Luquet, 1986).

I.5. Classification

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (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 API50CH (Curk *et al.*, 1993).

L'analyse comparative des séquences d'ARN ribosomal 16S a entraîné des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (Salminen *et al.*, 2004). Selon la dernière édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des *Bacilli* et l'ordre des *Lactobacillales* renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles (Figure 1).

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

Aerococcus : les cellules de ce genre sont de forme ovoïde (1-2¼m de diamètre), ±-hémolytiques, non-gazogènes, arginine(-), pouvant croître à une concentration de 6.5% de NaCl, la division se déroule sur deux plans formant ainsi des tétrades.

Cependant, des cellules isolées ou en paires peuvent être observées au milieu de la phase exponentielle.

Carnobacterium : ce genre est constitué de bâtonnets courts parfois incurvés isolés ou en paires, psychrotolérants, pouvant se développer à pH : 9 et incapables de croître à 8% de NaCl ; quelques espèces sont catalase (+) en présence d'hème.

Enterococcus : ce genre comprend des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaînes, homofermentaires. Quelques espèces sont mobiles par des petits flagelles et d'autres possèdent une pseudo-catalase. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6.5% de NaCl, à un pH 9.6 et un intervalle de température compris entre 10°C et 45°C avec un optimale de croissance de 35°C à 37°C.

Lactobacillus : les cellules de ce genre sont soit des bacilles longs parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes. Elles sont généralement immobiles à l'exception de quelques espèces qui possèdent des flagelles péritriches. Les souches sont acidophiles et peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C à 53°C. Les thermophiles sont incapables de se développer à moins de 15°C.

Le genre *Lactobacillus* peut être divisé en trois groupes : homofermentaires stricts, hétérofermentaires facultatifs et hétérofermentaires stricts.

Lactococcus : les cellules de ce genre sont sphériques ou ovoïdes isolées, en paires, ou en chaînes. De type mésophiles, leur température optimale varie de 10 à 40°C mais sont incapables de se développer à 45°C. Celles-ci 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.

Leuconostoc : ce genre comprend 10 espèces fastidieuses dans leurs exigences nutritionnelles, les cellules sont ellipsoïdales à sphériques généralement allongées qui s'arrangent en paires ou en chaînes, non acidophiles avec un pH optimum de croissance égal à 6.5. Néanmoins, certains leuconostocs peuvent croître même à un pH de 4,5.

La température optimale est comprise entre 20°C et 30°C mais la croissance peut aussi avoir lieu même à 5°C. Les leuconostocs sont des hétérofermentaires obligatoires. Sur un milieu concentré en saccharose, certaines souches produisent des dextrans extracellulaires.

Oenococcus : les cellules sont immobiles, asporulantes de forme ellipsoïdale à sphérique, avec un arrangement en paires ou en chaînes, non hémolytiques et généralement non protéolytiques.

Elles exigent un milieu riche en acides aminés et en facteurs de croissance, leur pH optimum étant de 6 à 6,8 et la température optimale de 20°C à 30°C.

Pediococcus : ce genre est représenté par neuf espèces ayant un métabolisme homofermentaire.

Il rassemble des cellules immobiles de forme sphérique parfois ovoïdes, isolées ou en paires qui se divisent dans deux directions perpendiculaires formant ainsi les tétrades mais jamais les chaînes. Certaines espèces produisent une catalase ou une pseudocatalase. Les cellules sont acidophiles mais non halophiles et croissent à pH : 5 mais pas à pH : 9, la température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C.

Streptococcus : 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 un pH 9.6. Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes.

Vagococcus : les cellules sont ovoïdes isolées, en paires ou en chaînes. La plupart des espèces sont mobiles par des flagelles péritriches. Elles sont capables de croître à 10°C mais non à 45°C sans production de gaz ni d'arginine dihydrolase (ADH).

Tetragenococcus : ce genre rassemble des cellules immobiles, sphériques ou ovoïdes avec un diamètre de 0.5-1.0 µm formant des tétrades après leur division dans deux directions perpendiculaires; comme elles peuvent être isolées ou en paires.

Le métabolisme des tétragenococci est homofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ à partir de glucose comme ils sont incapables de réduire les nitrates ni d'hydrolyser l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 35°C et ne peuvent pas croître à 10°C et à 45°C.

Weissella : les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont immobiles et hétérofermentaires. La température optimale de croissance est de 15°C, mais quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 45°C.

Parmi tous ces genres cités, seulement cinq (*Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*) répondent aux caractéristiques générales d'une bactérie lactique typique (Salminen et al., 2004).

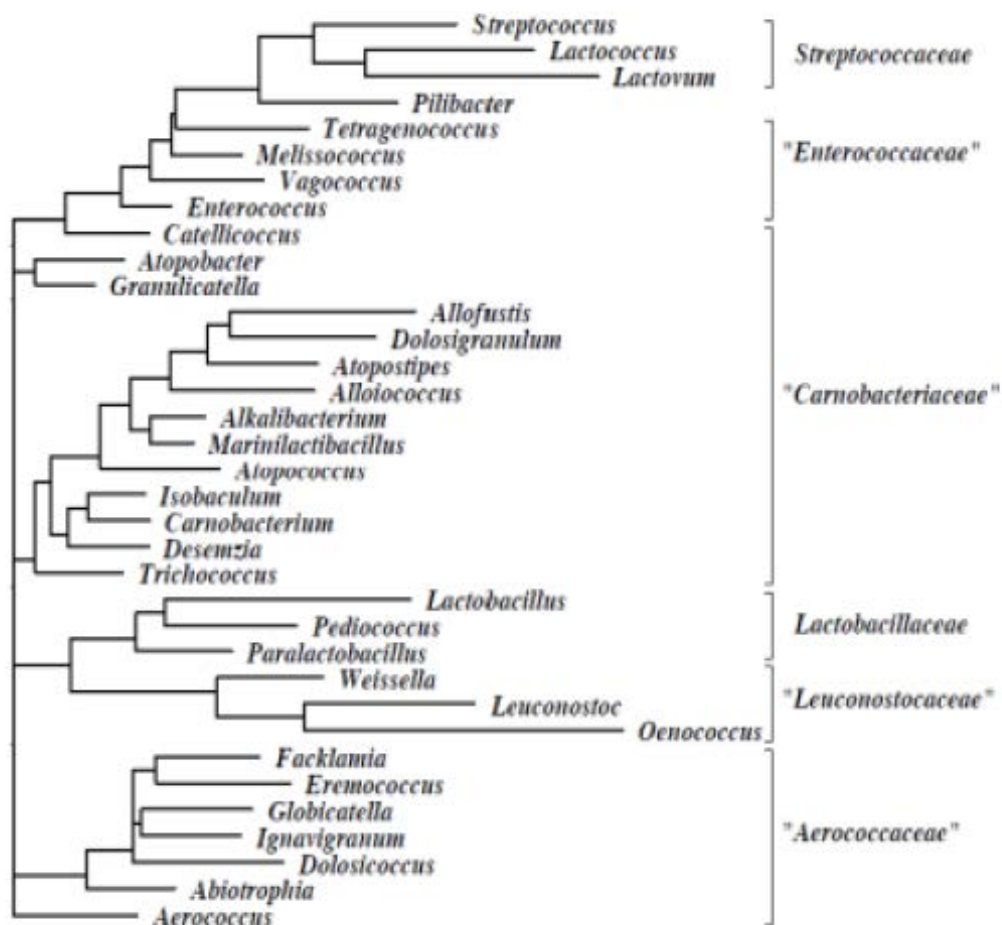


Figure 01 : Arbre phylogénétique de l'ordre de Lactobacillales (**Ludwig et al., 2008**).

I.6. Exigences nutritionnelles

Les bactéries lactiques ont un besoin particulier pour leur nutrition car elles sont incapables de synthétiser un certain nombre d'éléments qui sont variables d'une espèce à une autre, vu leur faible biosynthèse, elles sont donc auxotrophes. Elles sont par conséquent considérées comme le groupe de bactéries le plus exigeant de point de vue nutritionnel (**Dridier et Prevost, 2009**).

I.6.1. Exigences en acides aminés :

Les bactéries lactiques sont en principes incapables d'effectuer la synthèse des acides aminés, et doivent par conséquent faire appel à des sources exogènes pour assurer leur métabolisme (**Luquet, 1986**).

Les exigences en acides aminés des *Streptococcus* sont différentes de celles des *Lactobacillus*, ils ont besoin d'acide glutamique d'histidine, de cystéine, de méthionine et aussi de valine, de leucine et de tryptophane ou de tyrosine.

Les lactobacilles ont besoin d'aspartate, d'histidine, de lysine, de leucine, de méthionine et de valine (Lenoin et al., 1992).

I.6.2. Exigences en bases azotées :

Les bases puriques et pyrimidiques ne sont pas vraiment essentielles au métabolisme des bactéries lactiques (Desmazeaud, 1983).

I.6.3. Exigences en sels minéraux :

Les besoins en éléments minéraux des bactéries lactiques ne sont encore partiellement connus. Les principaux éléments tel que le magnésium et le manganèse sont généralement requis (Imbert et Blandeau, 1998; Letrot et Juillard, 2001; Corrieu et al., 2008) jouent un rôle important dans la nutrition des *Lactobacillus* (Ledesma et al., 1977; Mazali, 1992), alors que les besoins en calcium et en potassium sont moins systématiques. Les besoins en fer dépendant des micro-organismes (Pandey et al., 1994; Impert et Blandeau, 1998).

Le zinc présente un effet positif pour la croissance de certains lactobacilles, mais il est toxique à fort concentration. A l'opposé, le sodium, le cadmium, et le cuivre démontrent un effet inhibiteur (Corrieu et al., 2008).

I.6.4. Exigences en cations :

Le rôle principal des cations dans la nutrition des bactéries lactiques et dans les différentes réactions métaboliques (Boyaval et al., 1988). La forme ionique entraîne une activation de la fermentation lactique par une meilleure utilisation des sucres, par exemple Amouzou et al., (1985) ont montrés le rôle du Mg²⁺ sur *Streptococcus thermophilus*.

I.6.5. Exigences en vitamines :

Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser les vitamines qui jouent un rôle irremplaçable des coenzymes dans le métabolisme cellulaire. *Streptococcus thermophiles* à une exigence absolue en acide pantothénique (B5), en riboflavine (B2), à moindre degré en thiamine (B1), en nicotinamide ou en acide nicotinique (B3) et en biotine (B8).

La pyridoxine ou ses dérivés (B6) stimulent fortement sa croissance (Desmazeaud, 1983).

I.6.6. Exigences en glucides :

Les bactéries lactiques ont la capacité de fermenter des glucides. (Wood et Holzappel, 1995 Bazo, 2011), par exemple *S. thermophilus* est fermenté et transformé rapidement du lactose en lactate, et utilise différentes sources tel que : lactose, saccharose, glucose, galactose, fructose. *S. thermophilus* a été adapté à s'alimenter et croître en présence de lactose comme source de carbone (Vaillancourt et al., 2002 ; Vanden Bogaard et al., 2004 ; Ben-Yahia, 2012).

I.7. Intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique.

I.7.1. Dans l'industrie alimentaire :

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments. 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 entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis et al., 2005). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques, et ce grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (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, capacité de dominance, facilité de culture, de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth et Steele, 2001).

I.7.2 Dans le domaine thérapeutique :

Etant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem et al., 20018). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (Mkrtchyan et al., 2010). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish et al., 2011).

Uehara *et al.*, (2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour 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.

I.8. Les agents inhibiteurs produits par les bactéries lactiques :

La production des agents antimicrobiens par les bactéries lactiques, est connue depuis longtemps. Les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et d'autres molécules antimicrobiennes sont les principaux agents inhibiteurs produits par ces microorganismes. Ces agents inhibiteurs diffèrent par leur cible mais aussi par leur nature et leur structure (Drider, 2010).

I.8.1. Les acides organiques :

Ils sont produits par catabolisme des sources de carbone. L'acide lactique est le seul acide issu de la glycolyse par la voie homofermentaire, alors que la voie hétérofermentaire génère en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique. Ces acides traversent la membrane cytoplasmique et diminue le pH du milieu intracellulaire, ce qui provoque l'inhibition des fonctions cellulaires (Kashet, 1987). Plusieurs microorganismes d'altération des aliments sont connus pour leur sensibilité aux changements de pH intracellulaire. De plus, les bactéries lactiques semblent être compétitives en conditions acides, causant l'inhibition d'autres bactéries (Klaenhammer *et al.*, 1994). Cependant si l'acidité du milieu dépasse les seuils acceptés par la souche, des cas d'auto-inhibitions peuvent être observées, en effet au cours de la fermentation d'une bactérie lactique, l'administration en continue de glucose, provoque la production en continue des acides organiques, par conséquent, une diminution progressive du pH du milieu et si celui-ci n'est pas contrôlé, la bactérie peut s'auto-inhiber (Grattepanche, 2005).

I.8.2. Le peroxyde d'hydrogène :

Les bactéries lactiques ne possèdent généralement pas de catalase. L'accumulation de peroxyde d'hydrogène par l'action des oxydases (Daeschel, 1989), est une cause de l'activité antimicrobienne, en particulier des lactobacilles. Le H₂O₂ peut être auto-inhibiteur dans le cas, où l'activité peroxydasique n'est pas importante (Price et Lee, 1970).

I.8.3. La production d'antibiotique :

La reutérine est parmi les antibiotiques produites par les bactéries lactiques, la plus caractérisée et purifiée, produite par certaines souches de *Lactobacillus reuteri*, lorsque le glycérol est utilisé comme source de carbone (**Stackengrand et Tenber, 1988; Talarico et al., 1990**). Cet ATB bloque la synthèse de l'ADN (**Talarico et Dobrogosz, 1989**), ce qui explique son large spectre d'action.

I.8.4. La production de bactériocine :

Klaenhammer (1988), suggère que 99 % des bactéries peuvent produire au moins une bactériocine. Pour des raisons de sécurité alimentaire, plusieurs bactéries n'ont pas été sujet d'étude, pour la production de bactériocines. Les peptides antimicrobiens (bactériocines) des bactéries lactiques sont les plus abordées dans la recherche. Ces substances protéiques, sont des toxines à spectre d'action plus ou moins large (**Riley et Wertz, 2002**). Ces molécules constituent la deuxième cause de l'effet inhibiteur des bactéries lactiques, après celle causée par les acides organiques.

CHAPITRE II

LES BACTÉRIOCINES

II - Les bactériocines

II.1. Définition et caractéristique

La découverte de la première bactériocine remonte à 1925. Cette dernière, isolée d'*Escherichia coli*, possédait une activité bactéricide envers une autre souche d'*E.coli*. Elle fut nommée colicine V (**Gratia 1925**). À cette époque, le concept de compétition entre diverses bactéries était instauré et bien accepté. Par contre, celui où des bactéries inhibent la croissance de souches de la même famille diffère des conceptions établies. La découverte d'une bactériocine chez les lactocoques remonte à 1933.

Une bactériocine est une substance de nature protéique possédant une activité antimicrobienne et qui peut être produite aussi bien par des bactéries à Gram positif que par des bactéries à Gram négatif (**Aymerich et al., 2000 ; Ammor et al., 2006**).

Elle est considéré comme étant un produit extracellulaire primaire, synthétisé par les bactéries par voie ribosomale et peut avoir une activité bactéricide à spectre étroit incluant les bactéries de la même espèce ou du même groupe à l'exception de la bactérie productrice qui possède un mécanisme de protection spécifique (**Aymerich et al., 2000 ; Ammor et al., 2006**).

La nature protéique de cette substance a été identifiée par Hirsch en 1951 qui l'appela nisine ; « n » : désigne les straptocoques de groupe N selon la classification de Lancefield (1993), « is » : est l'abréviation de inhibitory substances et « ine » désigne une bactériocine (**De Vuyst et Vandamme, 1993**).

Le spectre d'action des bactériocines se définit comme étant la diversité des bactéries sensibles à l'action bactériostatique ou bactéricide du peptide. On a d'abord attribué aux bactériocines un spectre d'activité limité aux bactéries taxinomiquement proches de la bactérie productrice (**Tagg et al., 1976**). Certaines bactériocines possèdent un large spectre d'activité qui inclut des bactéries éloignées au point de vue phylogénétique.

- **Caractères biochimiques** : vue leur nature protéinique, ces substances présentent une sensibilité aux enzymes protéolytiques quelle que soit leur origine : pancréatique (α -chymotrypsine, trypsine) ou gastrique (pepsine) (**Piard et Desmazeaud, 1992**).
- **Caractères physiques** : en général les bactériocines de faible poids moléculaire sont très thermostables, à l'opposé de celles qui sont à poids moléculaire élevé (sensibles aux traitements thermiques) (**Alves et al., 2006 ; Albano et al., 2007**).

- **Caractères chimiques** : Ces molécules sont stables dans les milieux acides et neutres, par contre elles perdent leur activité en milieu basique, c'est le cas de la nisine qui est inactivée à 80% à pH 10 (**Belliard et al., 1996**). De même, la lactastrepsine qui est stable à pH 4,6 - 5 et devient réversiblement inactivée à pH égal ou supérieur à 6 (**Piard et Desmazeaud, 1992; Kostinek et al., 2007**), cependant **Leeet Paik, (2001)** rapportent que l'activité de la bactériocine, issue d'un streptocoque lactique mésophile, n'est pas affectée par une variation du pH allant de 2 à 11.
- **Caractères antigéniques** : certaine bactériocines peuvent présenter des propriétés antigéniques qui sont en rapport avec leur poids moléculaire élevé et le niveau de complexité structurale.
- **Caractères génétiques** : la synthèse des bactériocines par les lactocoques est régie par des facteurs dits « facteurs bactériocinogènes » qui sont portés soit par des chromosomes, soit par des éléments extrachromosomiques tels que les plasmides (**Barrefoot et Klaenhammer, 1984 ; Larpent, 2000**).

En parallèle à la production de bactériocine, les bactéries synthétisent une protéine dite « d'immunité » qui leur permet de contrôler l'action du composé antagoniste l'exemple est celui des gènes NISI et nis FEG qui sont impliqués dans l'immunité cellulaire à la nisine.

En général, les facteurs bactériocinogènes et les protéines d'immunité sont portés par le même gène et la transmission des facteurs bactériocinogènes se fait soit normalement par voie héréditaire ou par transduction ou alors après une manipulation génétique.

En effet, grâce au génie génétique, des souches capables de produire des taux élevés de bactériocines ou de ferments résistants aux inhibiteurs ont été produites (**Ray et al., 1992 ; Leloir et al., 2001**).

II.2. Classification des bactériocines

Bradley (1967) a classé les bactériocines selon leur poids en deux groupes :

- **Bactériocines de faible poids moléculaire**: non sédimentables, résistantes à la trypsine et thermostables.
- **Bactériocines de haut poids moléculaire**: sédimentables, résistantes à la trypsine, thermolabile, visibles au microscope électronique et ressemblent aux queues de phages.

Les bactériocines ont été divisées en quatre classes (**Klaenhammer, 1993**), cependant aucune bactériocine de *L.lactis* n'appartient aux classes III et IV.

➤ **Classe I « les lantibiotiques »** : qui sont de petits peptides hydrophobes (< 5KDA) comprenant les acides aminés inhabituelles suivant : la lanthionine - la P méthyllanthionine et des résidus déshydraté (la dehydroalanine et déhydrobutyrine) liés par des ponts soufrés intra chaîne, sont synthétisées par plusieurs genres microbiens Gram positif (staphylocoques, bacillus, lactococcus) (**Cleveland et al., 2001**), dans le cas des bactéries lactique l'exemple type est la nisine produite par *lactococcus lactis* qui a une action bactéricide contre de nombreuses bactéries à gram positif mais n'agit pas sur les bactéries à gram négatif.

➤ **Classe II « bactériocines ne possédant pas d'acides aminés modifiés »**: comporte des bactériocines constituées de peptides de faible poids moléculaire, généralement inférieur à 15 KDa et thermostable (entre 30 min à 100°C et 15 min à 121°C), à spectre étroit où leur activité est dirigée contre les bactéries phylogénétiquement différentes, parmi les bactériocines les plus étudiées dans cette classe la diplococcine qui est produite par plusieurs souches de *lactococcus lactis sp crémoris*, la lactococcine A, la lactocine 27, la lactacine B et F, (**Davay et Richardson, 1981**).

➤ **Classe III** : est représentée par des bactériocines de haut poids moléculaire (plus de 30KDa), sensibles à la chaleur.

➤ **Classe IV** : comporte les bactériocines composées d'une partie non protéique nécessaire à l'activité inhibitrice (sucre ou lipide), cette classe a été ajoutée suite à l'observation de la perte de l'activité de certaines bactériocines après leur incubation en présence d'enzymes dégradant les sucres et les lipides (**Jiménez -Diaz et al., 1993**) mais son existence reste controversée (**Nés et al., 1996**).

II.3. Mode d'action des bactériocines

Selon **Tagg et al., (1976)** le mode d'action des bactériocines comporte deux étapes :

1^{ère} étape : elle consiste en l'adsorption de la bactériocine sur les récepteurs spécifiques ou non spécifiques de la membrane des cellules cibles.

2^{ème} étape : Phase irréversible impliquant la modification pathologique de la cellule cible.

Chung et al., (2000) ont confirmé que l'action des bactériocines se manifeste par la formation des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles et la perte des constituants cellulaires (ATP, K⁺) qui ont un rôle dans le maintien de l'équilibre des réserves énergétiques et du pH intracellulaire. Cette perte de l'intégrité induit la baisse de la synthèse macromoléculaire (ADN, ARN, protéines).

Alors que **Schedl et al., (1994)** assurent que les bactériocines peuvent avoir trois types d'effets :

- Effet bactériostatique : c'est-à-dire ralentissement ou arrêt de la croissance.
- Effet bactéricide : perte de la viabilité et lyse cellulaire telles que la nisine.
- Effet bactéricide sans lyse cellulaire.

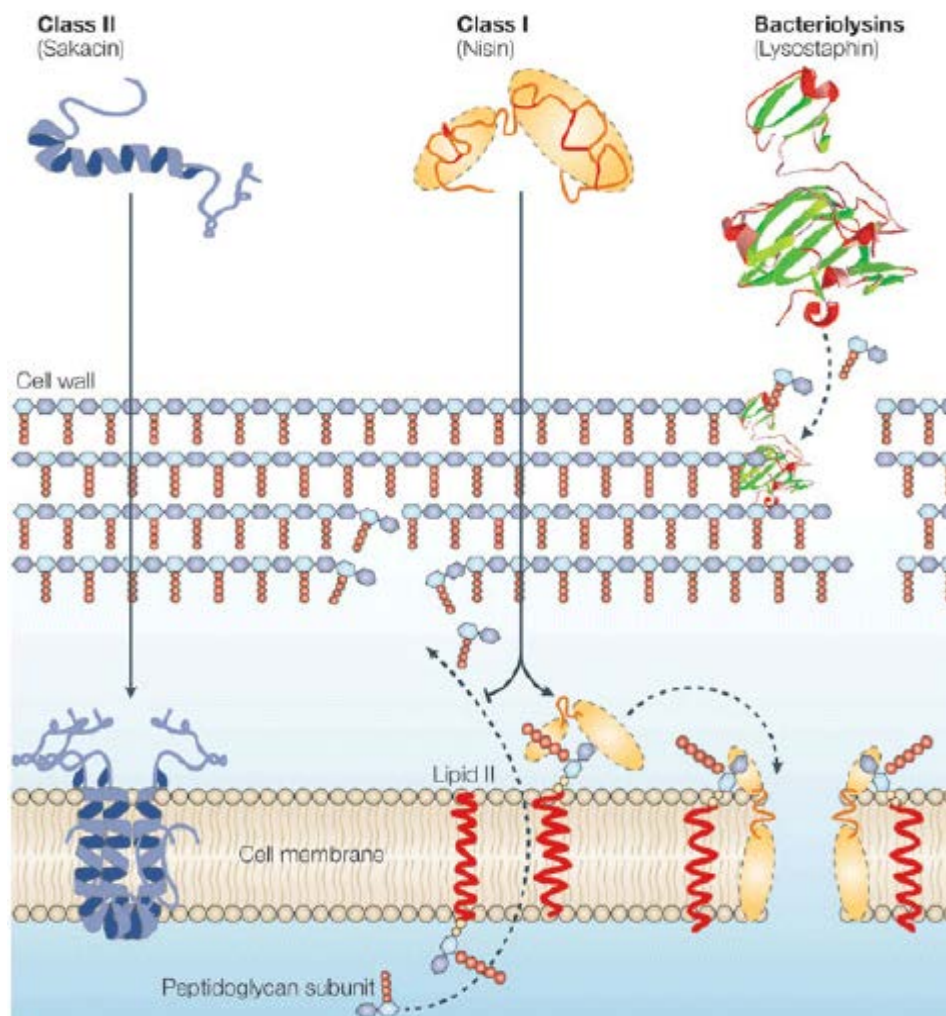


Figure 02: Mode d'action des bactériocines des bactéries lactique (**Cotter et al., 2005**).

II.4. Condition de production

Dans leur lutte pour survivre et se nourrir, les bactéries lactiques produisent de nombreuses substances antimicrobiennes entre-autres les bactériocines, qui servent d'armes permettant aux bactéries lactiques de dominer les microorganismes compétitifs. Ces bactériocines peuvent être dégradées sous l'action des protéases de la souche productrice ou être adsorbées à sa surface (Moll *et al.*, 1999 ; Dortu et Thonart, 2009).

Les conditions optimales pour la croissance peuvent l'être également pour la production de bactériocines. Yang et Ray (1994) et Castro *et al.*, (2011) ont démontré que les conditions conduisant à une forte densité cellulaire favorisent la production de bactériocine par *Lactobacillus sakei*.

Cependant, il a été noté par Verluyten *et al.*, (2004) que des conditions défavorables à la croissance permettent de stimuler la production des bactériocines par *Lactobacillus curvatus*.

La présence des microorganismes compétitifs dans le milieu stimule la production des bactériocines. Tabasco *et al.*, (2009) ont démontré que *Lactobacillus acidophilus* La-5 augmente la production de lactacine B quand cette souche sent la présence de cellules cibles vivantes ; l'utilisation de ces mêmes cellules cibles après chauffage n'avait aucun impact sur cette production. De même une co-culture de *Lactobacillus plantarum* NC8 avec *Enterococcus faecium* augmenté sa production de bactériocine (Ruiz-Barba *et al.*, 2010).

II.5. Optimisation de la production de bactériocine

La production des bactériocines par les bactéries lactiques a été étudiée par de nombreux chercheurs. Il est connu, que la production de bactériocines par les bactéries lactiques, peut être influencée par le pH, la composition du milieu de culture, la température d'incubation, la taille de l'inoculum, la densité cellulaire et d'autres facteurs environnementaux (Eijsink *et al.*, 2002 ; Strompfová et Lauková, 2007). Ces facteurs peuvent influencer fortement la synthèse de la bactériocine. Pour plusieurs bactéries bactériocinogènes, différentes optimisations ont été décrites. Les optimisations mentionnées dans la littérature, peuvent être réalisées selon trois axes :

- Les conditions de stress peuvent stimuler la production de bactériocine.
- L'optimisation de chaque ingrédient du milieu de croissance des bactéries lactiques.

- L'ajout d'un milieu riche dans le milieu de croissance de la bactérie bactériocinogène (notamment, l'ajout du lait).

II.6. Facteur influençant la production

II.6.1. Température et pH :

La température et le pH sont des facteurs importants qu'on doit prendre en considération quand à la production de bactériocines. Celle-ci est généralement optimale à des températures et des pH inférieurs à ceux optimaux pour la croissance (**Héquet et al., 2007 ; Dortu et Thonart, 2009 ; Sharma et al., 2010**).

L'effet de ces deux facteurs a fait l'objet de plusieurs études. Ainsi, la production de bactériocine par *Leuconostoc lactis* était optimale à 30°C et à pH variant de 6.5 – 7 ; néanmoins, elle est diminuée d'une façon remarquable à 37°C et à pH 5.5 et 8.0 (**Dhakur et Roy, 2009**). La production de pédiocine LB-B1 par *Lactobacillus plantarum* LB-B1 était optimale à 37°C et à pH : 6 (**Xie et al., 2011**).

Enterococcus faecium PC4.1 atteint son maximum de production à 30°C et à pH : 6 (**Hadji-Sfaxi et al., 2011**). La production de l'acidocine 8912 par *Lactobacillus acidophilus* était maximisée à 30°C (**Ahmed et al., 2010**).

II.6.2. Composition du milieu de culture :

La composition du milieu de culture en particulier la source et la teneur de carbone et d'azote influence considérablement la production de bactériocines. Vu leurs exigences nutritionnelles, les bactéries lactiques requièrent plusieurs composants tels que : les facteurs de croissance, les peptones, l'extrait de levure, les hydrolysats de protéines et l'extrait de viande. Ces composants ont un impact positif sur le rendement en bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

De nombreux milieux de culture complexes ont été utilisés pour l'isolement des bactéries lactiques bactériocinogènes tels le MRS (**Elmoualdi et al., 2008 ; Khalil et al., 2009 ; Moraes et al., 2010 ; Xie et al., 2011; Abrams et al., 2011 et Castro et al., 2011**), le BHI (**Ammor et al., 2006 ; Ghrairi et al., 2008**), et le M17 (**Hadji-Sfaxi et al., 2011**).

Toutefois, l'Elliker constitue le milieu le plus approprié pour améliorer le rendement des bactériocines (**Thakur et al., 2009**).

Il a été signalé que la production des bactériocines peut être maximisée en fortifiant le milieu de culture par l'ajout d'extrait de levure (**Benkerroum et al., 2000 ; Labiouiet al., 2005 ; Elmoualdi et al., 2008 ; Sarika et al., 2010**).

Todorv et Dicks (2005) ont démontré que le taux de bactériocines ST461BZ et ST462BZ produites par *Lactobacillus rhamnosus* significativement augmenté en ajoutant au milieu le K_2HPO_4 et le KH_2PO_4 respectivement.

II.6.3. Temps d'incubation :

La synthèse des bactériocines prend lieu au cours de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Au delà de cette période une diminution du taux de bactériocines a été observée suite à la digestion de ces dernières par les enzymes protéolytiques libérées par la cellule productrice. De ce fait, plusieurs études ont été réalisées pour optimiser la période d'incubation; **Gong et al., (2010)** ont démontré que la production de la plantaricine MG par *Lactobacillus plantarum* atteint sa valeur maximale après 28H d'incubation. La production maximale de bacALP7 par *P. pentosaceus* est observée après 16H d'incubation et diminue de près de la moitié après 21H (**Pinto et al., 2009**).

II.7. L'intérêt des bactériocines

Considérées en tant que « GRAS » (Generally Recognized As Safe) et vu leur abondance et leur pouvoir antimicrobien généralement bactéricide, les bactériocines des bactéries lactiques trouvent leur utilisation dans différents domaines où elles empêchent le développement de bactéries pathogènes et nuisibles (**Albano et al., 2007**).

II.7.1. Dans le secteur alimentaire :

L'utilisation des bactériocines dans les produits alimentaires a connu une forte progression. Du fait que ces substances sont naturelles, sûres (non toxiques pour les cellules eucaryotes et facilement digestibles dans le tractus intestinal), tolérantes aux traitements thermiques et aux variations du pH et agissant à des faibles concentrations, leur application conduit à une prolongation de la durée de conservation des produits alimentaires (**Gautam et Sharma, 2009**).

Ces molécules bioactives sont incorporées dans les aliments soit directement sous forme purifiée ou semi-purifiée (nisine) ou sous forme de concentré (pédiocine) soit indirectement en appliquant la souche productrice dans le produit alimentaire (production *insitu*), comme elles

peuvent être immobilisées par encapsulation ou adsorption. A l'heure actuelle, seule la nisine est acceptée comme additif (**Ghali et al., 2006 ; Dortu et Thonart, 2009**).

Benkerroum et al., (2000) ont démontré la capacité des bactériocines produites par *Lactococcus lactis* de diminuer le nombre de *Listeria monocytogenes* ajoutée expérimentalement au Jben Marocain. Après contamination du Jben avec 10^7 et 10^4 UFC.ml⁻¹, il a été constaté que la bactériocine entraîne une réduction du nombre de contaminants de 2.7 log après 30H dans le premier cas et l'a complètement éliminé après 24H dans le deuxième.

La nisine produite par *Lactococcus lactis* est utilisée dans la production des fromages pour prévenir la fermentation de l'acide lactique en acide butyrique par le genre *Clostridium*, ce qui affecte la saveur et la texture des produits. La nisine est aussi capable d'inhiber les genres : *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria* et *Clostridium* en particulier *Clostridium tyrobutyricum* responsable de la production de gaz dans les fromages semi solides (**Walstra et al., 2006**). Cette bactériocine est utilisée également dans la fabrication des : fromages pasteurisés, produits liquides à base d'oeuf, sauces, laits frais, bières et conserves (**Glazer et Nikaido, 2007**).

Etant un milieu riche, la viande est sujette à des contaminations par les microorganismes pathogènes et altérants tels que *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta* et *Clostridium estertheticum* (**Jones et al., 2008**). **Héquet et al., (2007)** ont démontré que la sakacine G produite par *Lactobacillus sakeia* diminué le nombre de *Listeria innocua* de 3 log à moins de 1 log dans les jambons cuits conservés à 4°C.

Ben Hammou et al., (2010) ont réussi à appliquer la nisine en combinaison avec le NaCl pour contrôler le développement de *Listeria monocytogenes* dans les saucisses du mouton.

Albano et al., (2009) ont utilisé *Pediococcus acidilactici* productrice de la bactériocine PA 1 pour inhiber un cocktail de souches de *Listeria innocua* dans les saucisses à base de viande fermentée, ceci ayant permis une réduction remarquable de ces souches.

Pinto et al., (2009) ont mis en évidence la capacité des bactériocines bacALP7 et bacALP57 produites par *Enterococcus faecium* et *Pediococcus pentosaceus* de réduire le taux de *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* dans les fruits de mer.

II.7.2. Dans le secteur sanitaire :

L'usage des bactériocines n'est pas restreint au domaine alimentaire. Celles-ci servent aussi comme agents de thérapie naturelle alternatifs aux antibiotiques (**Smaoui, 2010**). Suite à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance manifesté par plusieurs bactéries pathogènes (parmi lesquelles certaines sont résistantes à plusieurs antibiotiques à la fois) qui menace la

santé publique, les études sont actuellement orientées vers la recherche de nouvelles substances antibiotiques naturelles pouvant résoudre ce problème (Mkrtchyan et al., 2010).

Les bactériocines de la classe IIa présentent un groupe important de peptides antimicrobiens qui peuvent être utilisés en médecine avec les antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses ou comme des agents antiviraux. Ces molécules ont une activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif nuisibles et pathogènes comme *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (Dridier et al., 2006).

Xie et al., (2011) ont rapporté que le Koumiss (produit chinois à base de lait fermenté) est efficace dans le traitement de la tuberculose et des maladies cardiovasculaires et contribue à l'amélioration de l'immunité, et que ces propriétés sont attribuées aux bactériocines produites par les bactéries lactiques indigènes. Dembélé et al., (1998) ont démontré que les bactériocines produites par le genre *Lactobacillus* contribuent à la protection du vagin contre différentes bactéries pathogènes telles : *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*.

Tong et al., (2010) ont démontré que la nisine participe dans la prévention et le traitement des caries dentaires en inhibant les microorganismes en cause. La nisine est aussi utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vu sa stabilité aux pH acides et son activité contre *Helicobacter pylori*. Les bactériocines LA-1, YIT9029 et DCE471 produites par *Lb. johnsonii*, *Lb. casei* et *Lb. amylovorus* respectivement manifestent également une activité inhibitrice contre *Helicobacter pylori* (Smaoui, 2010). Des études récentes ont découvert le rôle des bactériocines produites par *Lactobacillus salivarius* dans la réduction de colonisation du caecal des volailles par *Campylobacter* (Nazef et al., 2008).

II.8. 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 de protéase, l'interaction avec des additifs alimentaire 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 la bactériocines bien que la majorité d'entre elles soient résistantes à la chaleur (**Dortu et Thonart, 2009, Gálver et al., 2007**).

Le dernier facteur limitant l'activité des bactériocines est la présence de bactérie 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 élevée (**Schobitz 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 entraine un déséquilibre qui peut conduire à la croissance et la prolifération de microorganismes pathogènes résistantes aux bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel et Méthodes :

❖ Lieu de travail :

Notre stage a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie, de l'université Abd El Hamid Ibn Badis Mostaganem.

I.1. Matériel biologique :

- **Bactéries lactiques :**

Un nombre de 04 souches de bactéries lactiques bactériocinogènes ont été utilisées au cours de ce travail, isolés à partir du Lait de vache au laboratoire de recherche Microbiologie et Biologie végétale (LMBV), Mostaganem.

- **Bactéries pathogènes :**

03 souches pathogènes ont été utilisées dans cette étude : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25921 et *Proteus mirabilis* ATCC 35659 provenant de l'institut Pasteur d'Alger.

I.2 Milieux de culture :

Le milieu de culture utilisé pour toutes les souches lors de la réalisation de cette étude est le milieu MRS liquide et solide additionné d'agar agar (**Man, Rogosa et Sharpe, 1960**).

Pour ce qui est de l'effet antibactérien, nécessitant l'utilisation des souches pathogènes ultérieurement, le milieu utilisé est la gélose nutritive semi-solide.

La composition des milieux de cultures sont présentées en annexe.

II. Méthodes :

II.1 Repiquage, revivification et vérification de la pureté des souches et leur appartenanace au groupe lactique :

Les souches conservées dans du glycérol à -20°C sont décongelées et repiquées plusieurs fois dans leurs milieu sélectif d'enrichissement MRS liquide puis incubées pendant 24 à 48h à 37°C .

La méthode utilisées pour examiner la pureté des souches consiste à :

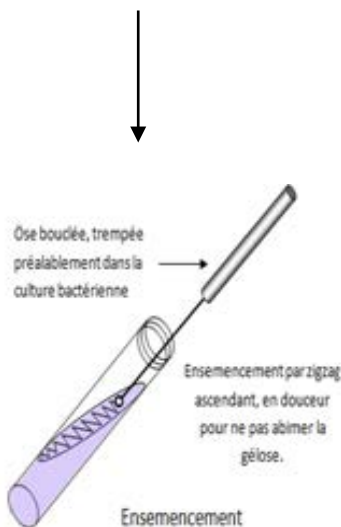
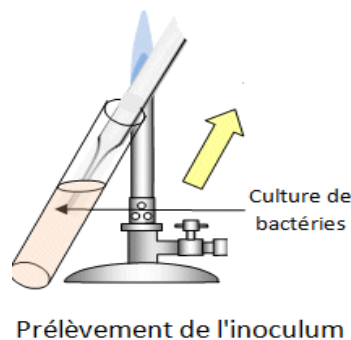
Après repiquage, ensemençer 1ml en surface sur gélose MRS avec la méthode d'épuisement de charge (méthode des quadrants) et incubé 24 h à 30°C .

La pureté des souches est confirmée par des examens macroscopiques et microscopiques.

II.2 Conservation des souches :

- **Conservation à courte durée**

Elle consiste par ensemençement des souches isolées sur gélose MRS inclinée en tubes à essais, les cultures pures sont conservées à $+4^{\circ}\text{C}$ à l'obscurité et un repiquage est nécessaire toutes les quatre semaines (**Badis et al., 2003**).



Incubation a $30^{\circ}/24\text{h}$



Conservation à 4°C/4semaines.

Figure 03: Schéma de conservation à courte durée des bactéries lactiques purifiées (Badis *et al.*, 2003).

- **Conservation à longue durée**

Elle se fait par ensemencement des souches dans des eppendorfs, les cultures lactiques jeunes à raison de 70% additionné de 30% de glycérol et on les place dans le congélateur à -20°C (Badis *et al.*, 2003).



Culture de 18h bouillon MRS



Culture lactique à raison de 70% +30% de glycérol dans des tubes
d•Eppendorfs.



Conservation à -20°C.

Figure 04: Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées (Badis *et al.*, 2005)

II.3 Orientation de l'identification et confirmation des bactéries lactiques :

L'identification a été établie selon le schéma de **Carr et al., 2002**, en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : production d'enzymes, température de croissance, production de gaz carbonique, fermentation des sucres (**Figure 5**).

II.3.1 Tests morphologiques :

A. L'aspect macroscopique :

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS solide et liquide ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies sur milieu solide et le trouble dans le milieu liquide (**Badis et al., 2005**).

B- L'aspect microscopique :

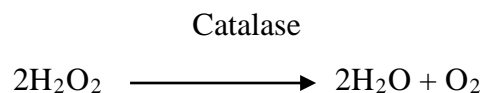
❖ Coloration de Gram :

Une colonie a été prélevée à partir d'une culture sur boîte et étalée sur une lame de verre. La lame a ensuite été séchée à l'air libre, passée à la flamme afin de fixer l'échantillon. Après fixation, la lame a été posée sur un porte-objet et colorée avec le violet cristallisé pendant 1 min avant d'être rincée rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de Lugol, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors la lame coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique : la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 2 à 3 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. A ce stade les cellules Gram- seront incolores, les cellules Gram+ seront violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la Fushine pour colorer les cellules Gram- présentes. Après un bref rinçage, le frottis est séché et examiné à l'objectif à immersion (grossissement X 1000) (**Singleton, 1999**). Avec cette coloration double, les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge (**Delarras, 2007**).

II.3.2 Tests physiologiques et biochimiques :

❖ Test catalase :

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase -) des entérobactéries (catalase +). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O_2) (**Marchal et al., 1991**).

❖ Type fermentaire :

Dans des tubes à essai contenant des cloches de Durham, on verse un milieu MRS liquide pour mettre en évidence la production de gaz. Ensuite on ensemence les souches.

Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO_2 par contre les souches hétérofermentaires vont produire l'acide lactique et le CO_2 a proportions égales (**Carr et al., 2002**).

❖ La Thermorésistance :

Des tubes contenant 10 ml de MRS liquide sont inoculés par les souches isolées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à $60^\circ C$ pendant 30 min, après refroidissement, elles sont incubées à $37^\circ C$ pendant 24 à 48 heure. Un résultat positif se traduit par un trouble (**Badis et al., 2005**).

❖ Effet de NaCl, du pH et de la température :

Trois milieux de MRS liquides ont été utilisés contenant différentes concentrations de NaCl : 4% de NaCl (4 g de NaCl par 100 ml de milieu) et 6,5%, avec un pH de 6.5 et un témoin sans NaCl. Les tubes sont ensemencés par les souches lactiques et incubés à $37^\circ C$ pendant 24 à 48 heures.

- Une autre série d'essais a été réalisée sur le milieu MRS liquide avec un pH de 9. Les tubes sont ensemencés par les souches lactiques et incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures.
- L'autre série a été réalisée sur le milieu MRS liquide avec incubation à 15°C et à 45°C pendant 24 à 48 heures.

Les résultats positifs se traduisent par un trouble (**Badis et al., 2005**).

❖ **Croissance sur lait bleu de Sherman :**

Une série de tubes à essais contenant du lait écrémé à 0,1% et 0,3% de bleu de méthylène est ensemencée par des cultures pures et incubée 24 à 48 h à 30°C. Seules certaines espèces appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* sont capables de se développer sur ce milieu. On note que les observations sont relatives à la réduction de bleu de méthylène et la coagulation du lait (**Guiraud, 1998**).

❖ **Hydrolyse de l'arginine (ADH) :**

Elle est mise en évidence sur un milieu de Moeller (**Moeller, 1955 ; Harrigan et McCance, 1976**), pour chaque souche isolée ensemencé ; un tube de bouillon Moeller arginine et un tube témoin (Moeller sans arginine) recouvrir le milieu avec 4 à 5 mm d'huile de paraffine (V/V) stérilisé. Après 2 à 6 jours d'incubation à 30°C la culture dans le tube témoin se manifeste par un virage au jaune du à l'acidification du milieu (métabolisme du glucose) (**Larpent-Gourgaud et al., Carr et al., 2002**). La dégradation de l'arginine aboutissant à la formation d'ammoniaque est révélée par alcalinisation du milieu qui devient violet.

❖ **Fermentation des sucres :**

La fermentation de 12 sucres a été testée : Mannitol, Saccharose, Lévulose, Galactose, Xylose, Maltose, Fructose, Lactose, Glucose, Amidon, Glycérol, Adonitol, Mannose pour l'ensemble des souches, afin de les identifier. Le milieu de base utilisé est le bouillon MRS (sans le glucose et l'extrait de viande) additionnée de pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH (MRS-BCP) (**Mannu et al., 2000**).

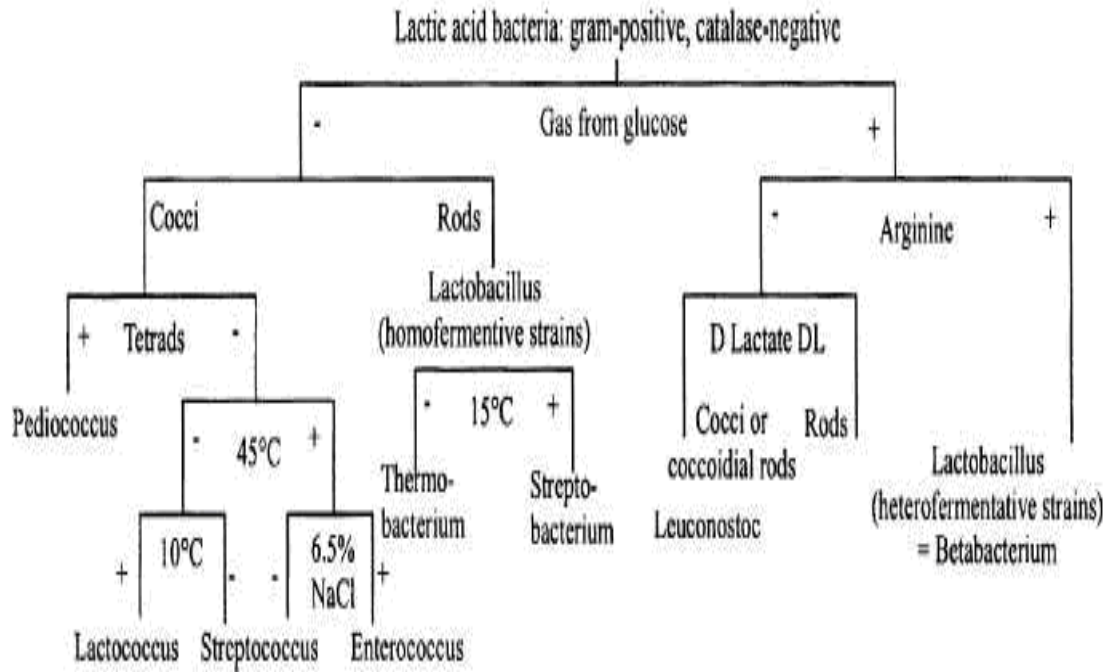


Figure 05 : Schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques (Carr *et al.*, 2002).

III. Cinétique de croissance :

La cinétique des souches lactiques, nous permet de tracer la courbe de croissance, et par conséquent nous renseigner sur le moment de sécrétion des bactériocines (Kouakou et Thonart, 2011).

Un volume (v/v) A partir d'une préculture lactique réalisée sur milieu MRS à 37°C pendant 18h, a été prélevé puis cultivé dans 30 ml du milieu précédemment cité.

Le suivi de la croissance et production de bactériocines par la culture lactique productrice est réalisé par la mesure de la DO, et ce par prélèvements réguliers chaque deux heures (Karmen et Bogovi, 2003).

IV. Optimisation du milieu de culture

Le but de notre travail est d'apporter des modifications au milieu MRS afin d'obtenir un milieu optimal pour la production de bactériocines.

L'optimisation a été réalisée essentiellement sur le milieu MRS, en modifiant les différentes sources le composant à savoir la source d'azote, de carbone et de potassium dans un premier temps puis voir l'effet d'autres paramètres tel que la température sur la croissance de ces souches. La cinétique des souches lactiques a été étudiée en parallèle pour déterminer la phase dans laquelle les bactériocines sont secrétées, l'évaluation de l'effet antimicrobien est réalisée pour chaque optimisation.

IV.1 Source d'azote :

Afin de vérifier la source d'azote approprié, le milieu MRS a été supplémenté de :

- 2.5g.L⁻¹ d'extrait de levure
- 2.5g.L⁻¹ d'extrait de viande
- 2.5g.L⁻¹ de tryptone

IV.2 Source de carbone :

Le milieu MRS modifié retenu de la précédente étape a été sujet d'étude de la source de carbone, dans ce cas le MRS_m a été remplacé par une panoplie de sucres au lieu du glucose :

- 20g.L⁻¹ de lactose
- 20g.L⁻¹ de fructose
- 20g.L⁻¹ de saccharose

IV.3 Source de potassium :

Après avoir sélectionné les sources d'azote et carbone appropriées, une modification de la source de Potassium du milieu MRS_m a été apportée comme suite :

- 2g.L⁻¹ de KH₂PO₄
- 1g.L⁻¹ de K₂HPO₄ + 1g.L⁻¹ de KH₂PO₄

IV.4 Effet de la température d'incubation et pH:

La production de bactériocine est également influencée par la température d'incubation ainsi que le pH (**Krier et al., 1998**). Le milieu optimisé ayant été constitué est utilisé pour l'étude de ce paramètre.

10 ml du milieu MRS optimisé, sontensemencés avec une préculture préalablement préparé, puis incubé à 30°C et 37°C à pH 7 (Todorov et al., 2007).

V. Mise en évidence de l'activité antagoniste :

La recherche de substances inhibitrices secrétées par les bactéries lactiques est réalisée par l'activité antagoniste de ces souches lactiques afin de mettre en évidence cette activité antibactérienne par la méthode des puits.

V.1 Préparation des précultures des bactéries pathogènes (tests) :

Les bactéries pathogènes sont cultivées dans 10 ml de bouillon BN à 37°C pendant 24h.

Un repiquage sur boîtes de pétri dans les milieux spécifiques de chaque bactérie est réalisé :

- *E.coli* sur milieu Mac Conkey ;
- *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman ;
- *Proteus mirabilis* sur milieu GN.

Le tout est incubé à 37°C pendant 24h.

Après obtention de colonies pures, les bactéries pathogènes sont cultivées dans 10 ml de bouillon BN à 37°C pendant 18h à 24h.

V.2 Préparation des précultures des bactéries lactiques :

Des colonies pures de bactéries lactiques sontensemencées dans des tubes à essai contenant du MRS liquide ainsi que le MRS modifié à chaque optimisation, le tout incubés à 37°C pendant 16-22h.

V.3 La mise en évidence des inhibitions :

Il existe plusieurs méthodes pour la détection de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques, parmi elles :

- **Méthode de Tagg et Mc Given (1971) - Méthode des puits AWDA -**

Les souches lactiques sont cultivées en milieu MRS liquides, tandis que les souches pathogènes sont cultivées dans le bouillon nutritif, puis incubées pendant 18h à 37°C.

Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte – pièce sur la surface de la gélose nutritive inoculé préalablement par écouvillonnage avec les pathogènes et remplis avec 100 µl de culture lactique. Les boîtes prêtes sont incubées à une températures de +4 C° pendant 4h afin de permettre une bonne diffusion de la substance (**Doumandji et al., 2010**).

Ensuite, Les boîtes sont portées à incubation à 37 C° pendant 24h, un résultat positif se traduit par la présence de zones d'inhibition formées autour des puits (**Hwanhlem et al., 2011**).

- **Méthode d'antagonisme différé**

Après la préparation de la préculture lactique, cette dernière est centrifugé à 6000 rpm / 20 min afin d'obtenir le surnageant Des puits sont creusés à la surface de la gélose nutritive, puis remplis de 100 µl de surnageant, Les boîtes prêtes sont par la suite incubées à une température de +4 C° pendant 4h afin de permettre une bonne diffusion de la substance.

Les pathogènes sont inoculés en milieu gélose nutritive semi solide, la couche est versée sur la surface des puits remplis après diffusion à 4°C. Après solidification, les boîtes sont porté à incubation à 37°C / 18 h. Un résultat positif se traduit par la formation de zones d'inhibition autour des puits (**Sabia et al., 2014**).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats et discussion

I.1. Confirmation de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique :

Lors de cette étude la confirmation de l'identité des souches est faite par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques (Carr *et al.*, 2002).

I.1.1. Etude morphologique :

➤ Test macroscopique

L'observation macroscopique du développement des bactéries lactiques dans le milieu MRS liquide est présentée sous forme de trouble homogène dense. (Figure 6)

Quant au milieu MRS solide, les souches ont donné des colonies lenticulaires parfois circulaires, de petites tailles à moyennes d'environ 1mm de diamètre, blanchâtres ou laiteuses, avec un pourtour régulier et lisse. (Figure 7)

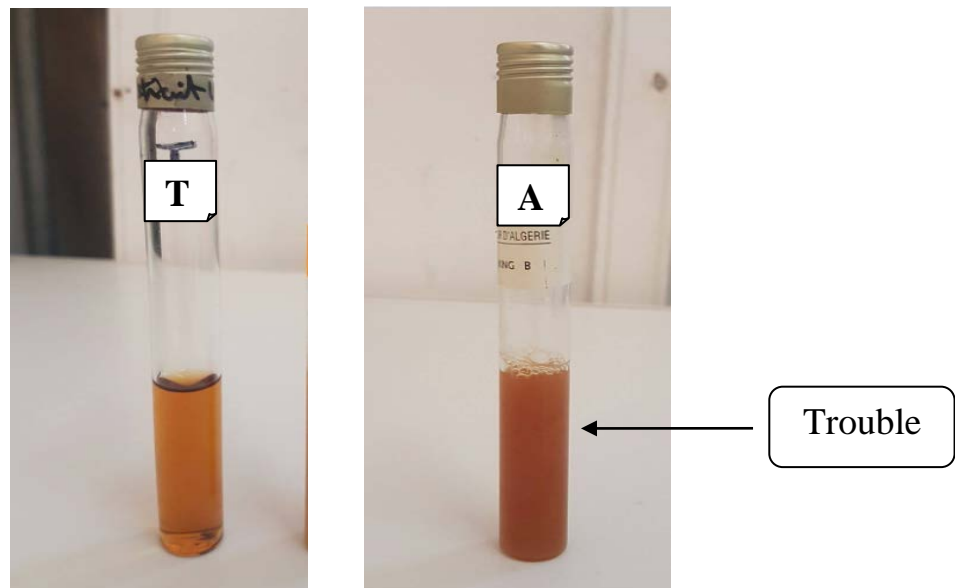


Figure 06: Aspect des souches lactiques pures en milieu MRS liquide

T : Témoin **A :** Culture microbienne

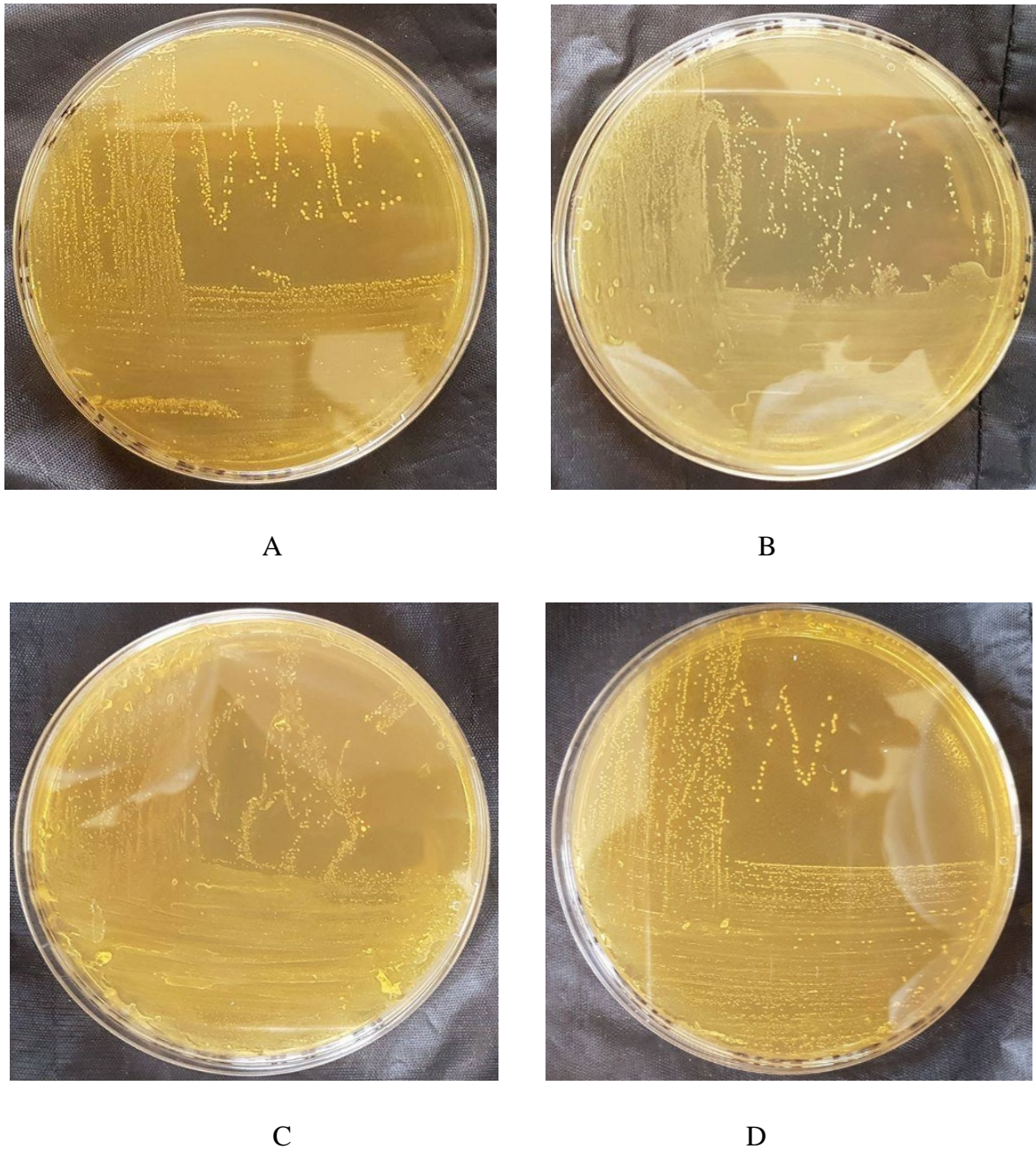


Figure 07 : Aspect macroscopique des souches lactiques en milieu MRS solide.

A : LCM 103, **B :** MVM 22, **C :** MGM 85, **D :** LCM 17.

➤ **Test microscopique**

L'observation microscopique a montré que toutes les souches sont Gram positif, se présentent sous forme de coques disposés en diplocoques et en chainettes et leurs aspects microscopiques sont notés dans le tableau. **(Figure 8)**

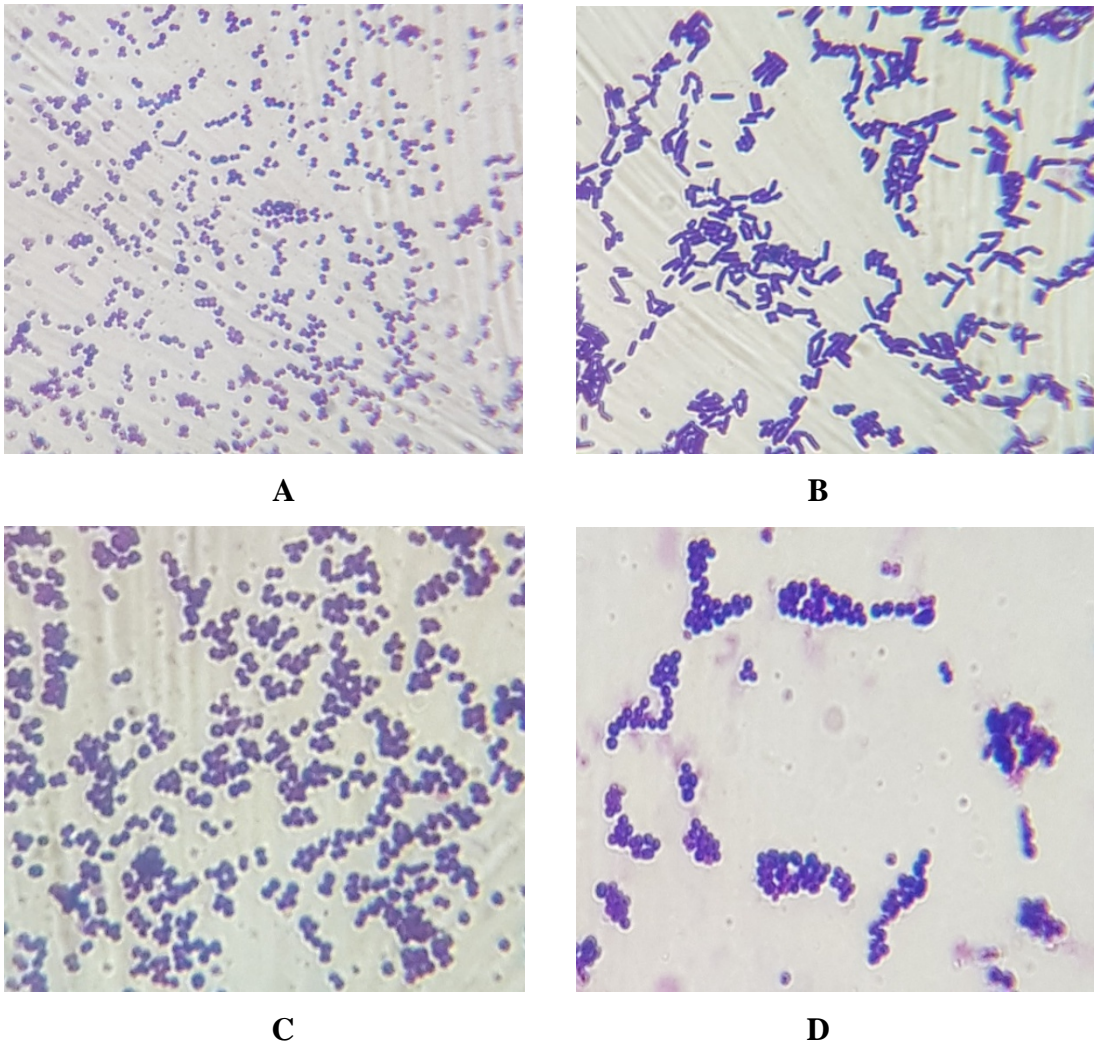


Figure 08 : Observations microscopiques des bactéries lactiques après une coloration de Gram avec un grossissement (G : x100)

A : LCM 103, **B** : MVM 22, **C** : MGM 85, **D** : LCM 17.

Tableau I : Résultats de l'étude morphologique

	LCM 103	MVM 22	MGM 85	LCM 17
Coloration de Gram	Gram positif	Gram positif	Gram positif	Gram positif
Aspect microscopique	Cocci	En chaînette	Diplocoques	Diplocoques, coques en tétrade

I.1.2. Tests physiologiques et biochimiques

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques sont résumés dans le tableau II.

➤ Test de la catalase

Les bactéries lactiques ne possèdent pas l'activité catalasique (absence de dégagement gazeux (O₂)) elles sont dites catalase négatives.

Les bactéries LCM 103, MVM 22, MGM 85 et LCM 17 répondent bien aux caractéristiques des bactéries lactiques comme le montre la **figure 9**.



Figure 09 : Résultat de test de la catalase

➤ **Le type fermentaire**

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la formation de CO₂ qui est piégé dans une cloche de Durham en milieu MRS glucosé. Ce test permet de différencier les souches homolactiques des hétérolactiques après une incubation à 37°C pendant 24 heures.

Pour ce qui est de nos souches, aucune production de gaz (CO₂) à partir du glucose n'a été observée, ainsi, elles sont considérées comme homofermentaires. (**Figure 10**)

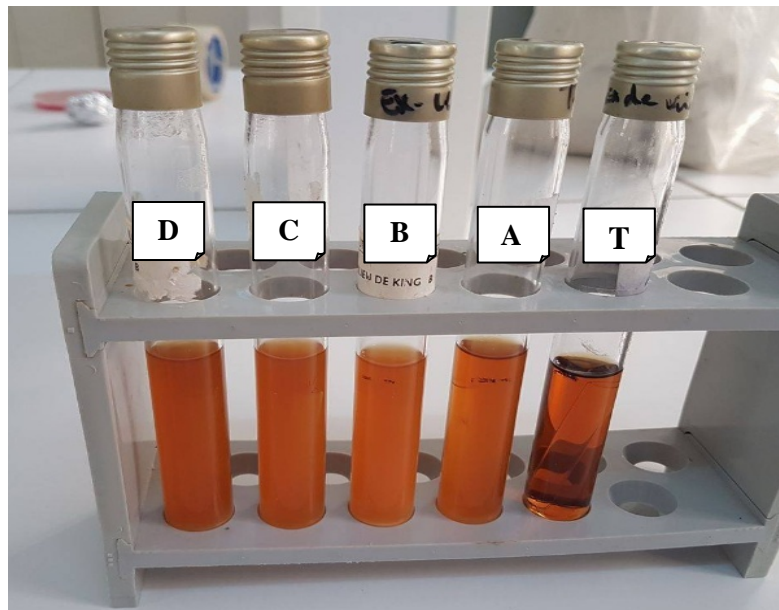


Figure 10: Résultats obtenus pour le type fermentaire sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de durham

T : tube témoin, **A** : LCM 103, **B** : MVM 22, **C** : MGM 85, **D** : LCM 17.

➤ **Tests de Température, pH, NaCl, Thermorésistance**

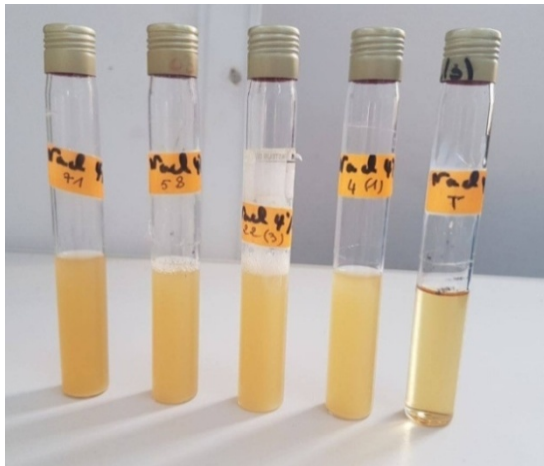
Les testes effectuées ont montré que :

Les quatre souches sont capables de croître sur le bouillon MRS avec des concentrations de 4 et 6,5% de NaCl, se traduisant par l'apparition d'un trouble. (**Figure 11 (a) et figure 11 (b)**).

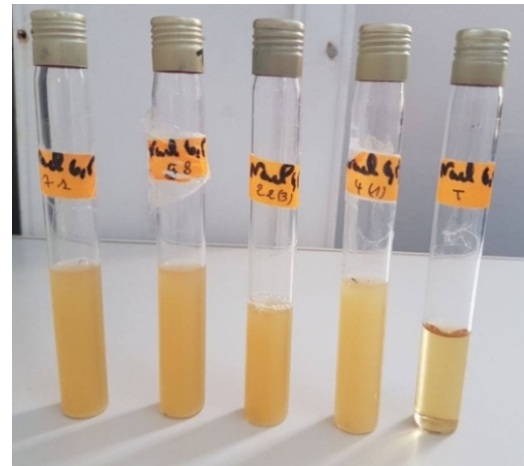
Une croissance des quatre souches a été notée sur le milieu MRS à pH= 9. (**Figure 11 (c)**).

Les souches LCM 103, MVM 22, MGM 85 et LCM 17 sont thermorésistantes, où une croissance sur bouillon MRS est observée après un traitement thermique pendant 30 minutes à 60°C. (**Figure 11 (d)**).

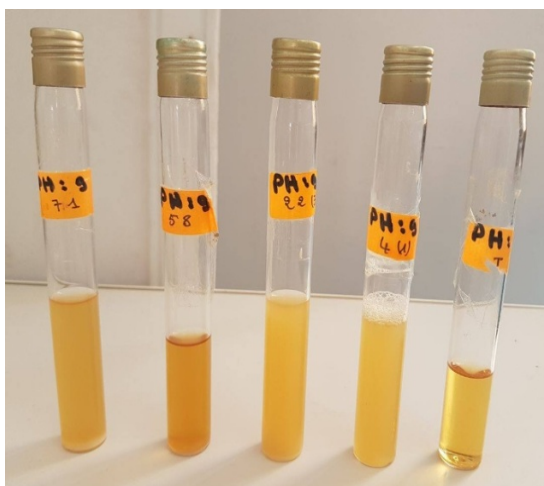
Après 7 jours d'incubation à 15°C, une croissance des quatre souches a été observée, ainsi qu'à 45°C, une croissance est obtenue chez toutes les bactéries. (**Figure 11 (e) et figure 11 (f)**).



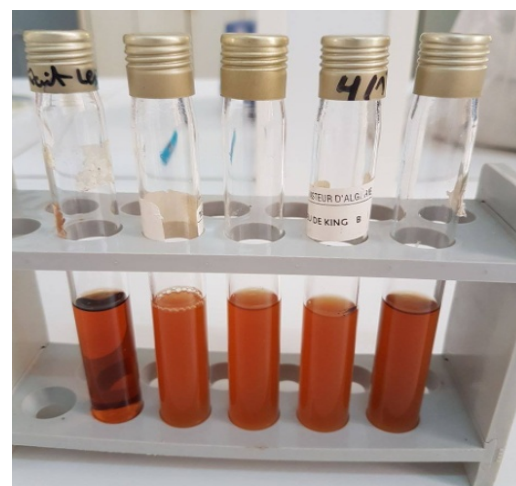
a



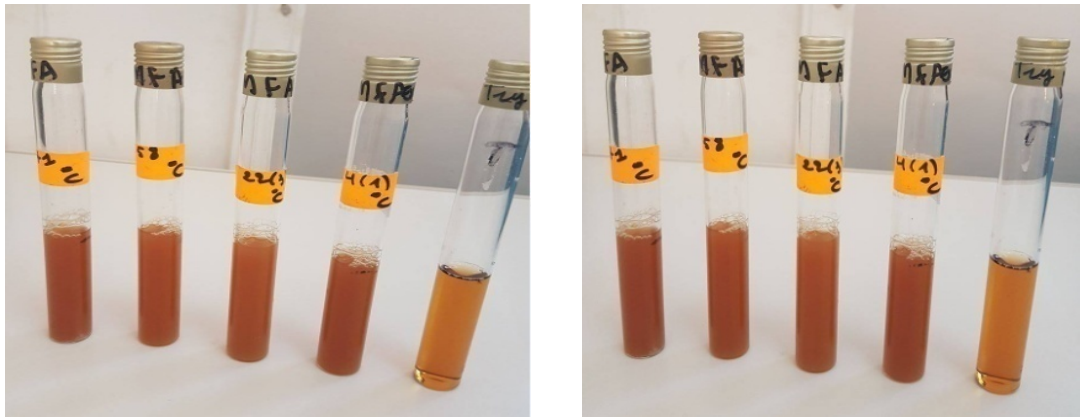
b



c



d



e

f

Figure 11 : Résultats obtenus pour les tests de température, pH, NaCl, thermorésistance.

➤ **Croissance sur lait bleu de Sherman**

Toutes les souches ont exprimé un résultat négatif et n'ont par conséquent pas pu réduire le bleu de méthylène dans le milieu, et ce aux concentrations de 1% et 3%. Donc aucune croissance n'a été observée. (**Figure 12**)

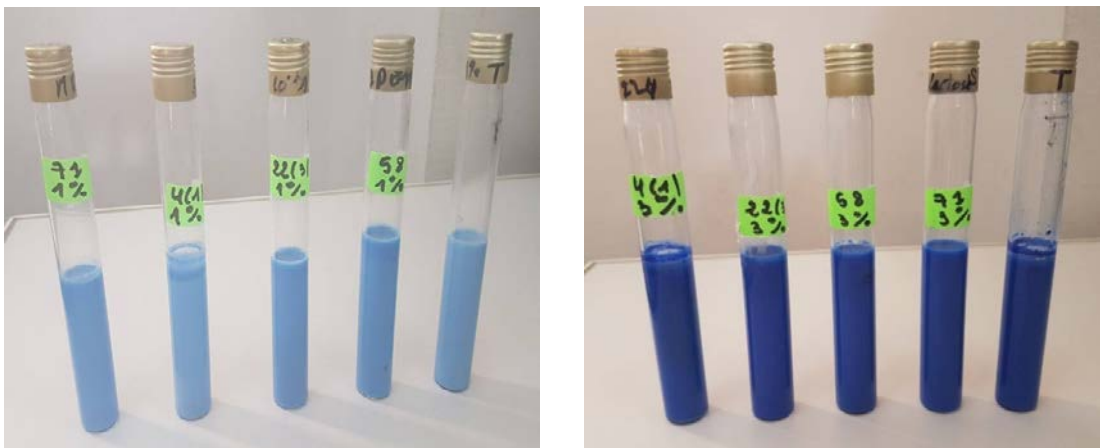


Figure 12 : Résultats du test de lait de Sherman.

➤ **Test ADH**

Parmi les souches étudiées, LCM 103, MVM 22 et MGM 85 sont ADH négative ce qui signifie qu'ils n'ont pas la capacité d'hydrolyser l'arginine, car elles ne possèdent pas l'ADH (arginine déshydrogénase), tandis que la souche LCM 17, elle est ADH positive donc elle est capable d'utiliser l'arginine. (**Figure 13**)

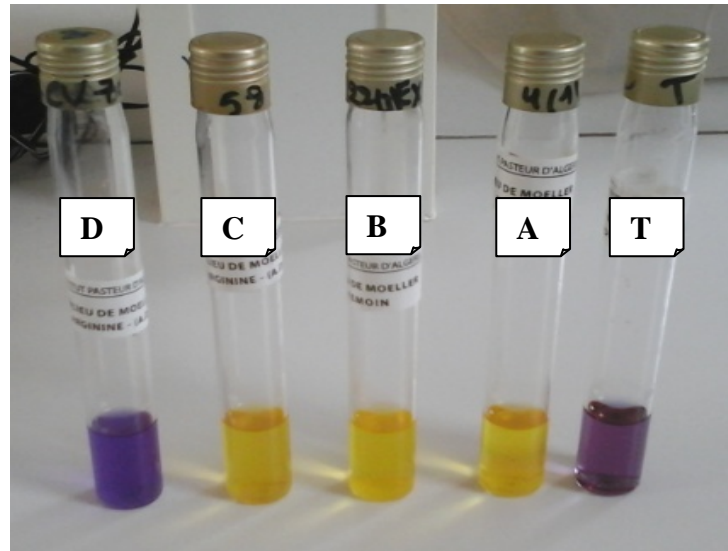


Figure 13 : Résultats du test ADH.

T : tube témoin, **A** : LCM 103, **B** : MVM 22, **C** : MGM 85, **D** : LCM 17.

Le tableau II montre les résultats qui ont permis l'identification du genre.

	Catalase	NaCl		Température		pH	Bleu de Sherman		Thermorésistance	ADH
		4 %	6,5 %	15°C	45°C		1%	3%		
LCM 103	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
MVM 22	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
MGM 85	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
LCM 17	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+

+ : croissance ; - : pas de croissance.

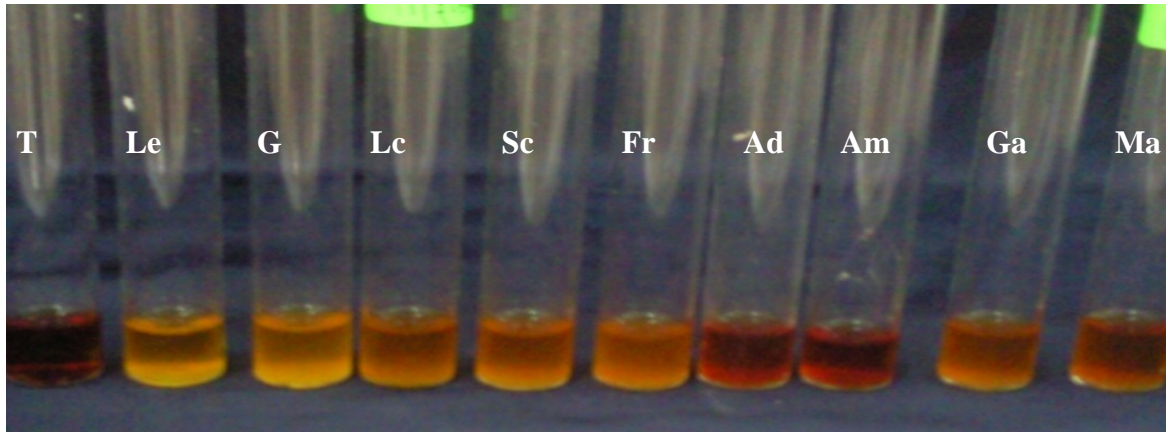
➤ Fermentation des sucres

Tableau III : profil fermentaire des sucres obtenu avec les souches étudiées.

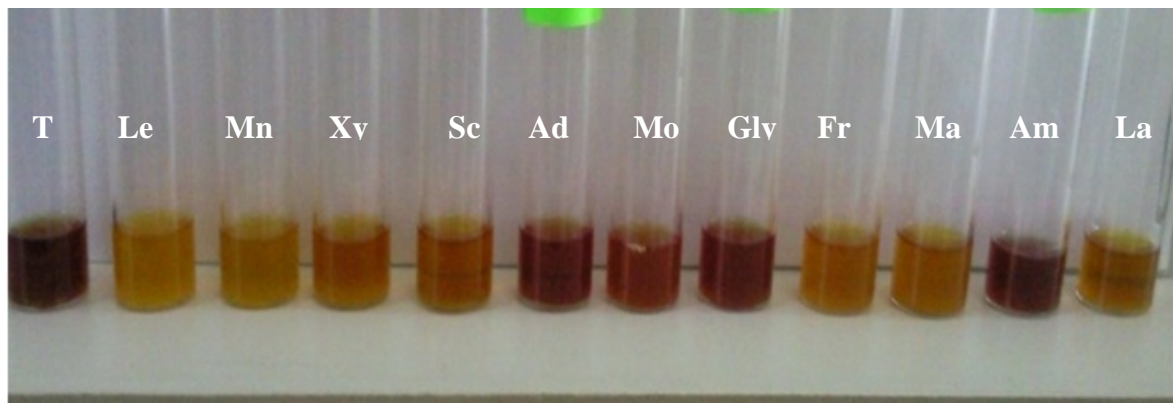
Souches Sucres	LCM 103	MVM 22	MGM 85	LCM 17
Mannitol	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+
Lévulose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
Amidon	-	-	-	-
Glycérol	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-
Mannose	+	+	+	+

+ : croissance positive, - : Absence de croissance

Ces résultats montrent que toutes les souches fermentent presque tous les sucres utilisés. (**Figure 14.A** et **figure 14.B**)



A



B

Figure 14 : Résultat de la fermentation du sucre par les souches LCM 103, MVM 22, MGM 85 et LCM 17.

T : Témoin, **Le** : lévulose, **Mn** : Mannitol, **Xy** : Xylose, **Sc** : Saccharose, **Ad** : Adonitol, **Mo** : Monose, **Gl** : Glycérol, **Fr** : Fructose, **Ma** : Maltose, **Am** : Amidon, **La** : Lactose, **Ga** : Galactose, **G** : Glucose

L'identification des souches est basée sur les profils des souches de référence selon les travaux de : **Leveau et al., 1991 ;Larpent, J-P, 1996 ;Bjokroth J. et Holzapfel W., 2006 ; Devoyod J.J. et Poullain F ., 1988 ; Teuber M. Geis A.,2006 ; Hammes W.P. et Hertel C.,2006.**

A partir des résultats ci-dessus, et selon le schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques (Carr *et al.*, 2002), on peut conclure que nos souches bactériennes sont : *Enterococcus sp*

I.2. Cinétique de croissance et la production de la bactériocine :

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance (Kouakou et Thonart, 2011). Vu qu'elles peuvent par la suite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture (Savijoki *et al.*, 2006). C'est pourquoi elle nécessite la connaissance de la cinétique de croissance.

Dans cette étude, nous avons bien évidemment utilisé le milieu MRS comme témoin afin de nous situer par rapport aux modifications ultérieures. (Figure 15)

Généralement, on remarque 3 à 4 phases selon les milieux :

- Phase de latence : de 0 à 2 heures d'incubation, est observé pour toutes les souches lactiques.
- Phase exponentielle : elle est atteinte après 2h d'incubation pour toutes les souches et est achevée à 16h pour la souche MVM 22, à 18h pour LCM 103 et MGM 85 et à 20h pour LCM 17.
- Phase stationnaire : cette phase débute à 16h pour la souche MVM 22, à 18h pour LCM 103 et MGM 85 et à 20h pour LCM 17.

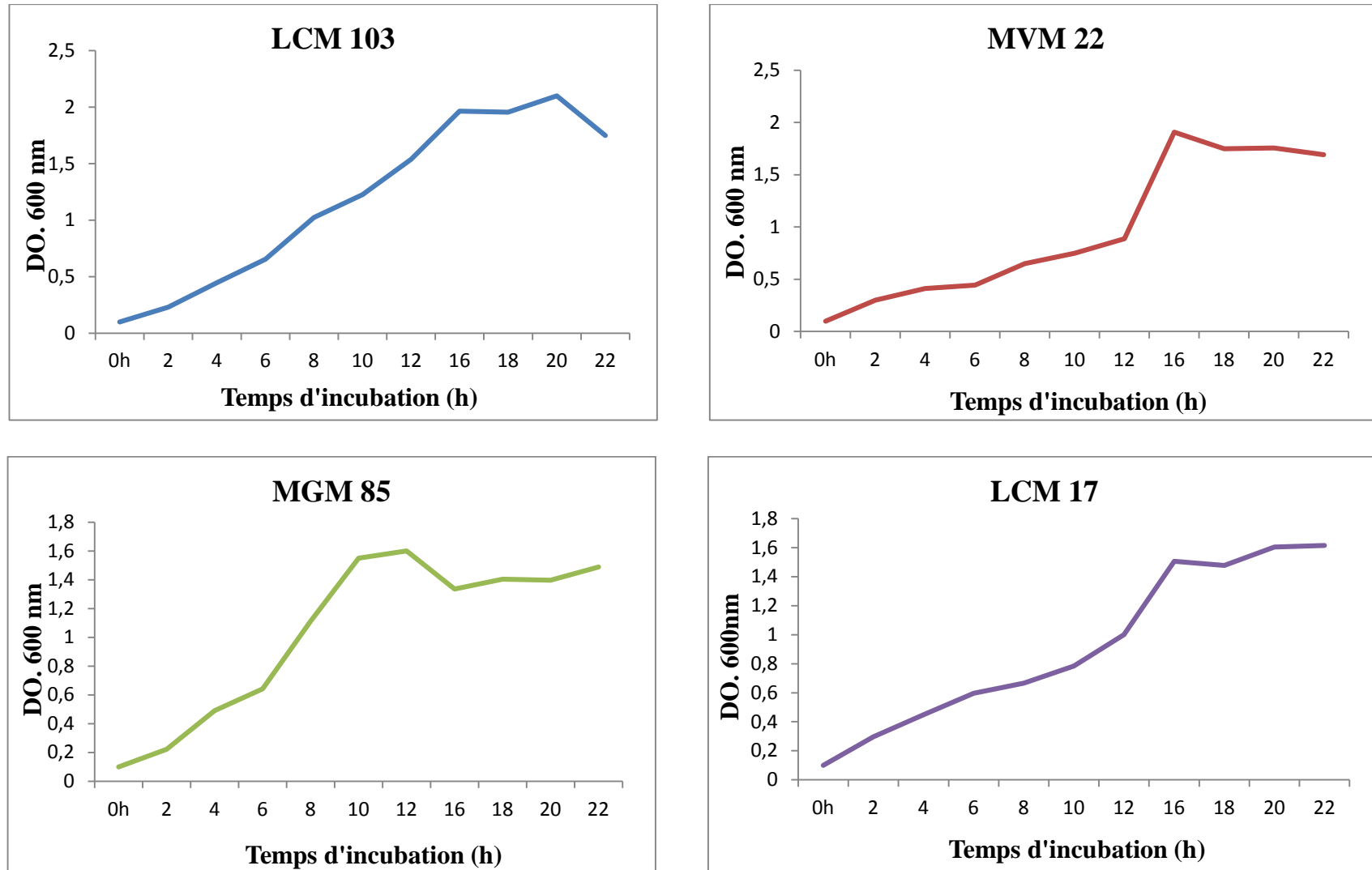


Figure 15: Les courbes de croissance des souches lactiques cultivées dans le milieu MRS.

I.3. Optimisation du milieu de culture :

Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, le temps d'incubation, la température, le pH et la composition du milieu.

I.3.1 Effet de la composition du MRS sur la croissance bactérienne et la production de bactériocine :

- Effet de la source d'azote

Dans ce test, les cultures des bactéries bactériocinogènes ont été réalisées dans du MRS dont la source d'azote a été modifiée à savoir l'extrait de levure, l'extrait de viande et le tryptone, à raison de 2.5%. Le milieu MRS est utilisé comme témoin. Dans chaque cas la croissance de la souche et son effet inhibiteur ont été évalués.

Un aspect des résultats obtenu est montré dans la **figure 16**.

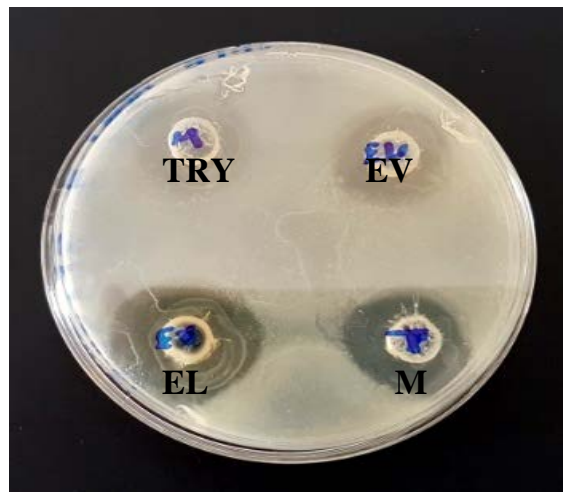


Figure 16: L'effet de différentes sources d'azote sur la production de la bactériocine LCM 103 testée contre *E.coli*.

M: MRS **EV:** extrait de viande **EL:** extrait de levure **TRY:** tryptone

La cinétique de croissance et production de bactériocines, nous renseigne sur le temps d'incubation qui est l'un des facteur d'optimisation, a préalablement été établie pour les souches LCM 103, MVM 22, MGM 85 et LCM 17, après modification de la source d'azote, ce qui a permis de connaitre les différentes phases, plus précisément le début de la phase stationnaire qui indique la période de production des bactériocines. (**Fig 17**)

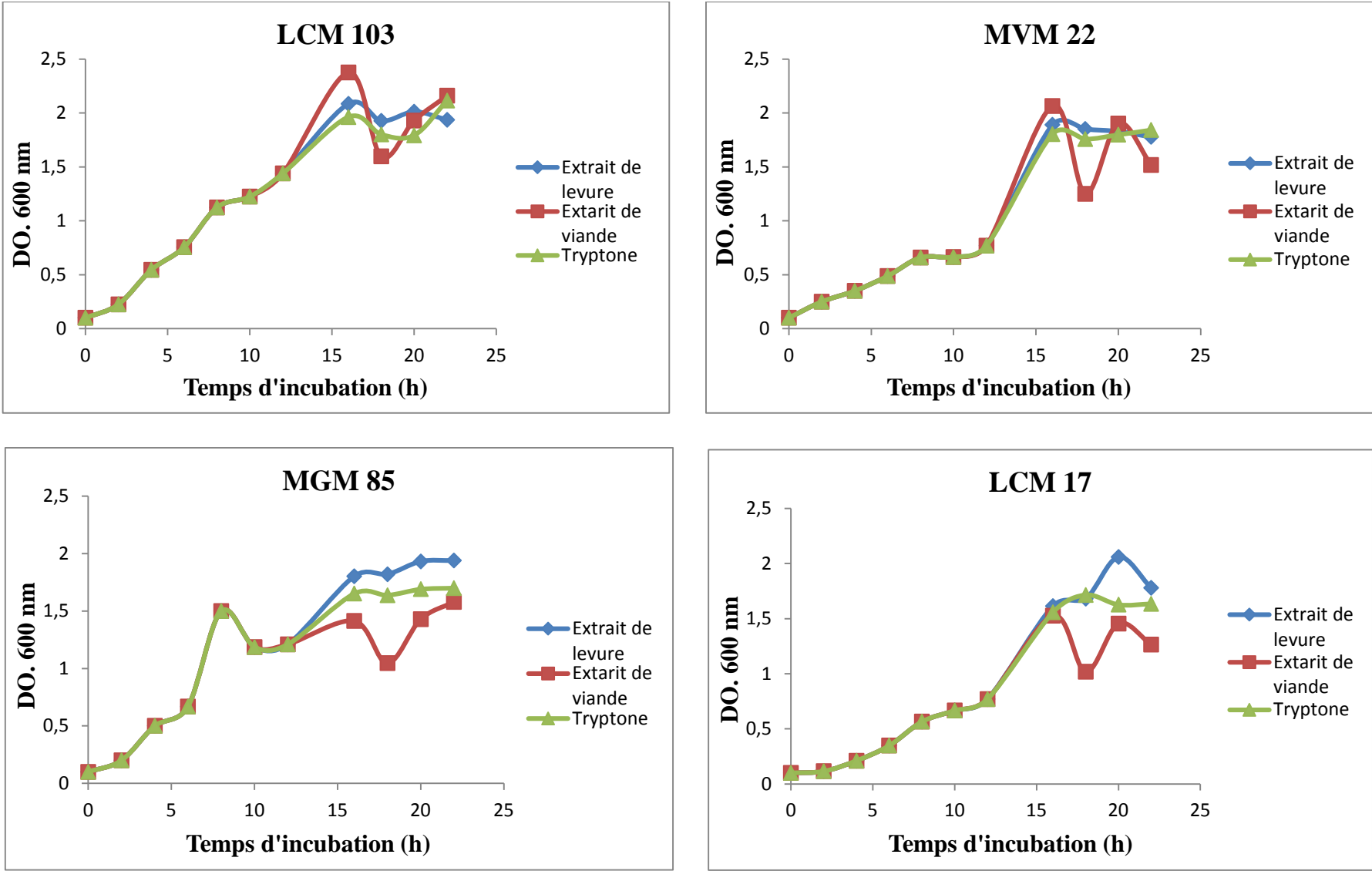


Figure 17: L'effet de source de carbone sur la croissance des bactéries lactique.

De l'ensemble des résultats obtenus on peut déduire les remarques suivantes :

Certaines sources d'azote agissent seulement sur la croissance de la souche bactérienne alors que d'autres seulement sur la production de bactériocine.

Le milieu MRS permet une bonne croissance des souches LCM 103, MVM 22, MGM 85 et LCM 17, mais cette biomasse ne concorde pas avec une production maximale de bactériocine par rapport au milieu additionnée d'extrait de levure qui a donné une bonne croissance et une inhibition importante des souches pathogènes, cela a été faite dans le cas de tous les souches lactiques, ce qui a été confirmé par les travaux de **Biswas et al., (1991)**, qui ont constaté que la production de bactériocine par *Pediococcus acidilactici* H, dans le milieu MRS, est moins importante par rapport aux autres milieux alors que la croissance est conséquente.

La DO des souches en milieu additionnée de 2.5% d'extrait de levure, est assez élevée, ainsi que la production de bactériocine qui est importante. Des résultats similaires ont été observés par plusieurs chercheurs qui ont indiqué que l'extrait de levure permet une bonne croissance et une production maximale de bactériocine. Ce qui a également été observé par **Mollendorff et al., (2009)** dans le cas des souches de *Lactobacillus* JW3BZ, JW6BZ et JW15BZ.

- **Effet de la source de carbone**

Le glucose est un constituant du milieu MRS, ce sucre simple semble être le plus utilisé par les bactéries lactiques pour leur croissance. Pour analyser l'effet de la source de carbone, nous avons remplacé le 2% de glucose par 2% de chacun de ces sucres : le lactose, saccharose et le fructose, le témoin étant le milieu MRS modifié de l'étape précédente avec glucose.

L'effet de la source de carbone sur la croissance des souches LCM 103, MVM 22, MGM 85 et LCM 17 et la production de bactériocine est montré dans les **fig 18** et **figure 19** ci-dessous :

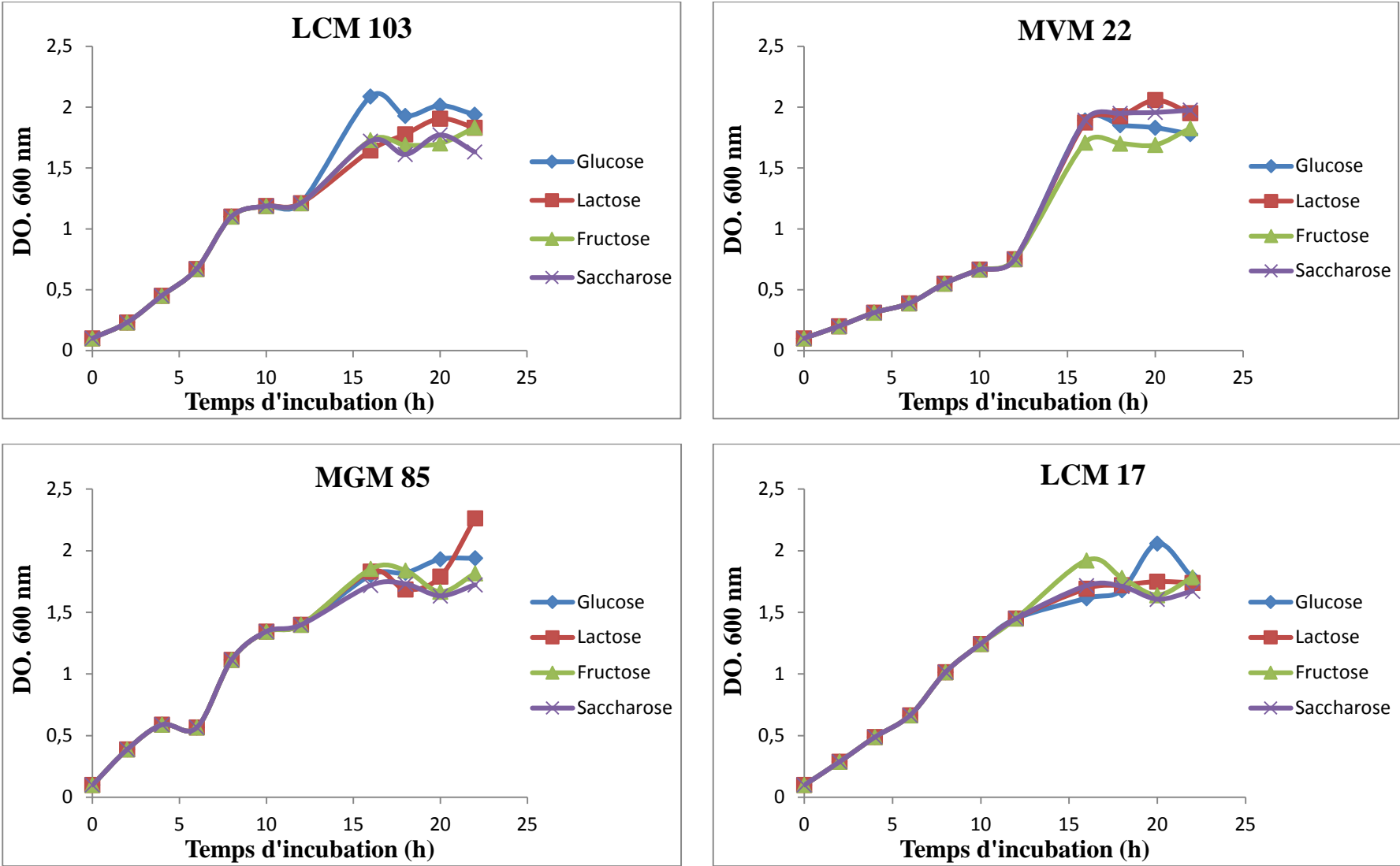


Figure 18: L'effet de la source de carbone sur la croissance des souches lactique.

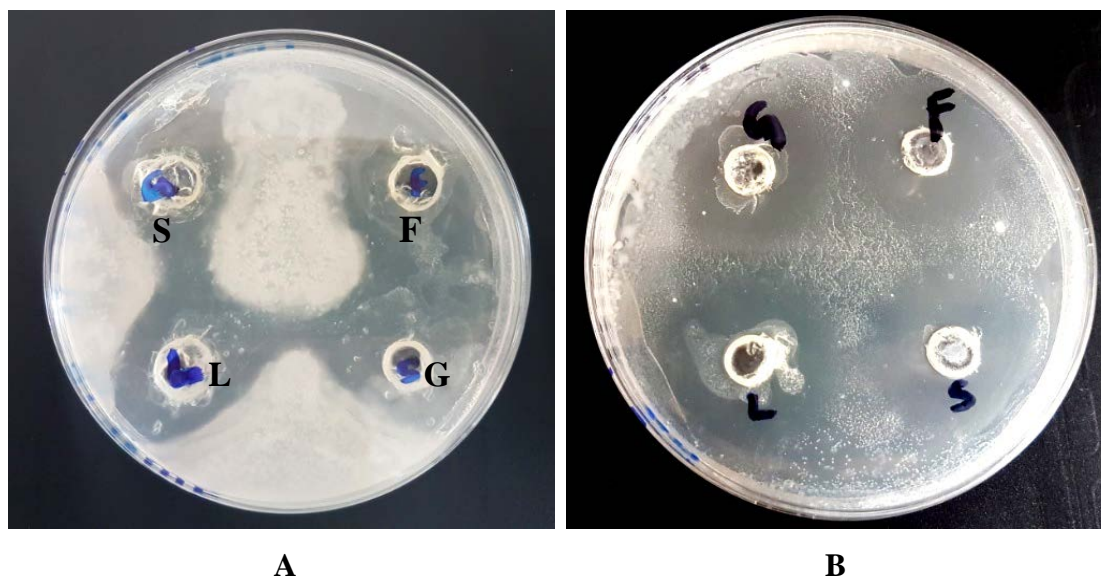


Figure 19: L'effet des différentes sources de carbone sur la production de la bactériocine,
A : LCM 103 testée contre *Staphylococcus aureus*, **B :** MVM 22 testée contre *Proteus mirabilis*.

G : Glucose, **S :** Saccharose, **L :** Lactose, **F :** Fructose

Comme pour la source d'azote, une bonne croissance ne reflète pas forcément une bonne production de bactériocine.

Et les remarques suivantes peuvent être faites :

- La croissance des souches LCM 103, MGM 85 et LCM 17 dans le milieu contenant le glucose restent la meilleure par rapport aux milieux contenant le lactose, fructose et saccharose, comme seule source de carbone. Ainsi que pour la souche MVM 22 la croissance dans le milieu contenant le lactose est assez importante par rapport aux autres sources de carbone. La production de bactériocine est la plus importante en milieu contenant 2% de glucose comme seule source de carbone pour nos quatre souches lactiques, ceci est reflété par le diamètre du halo d'inhibition qui est compris entre 11 et 28mm. Ces résultats sont constatés par plusieurs chercheurs toujours en présence de 20g/l de glucose.

En effet, **Mataragas et al., (2004)** ont observé une production maximale de bactériocines produites par *Leuconostoc mesenteroides* L124 et *Lactobacillus curvatus* L442. Ce même résultat a été observé par **Pal et al., (2010)** dans le cas de *Weissella paramesenteroides* DFR-8.

En conclusion, nous pouvons dire que le glucose à 2% constitue la meilleure source de carbone.

- **Effet de la source de potassium**

L'effet de la source de potassium sur la production de bactériocine a été étudié par plusieurs auteurs (**De Vuyst et Vandamme, 1993 ; Todorov et Dicks, 2005 ; Mollendorff et al., 2009 ; Lim, 2010**).

Le MRS contient 2g/l de K_2HPO_4 , pour l'étude de l'effet de la source de potassium sur la croissance et la production de bactériocine, nous nous sommes basés sur les travaux de **Mollendorff et al., (2009)**.

Pour cela les 0.2% de K_2HPO_4 du milieu MRS modifié obtenu des étapes précédentes ont été substitués par :

- 2% de KH_2PO_4
- 1% K_2HPO_4 + 1% KH_2PO_4

Tous ces milieux en plus du témoin, qui contient 0.2% de K_2HPO_4 ont étéensemencé par nos souches lactiques.

Le résultat de l'effet de la source de potassium sur la croissance des souches LCM 103, MVM 22, MGM 85 et LCM 17 est montré dans la **fig 20**.

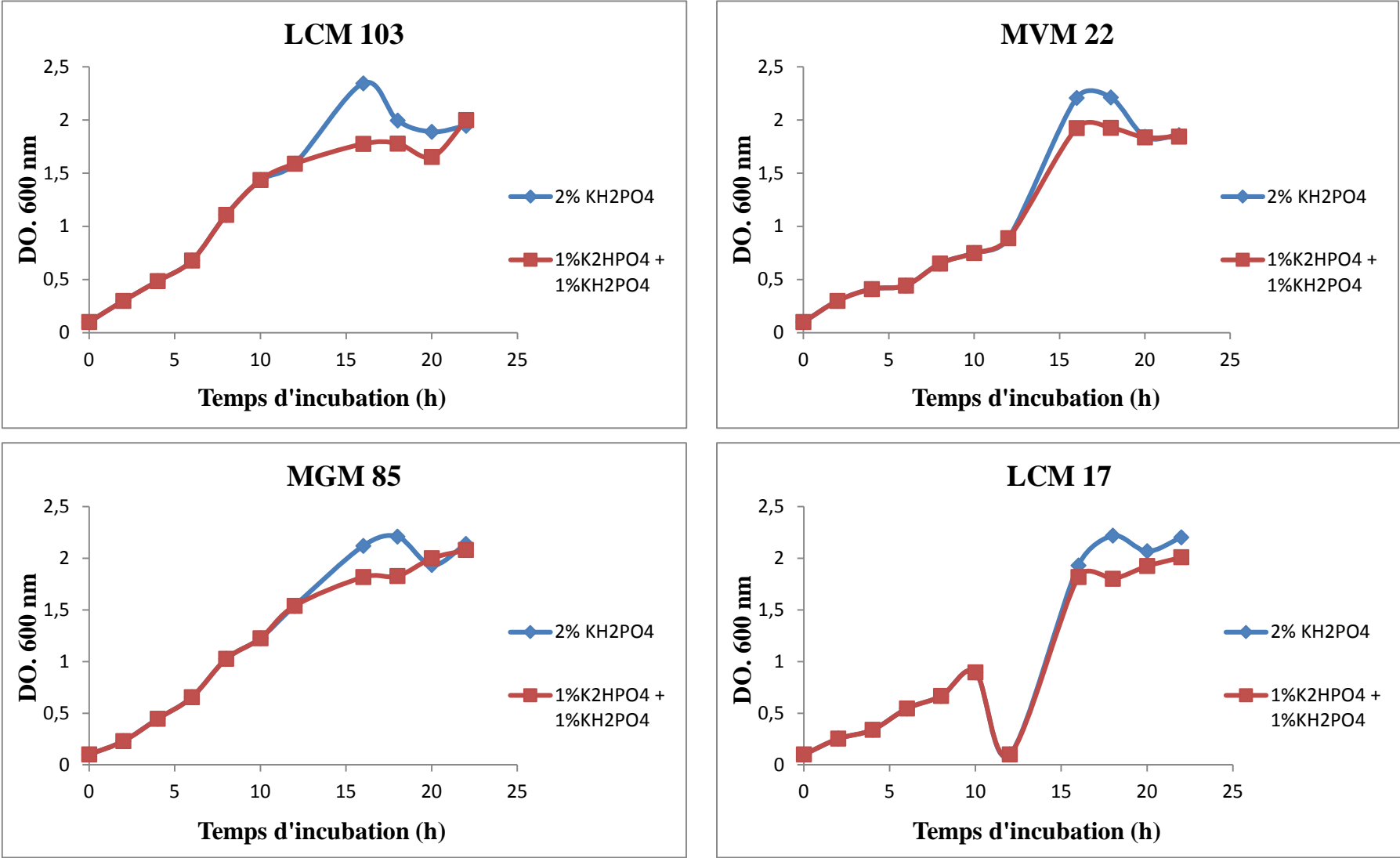


Figure 20 : L'effet de la source de potassium sur la croissance de nos souches lactique.

La figure 21 montre le résultat obtenu :

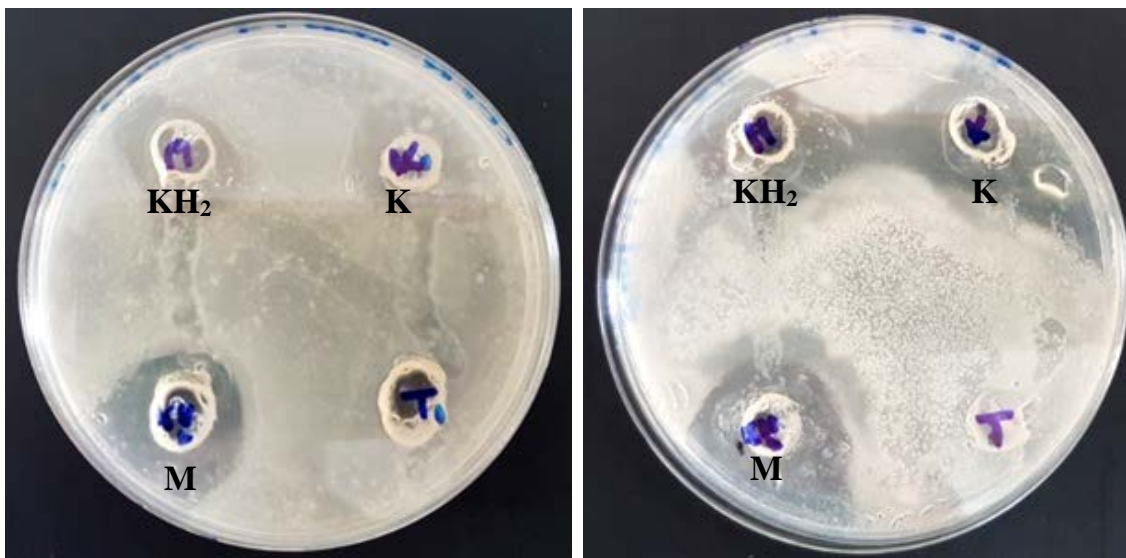


Figure 21: L'effet de différentes sources de potassium sur la production de la bactériocine, **A** : MGM 85 testée contre *E.coli*, **B** : LCM 17 testée contre *Staphylococcus aureus*.

M : MRS, **KH₂** : KH₂PO₄, **K** : K₂HPO₄ + KH₂PO₄

Nous pouvons faire les remarques suivantes:

- La croissance des souches LCM 103, MGM 85 et LCM 17 est plus importante en milieu contenant

2% de K₂HPO₄ par rapport aux autres milieux utilisés. Par contre pour la souche MVM 22 qui a donné une croissance importante en milieu contenant 1% K₂HPO₄ + 1% KH₂PO₄ par rapport aux autres milieux.

Concernant la production de bactériocine

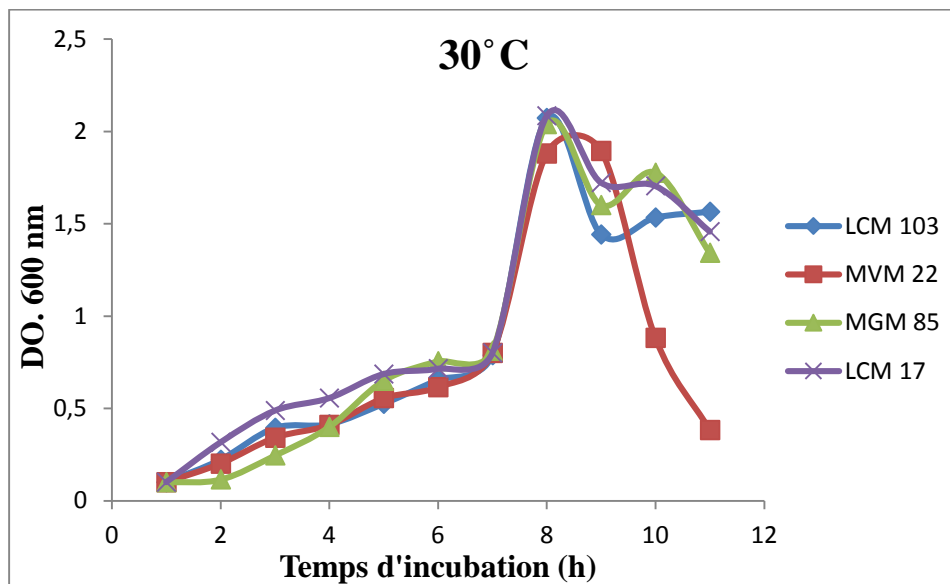
- Les milieux contenant 2% de K₂HPO₄ comme source de potassium permettent une production maximale de la bactériocine, ceci est reflété par le diamètre de l'halo d'inhibition. **Kim-Hi (2005)** a observé que la production de la micrococcine GO5 par *Micrococcus* sp GO5 est huit fois plus importante dans un milieu contenant 2 à 2.5 % de K₂HPO₄ que dans un milieu contenant 0.2% de K₂HPO₄.

A ce stade un milieu MRSm est constitué. Il s'agit du milieu MRS additionnée de 2.5% d'extrait de levure (comme source d'azote) et les sources de carbone et de potassium ne sont pas modifier pour les souches LCM 103, MGM 85 et LCM 17 par contre à la souche MVM 22 le lactose est utilisé comme source de carbone et 1% K_2HPO_4 + 1% KH_2PO_4 comme source de potassium.

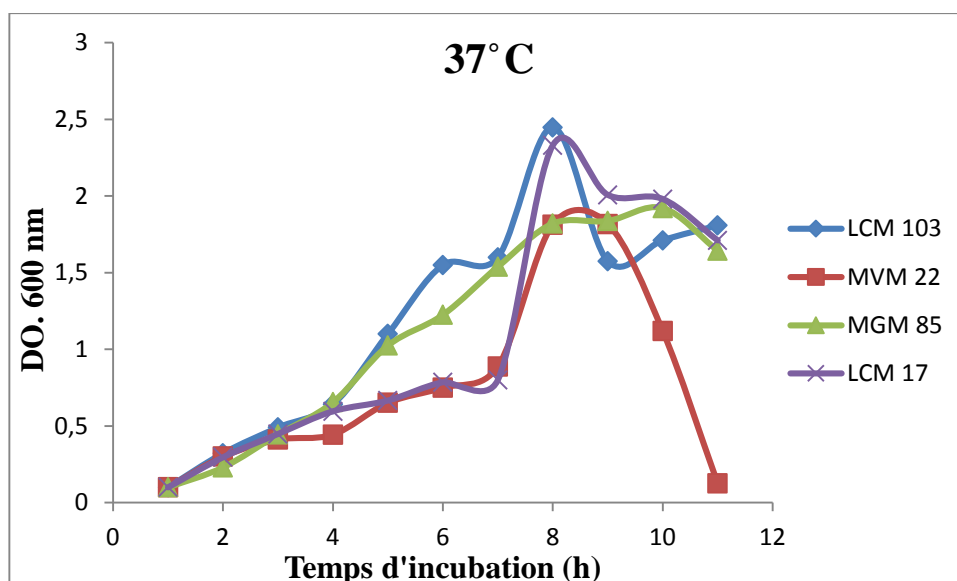
Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la température d'incubation des souches bactériocinogènes.

I.3.2 Effet de température d'incubation et pH:

La température d'incubation est un paramètre qui doit être maîtrisé pour la croissance et la production de la bactériocine. Dans notre étude, nous avons testé les températures 30 et 37°C. Les cultures ont été réalisées, pendant 24h, dans le milieu MRSm par ensemencement par les souches LCM 103, MVM 22, MGM 85 et LCM 17. Les résultats sont montrés dans la **figure 22.a** et **22.b**



a



b

Figure 22: Effet de la température d'incubation sur la croissance des souches lactiques.

- La croissance des souches LCM 103, MVM 22, MGM 85 et LCM 17 est plus importante à 37°C par rapport à 30°C.

Nos résultats sont similaires à ceux d'**Aggag et Khelili (2013)** qui ont trouvé que la température optimale de croissance et production de bactériocines est de 37°C.

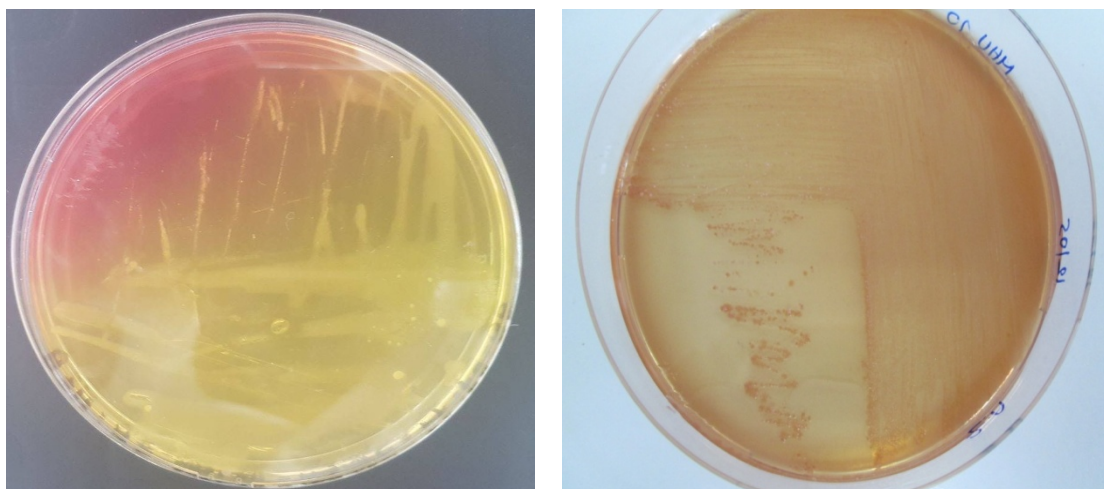
Selon **Lim (2010)** *Lactobacillus plantarum* KC21 ne montre aucune activité à température 25°C contre *Staphylococcus aureus* ATCC6538, mais qui est très active à 30°C.

Pour ce qui est du pH, nous avons constaté une meilleure croissance et production à pH 7, ce qui est en accord avec **Blom et al., (1999)** qui ont remarqué une meilleure production dans un milieu de pH 7.

I.4 Mise en évidence de l'activité antagoniste

Les souches lactiques ont été testées pour leur capacité à inhiber les bactéries pathogènes Gram négatif tel qu'*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et le Gram positif *Staphylococcus aureus*.

Aspect macroscopique des souches pathogène :



A

B



C

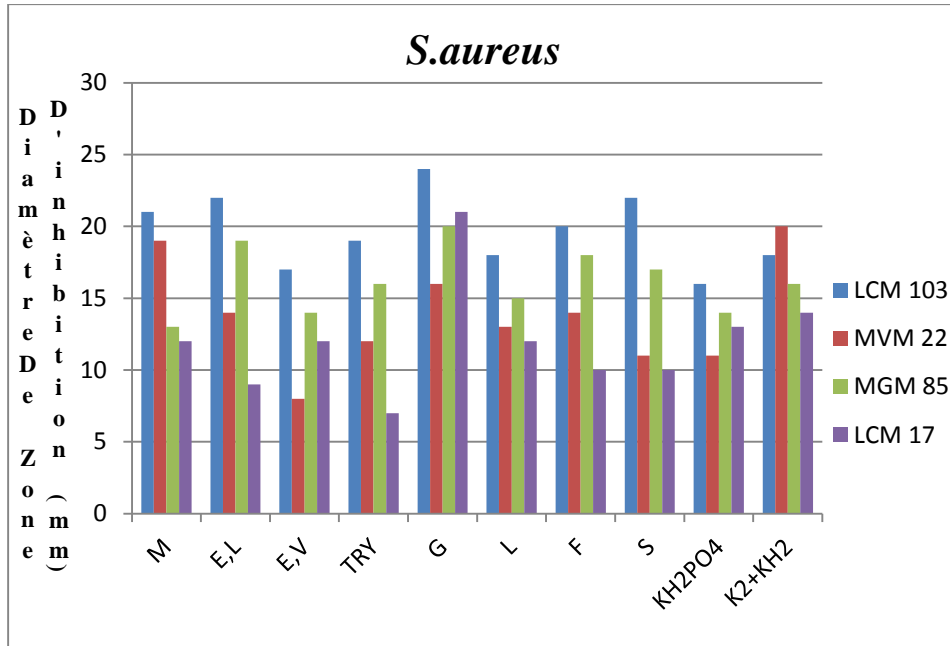
Figure 23: Aspect macroscopique des bactéries pathogènes après 24h d'incubation.

A : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sur milieu Chapman

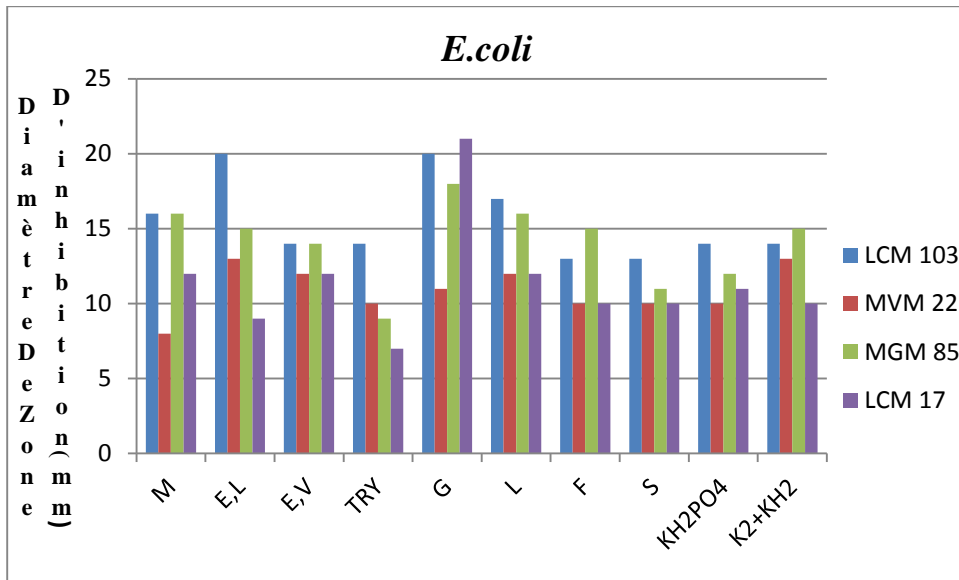
B : *Escherichia coli* ATCC 25922 sur milieu Mac Conkey

C : *Proteus mirabilis* ATCC 35659 sur milieu GN.

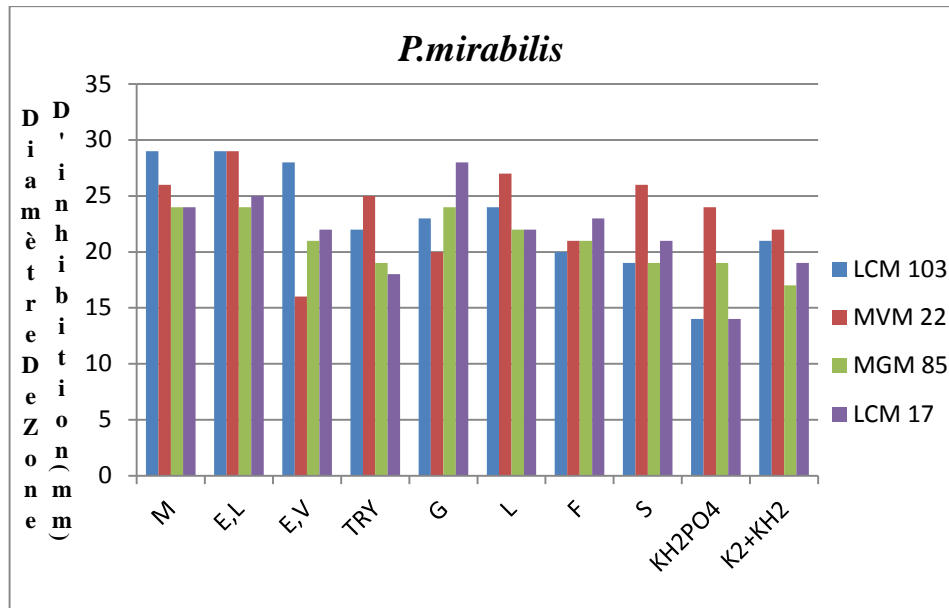
Les souches lactiques ont une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries pathogènes Gram + et Gram - qui se traduit par l'apparition de zones d'inhibitions de différents diamètres. Les résultats sont présentés dans **fig 24 (A), 24 (B) et 24 (C)**.



A



B



C

Figure 24: Diamètre des zones d'inhibition formée par les souches lactiques confrontées avec les bactéries pathogènes.

M : MRS, **E.L :** extrait de levure, **E.V :** extrait de viande, **TRY :** tryptone, **G :** glucose, **L :** lactose, **F :** fructose, **S :** saccharose, **K₂+KH₂ :** K₂HPO₄+ KH₂PO₄

L'effet inhibiteur pour chaque bactérie lactique a été significativement différent d'une souche à l'autre. En effet, pour *S.aureus* les diamètres de zone d'inhibition sont entre 9 à 24 mm alors que *E.coli*, les diamètres sont de 8 à 21 mm et on a des diamètres élevés compris entre 14 à 29 mm pour *P.mirabilis*.

Un effet fortement inhibiteur de la croissance des bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*) par les souches LCM 103 et MGM 85 et un effet modéré par les souches MVM 22 et LCM 17.

Pour les Gram négatif *E.coli*, un effet fortement d'inhibiteur est observé ; vis-à-vis les souches LCM 103 et MGM 85, et un effet modéré vis-à-vis MVM 22 et LCM 17, tandis que pour *P.mirabilis* un effet fortement inhibiteur est observé par toutes les souches lactiques.

L'activité antagoniste des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes a été confirmée par plusieurs travaux.

Les études de **Makras et al., (2006)** ont montré une activité inhibitrice de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* par des bactéries lactiques **Nigatu et al., (2015)**.

Dans ce travail, nous déduisons que les bactéries à Gram positif sont sensibles aux bactériocines ainsi que les bactéries à Gram négatif. Cela a permis de mettre en évidence le pouvoir antagoniste de nos souches lactiques.

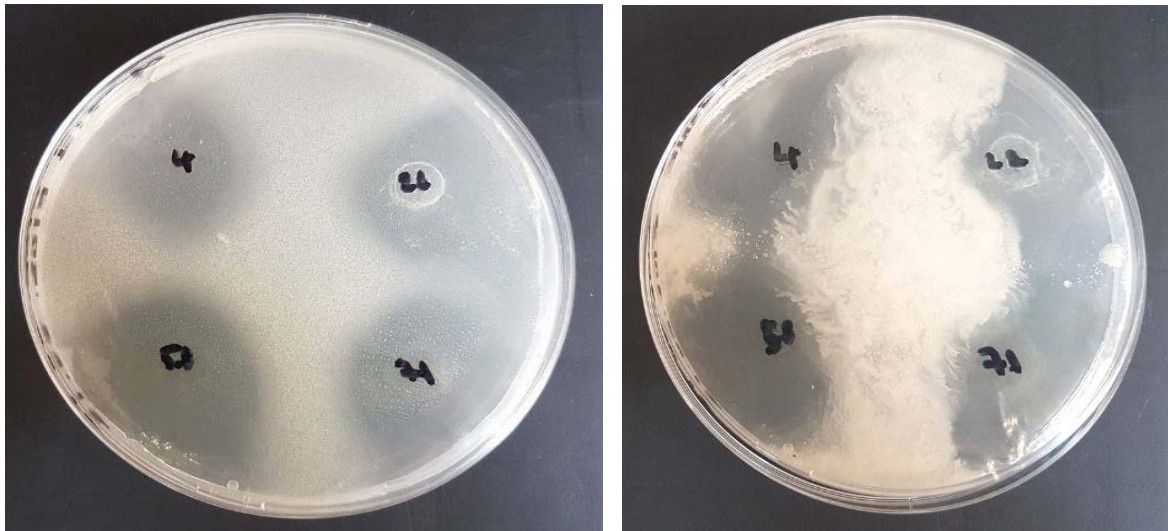
Résultats finale du milieu MRSm :

Le milieu MRSm optimisé a donné de bien meilleurs résultats comparativement au témoin qui est le MRS. Nous constatons d'importantes zones d'inhibitions entre 26 à 30 mm pour *S.aureus*, alors que les diamètres sont de 22 à 26 mm pour *E.coli* et des diamètres compris entre 27 à 32 mm pour *P.mirabilis*.

Un effet fortement inhibiteur de la croissance de la bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* par les souches LCM 103, MGM 85, MVM 22 et LCM 17 a été observé comparativement au milieu témoin MRS.

Aussi pour les bactéries à Gram négatif *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis* nous avons constaté un effet fortement inhibiteur par toutes les souches lactiques.

A ce stade on peut dire que toutes les souches LCM 103, MVM 22, MGM 85 et LCM 17 cultivées dans le milieu MRSm, ont une activité inhibitrice élevée vis-à-vis des souches pathogènes par rapport au milieu MRS (**Figure 25**), ce milieu est donc à retenir.



A

B



C

Figure 25 : Zones d'inhibitions des souches lactiques vis-à-vis de :

A : *Escherichia coli* ATCC 25922

B : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

C : *Proteus mirabilis* ATCC 35659.

CONCLUSION

Conclusion générale

L'utilisation massive et répandue des antibiotiques en médecine humaine, a engendré un problème très épineux qui est la résistance des bactéries pathogènes aux traitements par les antibiotiques. Fin février 2017, l'organisation mondiale de santé (OMS) a publié une liste de douze familles de bactéries contre lesquelles elle juge urgent de développer de nouveaux antibiotiques, en raison des risques que font peser leur résistance aux traitements actuels.

En outre la recherche de nouvelles molécules antibiotiques, l'une des solutions pour surmonter le problème de la résistance des bactéries pathogènes aux biomolécules, pourrait être l'utilisation des bactériocines produits par les bactéries lactiques. Actuellement, on dispose d'un ensemble de souches des bactéries lactiques productrices de bactériocines possédant des caractéristiques différentes notamment au niveau de leur spectre d'action.

Le but de notre étude était d'apporter des modifications au milieu MRS en se basant surtout sur les différentes sources du milieu de culture afin d'obtenir un milieu optimal pour augmenter la production de bactériocines, et testé ainsi l'effet de ces bactériocines produites par nos souche lactiques, par interactions de ces souches productrices et les germes pathogènes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*).

L'étude expérimentale, divisée en trois parties, a consisté d'abord à vérifier la pureté de nos germes pathogènes, et à confirmer l'identité de nos souches lactiques par des tests biochimiques et physiologiques.

Par la suite, nous avons effectué une optimisation sur le milieu MRS, la précédant par l'établissement de la cinétique des souches lactiques qui a donc été étudié en parallèle afin de déterminer la phase dans laquelle les bactériocines sont secrétées.

Puis, nous avons mis en évidence le pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques par la technique de méthode des puits AWDA et la méthode d'antagonisme différé vis-à-vis des *Escherichie coli*, *Staphylococcus aureus* et *Proteus mirabilis*.

Il a été constaté que :

- Certaines sources dans le milieu de culture agissent seulement sur la croissance de la souche bactérienne alors que d'autres seulement sur la production de bactériocine.
- Le glucose constitue la meilleure source de carbone pour les souches lactiques.
- L'extrait de levure additionnée au milieu de culture comme source d'azote permettent une bonne croissance et une bonne production de bactériocine.
- Le milieu contenant 2% de K_2HPO_4 comme source de potassium permettent une production maximale de la bactériocine.
- La température d'incubation des bactéries lactiques influe sur la production des bactériocines.
- L'effet antibactérien peut varier selon la souche de bactéries lactiques et selon les conditions de cultures.
- Les bactériocines ont un effet inhibiteur sur les bactéries pathogènes à Gram négatif ainsi que les pathogène à Gram positif.

En perspectives, d'autres études seront intéressantes d'être poursuivis pour en savoir plus sur l'action des bactériocines sur les champignons, ainsi sur d'autres bactéries à Gram négatif.

L'optimisation de la production de bactériocine en essayant d'autres sources de carbone. L'étude d'autres facteurs influencent la production de bactériocine et d'étudier le mode d'action de ces bactériocines, les extraire purifier et étudier leur profil génétique afin de les intégrer dans le domaine pharmaceutiques

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- Abrams, D., Barbosa, J., Albano, H., Silva, J., Gibbs, P. A., Teixeira, P. (2011).** Characterization of bacPPK34 a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* strain K34 isolated from “Alheira”. *Food Control* , 22: 940-946.
- Aggag M.L., Khelil S, (2013).** « Détermination de la nature des bactériocines chez quelques bactéries lactiques ». Mémoire de master, université de Mostaganem, Mostaganem P :68
- Ahmed, Z., Wang, Y., Cheng, Q., Imran, M. (2010).** *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: An overview. *Afr. J. Biotechnol.*, 9: 2843-2850.
- Albano H., Oliveira M., Aroso R., Cubero N., Hogg T. et Teixeira P., (2007).** Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from “Alheiras” (traditional portuguese fermented sausages) *In situ* assays. *Méat Science*, 76: 796-800.
- Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silver, J., Carneiro, L., Magalhães, R. (2009).** Evaluation of bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilacticias* a biopreservative for « Alheira », a fermented meat sausage. *Food Control* , 20: 764-770
- Alves V.F., Martinez R. C. R., Lavrador M. A. S. et De martinis E. C. P., (2006).** Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham, *Méat Science* , 74 : 623-627.
- Ammor S., Tauveron G., Dufour e. et Chevallier I., (2006).** Antimicrobial activity lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control*, E7: 454-461.
- Amouzou K S., Prevost H., Divies G.R., 1985** - Effect of magnesium supplementation of milk on lactic fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus*. *Lait*: 65: pp 21-34.
- Aymerich M.T., Garriga M., Monfort J. M., Nes i. et Hugas M., (2000).** Bacteriocin producing Lactobacilli in Spanish-style fermented sausages, characterization of bacteriocins. *Food Microbiology*, E7: 33-45.

Références bibliographiques

B

Badis A., Guetarni D., Kihal M., Boudjemaa M. (2003). « Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races ». In Food and microbiology, 579-588.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, 23:30-37.

Barrefoot S. F. et Klaenhammer T. R., (1984) Purification and characterization of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin Lacticin B. *Antimicrobiology Agent Chemother*, 26(3).

Bazo M., 2011 - Recherche des effets de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques sur le *Streptococcus Aureus* résistant à la méthiciline (SARM). Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en biologie. Université du Québec à Montréal : pp 4-7.

Belliard E., Thault D. et Mathot A. G., (1996). Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques In microbiologie alimentaire. *Tome : OT* Coordinateurs : BOURGEOIS C. M et LARPENT J. P. Ed : Techniques et Documentations. Lavoisier. Paris.

Ben Hammou, F., Skali, S. N., Idaomar, M., Abrini, J. (2010). Combination of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage castings at 6°C. *Afr. J. Biotechnol.* , **9**: 1190-1195.

Benkerroum, N., Oubel, H., Zahar, M., Dlia, S., Maltout, A. F. (2000). Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan Jben. *J. Appl. Microbiol.* , 89:960-968.

Ben-Yahia L., 2012 - Etude du dialogue hôte / bactéries lactiques du yaourt chez dratsgnotobiotiques. Thèse pour obtenir le grade de docteur délivré. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement: 21p.

Bergey's manual. (2009). Systematic of bacteriology. Second Edition. Volume three the firmicutes. Edition springer

Références bibliographiques

- Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C. et Ray, B. (1991).** Influence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin, PediocinAcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied And Environmental Microbiology*. **57** :1265-1267.
- Björkroth J., Holzapfel W., 2006.** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*.
- Blom, H., Katla, T., Holck, A., Sletten, K., Axelsson, L et Holo, H. (1999).** Characterization, Production, and Purification of Leucocin H, a Two-Peptide Bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. *Springer-Verlag. Current Microbiology*. 39: 43-48.
- Bourgeoi. et Larpent, J.P. (1996).** s, C. M. Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2, pp. 523.
- Boyaval P., Terré S et Corre C., 1988** - Production d'acide lactique à partir de permeat de lactosérum par fermentation continue en réaction à membrane lait : 1: pp 65-84.
- Bradley D. E., (1967).** Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological reviews*, 31_(4): 230-314.
- C
- Carr F.J., Chill D., Maida N. (2002).** « The Lactic Acid Bacteria : A Literature Survey » .critical Rev. Microbiol. 28 :281-370.
- Castro, M. P., Palavecino, N. Z., Herman, C., Garro, O. A., Campos, C. A.(2011).** Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*, 87:321-329.
- Chung H. T., Monteville J. J. et Chikindas M. L., (2000)** Nisin depletes ATP and proton motive force in mycobacteria. *Letter of Applied Microbiology*, 31(6).
- Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F. et Chikindas M.L., (2001)** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, TU. 1-20.
- Corrieu G., Luquet F M., 2008** - bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Ed. Lavoisier. Paris. France :pp 472 -676.

Références bibliographiques

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

D

Daeschel, M.A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.*43:164-167.

Davey G. P. et Richardson B. C., (1981) Purification and some properties of diplococci from *Streptococcus cremoris* 346. *Applied and Environmental Microbiology*, 141, 84-89.

De Roissart., 1986 - Bactéries Lactiques dans le lait et produits laitiers. Ed. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris : 445 p.

De Vuyst L. et Vandamme E. J ., (1993). Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp *lactis* batch fermentation using a complex medium. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 40_: 17-22.

Delarras, C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits.

Delgado S, Mayo B. 2004. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* 538 and *Enterococcus* spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse 539 cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 90:309-319.

Dellaglio F., Roissart H., Torriani S., Curk M C. and Janssens D., 1994 - Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In Bactéries Lactiques. Ed. H Roissart et F M. Luquet. Paris: Lavoisier :pp 25-116.

Dembélé, T., Obdrzalek, V., Votava, M. (1998). Inhibition of bacterial pathogens by *Lactobacilli*. *Zent.bl. Bacteriol.* , 288:395-401.

Devoyod J.J. et Poullain F., 1988. Les *Leuconostocs* Propriétés: leur rôle en technologie laitière, *Le Lait*, 68 (3) : 249-280

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

Références bibliographiques

Doumandji, A., Bousbia, N., Hellal, A. (2010). Effet anti-*Listeria* de *Bifidobacterium infantis* isolé à partir de selles de nourrisson allaité au sein. *Sciences et Technologies*, 31 : 14-21.

Drider D., Prevost H., 2009 - Bactéries lactique Physiologie, Métabolisme, Génomique et Application industrielle. Ed, Economica 49 rue Harica 75015 Paris :pp 381- 427.

Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., Prévost, H. (2006). The continuing story of class II bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* , **2**: 564-582.

E

El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El-Mecherfi, K.E., Bazukyan, I., Choiset, I., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y. G., Kuliev, A. A., Mozzi, F., Chobert, J. M., Haertlé, T. (2011). Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Sci. Technol.* ,509-516.

Elmoualdi, L., Labioui, H., Boushama, L., Benzakour, A., Ouhssine, M., El Yachioui, M. (2008). Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 147 :7-18.

G

Gálvez A., Abriouel H., Ben Omar N., et Lucas R., (2011). Food Applications and Régulation In: Drider D., et Rebuffat S. (eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp, 253-390

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

Gautam, N. et Sharma, N. (2009). Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian J. Microbiol.*, **49**: 204-211.

Ghali, H., Allaoui, A., Destain, J., Benkerroum, N., Thonart, P. (2006). Bacteriocins activity by *Lactobacillus curvatus* CWB1-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4°C storage. *J. Food Protection* , 69:1066-1071.

Références bibliographiques

Ghrai, T., Frere, J., Berjeaud, J. M., Manai, M. (2008). Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Cont.*, **19**: 162-169.

Glazer, A. N. et Nikaido, H. (2007). Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology. Cambridge University Press, New York.

Gong, H. S., Meng, X. C., Wang, H. (2010). Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from "Jiaoke", a traditional fermented cream from China. *Food Cont.*, **21**:89-96.

Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Séances Soc. Biol. Fil.*, **93**: 279 1-2792.

Grattepanche, F. (2005). Etude d'un système de préfermentation en continu du lait par une culture mixte. Thèse de Doctorat. Université Laval. Canada.

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

H

Hadef S., 2012 - Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des lactiques locales. Mémoire de magister: pp 7-8.

Hadji-Sfaxi, I., El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Batdorj, B., Le Blay- Laliberté, G., Barbier, G., Haertlé, T., Chobert, J. M. (2011). Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control* ., **22**:2020-2027.

Hammes W.P., Hertel C., 2006. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes.*, **4**: 320-403

Harrigan W.F. et McCance M.E., (1976). Eds., Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press. Orlando.

Héquet, A., Laffite, V., Simon, L., De Sousa-Caetano, D., Thomas, C., Fermaux, C., Berjeaud, J. M. (2007). Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria

Références bibliographiques

isolated using a medium designed to stimulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei*2512 on meat. *Int. J. Food Microbiol.*, 113:67-74.

Hirsch, A., Grinsted, E., Chapman, H.R et Mattick, A.T.R. (1951), A note on the inhibition of an anaerobic spore former in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*. *J. Dair. Res.*, **18**(2): 205-207.

Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S., Tani A., Maneerat S., 2011. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control.*, 22: 401-407

J

Imbert M., Bondaeu R., 1998 - On the iron requirement of *lactobacilli* grown in chemically defined medium. *Curr. Microbiol.* 37: pp 64-66.

J

J. W. von Mollendorff, S. D. Todorov, L. M. T. Dicks (2009) Optimization of growth medium for production of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* JW3BZ and JW6BZ, and *Lactobacillus Fermentum* JW11BZ and JW15BZ isolated from Boza. *Trakia Journal of Sciences*, Vol. 7 , No. 1, pp 22-33.

Jimenez-Diaz R., Rios-Sanchez R. M., Desmazeaud M., Ruiz-BarbA J.L. et Piard J. C (1993). Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5): 1416-1424.

Jones, R., Hussein, H. M., Zagorec, M., Brightwell, G., Tagg, J. R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiol.*, 25:228-234.

K

Karmen G.T., et Bogovic B.M., (2003). Partial characterization of bacteriocins produced by *Bacillus cereus* isolates from milk and milk products. *Food. Technol. Biotechnol.* 41 (2): 121-129.

Références bibliographiques

- Kashet, E.R. (1987).** Bioenergetics of lactic acid bacteria cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol Rev.* **46** :233-244.
- Khalil, R., Elbahloul, Y., Djadouni, F., Omar, S. (2009).** Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain. *Pak. J. Nutr.*, 8:242-250.
- Kim-Mi, H., Kong, Y.J., Baek, H et Hyun, H. H. (2005).** Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin GO5 by *Micrococcus* sp. GO5.
- Klaenhammer T. R., (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Biological Revue*, Y2_
- Klaenhammer, T. R. (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Bioch.* 70:337-349.
- Klaenhammer, T. R., Fremaux, C. et Hechard, Y. (1994).** Activité antimicrobienne des bactéries
- König H. et Fröhlich J., 2009 -** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer- Verlag. Berlin. Heidelberg: pp18-20.
- Kostinek M., Specht L, Edward V. A., Pinto C., Egounlety M., Sossa C., Mbugua S., Dortu C., Thonart P., Taljaard L., Mengu M., Franz C. M. A. P. et Holzappel W. H., (2007).** Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 342-351.
- Kouakou P., et Thonart P., (2011).** Action des cultures protectrices: cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15 (2): 339-348.
- Krier F., Revol-Junelles A.M., et Germain P., (1998).** Influence of temperature and pH on Kuhry J.G., Fonteneau P., Duportail G., Maechling C., et Laustriat G., (1983). TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells. *Cell Biophysics.* 5 (2): 129-40.

Références bibliographiques

ℒ

L. Makras, V. Triantafyllou, D. Fayol-Messaoudi, T. Adriany, G. Zoumpopoulou, E. Tsakalidou. 2006. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res Microbiol*, 157, pp. 241–247

Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachioui, M., Ouhsine, M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 144 :237-250.

LARPENT J. P., (2000). Introduction à la nouvelle classification. Ed : Techniques et Documentation. Lavoisier Paris.

Larpent J-P., 1996a. Les bactéries lactiques **In** Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires. Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 4-33.

Larpent-Gourgaud Monique, Michaux Odile, Larpent J.P, Desmasure Nathalie, Desmazeaud Michel, Mangin Irène, Masson Florence, Montel M.C. et Tailliez Patrick., 1997. Les ferments lactiques et bactéries apparentées **In** Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire. Larpent J-P. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 199-255

Ledesma O V., De Ruiz Holgado A P., Olivier G., De Giori G S., Raibaud P., Galpin J V., 1977 - A synthetic medium for comparative nutritional studies of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* Vol 42: pp123-133.

LEE N. K. et PAIK H. D., (2001). Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK 24 isolated from jeat, gai. *Food Microbiology*, 18(1): 17-24.

Leloir Y., Nouaille S., Ribeiro L., Commissaire J., Corthier G., Gilbert S., Chatel J. M., L'haridon R., Gruss A. et Langella P., (2001). Sécrétion des protéines d'intérêt thérapeutique chez *Lactococcus lactis*. *Lait*: 81.217-226.

Lenoir J., Hermier J., Weber F., 1992 - Les groupes microbiens d'intérêt, Ed Cidil : pp 30-50.

Références bibliographiques

Letrot C., Juillard V., 2001 - Development of a minimal chemically. Defined medium for the exponential growth of *streptococcus thermophilus*. J. APPL. Microbiol: 91: pp 1023-1029.

Leveau J-Y., BouixMrielle, De Roissart H., 1991. La flore lactique In Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Bourgeois C.M., Leveau J- Y. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 152-186

Lim, S. M (2010). Cultural conditions and nutritional components affecting the growth and bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* KC21. Food Sci. Biotechnol. 19: 793-802

Lourent Federighi M., JouveJ L., 1998 - Manuel de bactériologies alimentaire, polytechnica. Paris : 308p.

Ludwig W ., schleifer K-H., WhitmanW.B. (2008):bergey's taxonomic outlines- Revised Road Map to the Phylum Firmicutes. Vol .3.

Luquet F M., 1986 - Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre, T3., qualité, énergie et tables décomposition). Ed .Technique et Documentation. Paris : pp 343- 442.

M

Mannu, L., Comunian, R. and Scintu, M.F. (2000a)Mesophiliclactobacilli in FioreSardocheese: PCR-identification and evolutionduringcheeseripening. International Dairy Journal 10, 383±389.

Marchal N., Bourdon J.L, Richard, C.L. (1991). « Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries » .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris

Marth, E. H. et Steele, J. L. (2001). Applied dairy microbiology. Marcel Dekker, Inc., New York.

Matamoros S., 2008 - Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au. Thèse de doctorat. Université de Nantes: 17p.

Références bibliographiques

Mataragas, M., Drosinos, E.H., Tsakalidou, E. et Metaxopoulos, J. (2004). Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostocmesenteroides*L124 and *Lactobacillus curvatus*L442. *Antonie van Leeuwenhoek*. **85**:191-198.

MazaliJ., 1992 - Bioconversion de permeat de lactosérum par de cellules lactobacilles in mobilisées sur un support solide. Mémoire. Université du Québec. INRS-EA: pp 5-7.

Mkrtchyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K. (2010). Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillusacidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents.*,**35**: 255-260.

Mkrtchyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K. (2010). Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillusacidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents.*, 35:255-260.

Moëller,V. 1955. Simplified tests of someaminoaciddecarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 36: 158-172

Moll, G. N., Konings, W. N.,Drissen, A. J. M. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leewenhoek*, 76:185-198.

Moraes, M. P., Perin, L. M., Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., Nero, L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *FoodSci.Technol.*, 43:1320-1324.

N

Nazef, L., Belguesmia, Y., Tani, A., Prévost, H., Drider, D. (2008). Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence of anti-*Campylobacter* and anti-*Listeria* activities. *Poultry Science*, 87:1-6.

Nes I. F., Diep D. B., Havarstein L. S., Brurberg M. B., Eijsink V. et Holo H., (1996).Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 2-4.

Références bibliographiques

Novel G., (1993). Les bactéries lactiques in « Microbiologie industrielle » les microorganismes d'intérêt industriel. Ed. LE VEAU, G. V., BOUIX, M. Techniques et Documentation Lavoisier. Paris. PP. 171-215.

Nigatu JM, Tuji FA, Tefera AT (2015). Evaluation of the antagonistic effect of six mixed cultures of lactic acid bacteria, isolated from the Ethiopian fermented milk ergo, against some food-borne pathogens inoculated into the Ethiopian cottage cheese ayib. *Afr. J. Microbol. Res.* 9(29):1789-1797.

O

Orla-Jensen., 1919 - The Lactic bacteria *Hosledson* copen: 74: pp 131-142. **O'Sullivan L, Ross RP, Hill C, 2002.** Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84:593-604.

P

Pal, A., Ramana, K.V. et Bawa, A.S. (2010). Simplification and optimization of de Man Rogosa Sharpe (MRS) medium for enhanced production of bacteriocin by *Weissella paramesenteroides* DFR-8. *J Food Sci Technol.* 47:258-265.

Pandey A., Bringel F., Meyer J M., 1994 - Iron requirement and research for siderophores in lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: pp 735-739.

Piard J. C. et Desmaseud M., (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2- bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72: 113-142.

Pinto, A. L., Fernandes, M., Pinto, C., Albano, H., Castilho, F., Teixeira, P., Gibbs, P. A. (2009). Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control nonfermented seafood. *Int. J. Food Microbiol.*, 129:50-58.

Poulain., 1994 - Evaluation de la préparation commerciale des ferments lactiques in les bactéries lactiques T1. Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Loriga. Lavoisier: 604 P.

Price, R.J. et Lee, J.S. (1970). Inhibition of *Pseudomonas* spp by hydrogen peroxide producing lactobacilli. *J Mille Food Technol.* 33 :13-16.

Références bibliographiques

R

Ray B., (1992) Pediocin of *pediococcusacidilactici* as food bioperservatives in food preservatives of microbial origina .Ed: RAY B. and Daeschel M.A .BOCA Raton , CRC press 265-32.

Raynaud S., 2006 - Regulation métabolique et transcriptionnelle de l'auto acidification chez *Lactococcuslactis*. Thèse de doctorat. L'institut national des sciences appliquées de Toulouse : 21p.

Riley, M.A., Wertz, J.E. (2002).lacteriocins: évolution, ecology. and application. *AnnuRevMicrobiol.* 56:117-137.

Ruiz-Barba, J. L., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragán, A., Jiménez-Díaz, R. (2010). Coculture with specific bacteria enhances survival of *Lactobacillus plantarum*NC8, an autoinducerregulatedbacteriocin producer, in olive fermentations. *Food Microbiol.*, 27:413-417.

S

Sabia, C., Anacarso, I., Bergonzini, A., Gargiulo, R., Sarti, M., Condò, C., Messi, P., De niederhausern, S., Iseppi, R. & Bondi, M. 2014. Detection and partial characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus fermentum* CS57 isolatedfromhuman vaginal secretions. *Anaerobe*, 26, 41–45.

SallofeCoste., 1994 -Lactis acid bacteries. Dannone News latter n°5 July.

Salminen S., Wright A V., Ouwehand A., 2004 - Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel. Dekker. Inc., U.S.A.

Sarika, A. R., Lipton, A. P., Aishwarya, M. S. (2010). Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus*GP1 under different culture conditions. *Adv. J. Food Sci. Technol.* , 2:291-297.

Savijoki K., Ingmer H., et Varmanen P., (2006).Proteolytic Systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 394-406.

Références bibliographiques

Schobitz R., Suaz V., Costa M. & Ciampi L., (2003) Effects of bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolates of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 5, 1081-1094.

Schved F., Laizar A., Lindner P. et Juven B. J., (1994). Interaction of the bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactis* SJI with the cell envelope of *Lactobacillus ssp*. *Applied Microbiology*, 19: 281-283.

Sharma, S., Garg, A.P., Singh, G. (2010). Optimization of fermentation conditions for bacteriocin production *Lactococcus lactis* CCSULAC1 in modified MRS medium. *Int. J. Dairy Sci.*, 5:1-9.

Singleton, P. 1999. Bactériologie. 4ème Edition. Dunod, Paris. 317 pages.

Smaoui, S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.

Stackendgrandt, E. et Tenber, M. (1988). *Biochimie*. 70:317.

Stiles M E. and Holzappel W H., 1997 - Lactic acid bacteria of foods and their current. Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*: 36: pp1-29.

T

Tabasco, R., García-Cayuela, T., Peláez, C., Requena, T. (2009). *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 132:109-116.

Tagg J. R., Dajoni A. S. et Wannamper L. W., (1976). Bacteriocin of gram positive bacteria. *Bacteriological review*, 40: 722-756.

Tagg J.R., et Mc Given A.R., (1971). Assay System for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* 21: p. 943.

Talarico, T.L., Axelsson, L.T., Novotny, J., Fiuzat, M. et Dobrogosz, W. (1990). Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*. *Appl Environ Microbiol.* 56:1195- 1197.

Références bibliographiques

Teuber Michael, Geis Arnold, 2006. The Genus *Lactococcus*. *Prokaryotes*4: 205-228

Thakur, R.L. et Roy, U. (2009). Antibacterial activity of *Leuconostoc lactis* isolated from raw cattle milk and its preliminary optimization for the bacteriocin production. *Res. J. Microbiol.* , 4:122-131.

Todorov S.D., et Dicks L.M., (2007). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. *Braz. J. Microbiol.* 38: 166-172.

Todorov, S. D. et Dicks, L. M. T. (2005). Growth parameters influencing the production of *Lactobacillus rhamnosus* bacteriocins ST461BZ and ST462BZ. *Ann. Microbiol.*, 55: 283-289.

Tong, Z., Dong, L., Zhou, L., Tao, R., Ni, L. (2010). Nisin inhibits dental caries-associated microorganisms in vitro. *Peptides*, 31:2003-2008.

U

Uehara, S., Monden, K., Nomoto, K., Seno, Y., Kariyama, R., Kumon, H. (2006). A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Int. J. Antimicrobial Agents*, 28:30-34.

V

Vaillancourt K., Moineau S., Frenette M., Lessard C. and Vadeboncoeur C., 2002 - Galactose and Lactose Genes from the Galactose-Positive Bacterium *Streptococcus salivarius* and the Phylogenetically Related Galactose-Negative Bacterium *Streptococcus thermophilus*: Organization. Sequence. Transcription. and Activity of the gal Gene Products. *Journal of Bacteriology*: 184: pp 785-793.

Van den Bogaard P T C., Hols P., Kleerebezem M., Kuipers O P. and de Vos W M., 2004 - Sugar utilization and conservation of the gal-lac gene cluster in *Streptococcus thermophilus*. *Syst. Appl. Microbiol.*: 27: pp 10-17.

Verluyten, J., Leory, F., De Vuyst, L. (2004). Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:5081- 5088

Références bibliographiques

W

Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J. (2006). Dairy science and technology. Taylor&Francis, New York.

Wood BJ B. et Holzapfel W H (éditeur), 1995 - The Lactic acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria 2nd Ed, Blackie Academic and Professional London: 2: pp 40-90.

X

Xie, Y., An, H., Hao, Y., Qin, Q., Huang, Y., Luo, Y., Zhang, L. (2011). Characterization of an anti- *Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. *Food Control* , 22:1027-1031.

Y

Yang, R. et Ray, B. (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* **11**: 281-291.

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

ANNEXES

Bouillon nutritif :

Extrait de viande.....	5g/L
Peptone.....	10g/L
Chlorure de sodium.....	5,0g/L
Eau distillée	1000 ml
pH = 7,2	

Chapman: (Guiraud, 1998)

Peptone.....	10 g
Extrait de viande de bœuf.....	1 g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol.....	10 g
Rouge de phénol.....	0,025 g
Agar-Agar	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 7,4	

Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960) :

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure.....	5g
Glucose	20g
Tween 80.....	1 ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate de sodium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse	0.05g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 6.5.	

Autoclaver à 120°C/20mn

- **Gélose MRS** : Bouillon MRS additionné de gélose à raison de 1.5 %

Gélose Nutritive :

Peptone..... 5,0 g
Extrait de viande.....1,0 g
Extrait de levure..... 2,0 g
Chlorure de sodium..... 5,0 g
Agar agar12,0 g
L'eau distillée.....1000 ml
pH = 7.

Eau physiologie :

NaCl9 g
Eau distillée.....1000 ml

Autoclaver à 120°C/20mn

Lait de Sherman au bleu de méthylène :

Lait de Sherman à 0,1% :

- 9ml de lait écrémé stérilisé en tubes (115°C – 10min)
- 1ml de bleu de méthylène à 1 % stérilisé 20min à 120°C

Lait de Sherman à 0,3% :

- 9ml de lait écrémé stérilisé en tubes (115°C – 10min)
- 1ml de bleu de méthylène à 3% stérilisé 20min à 120°C

Bleu de méthylène :

Peptone	10 g
Lactose	10 g
Éosine	0,4 g
Bleu de méthylène	0,0625g
Hydrogénophosphate de potassium	2 g
Agar	15 g

pH = 6,8

Gélose Nutritive semi solide:

Peptone.....	5,0 g
Extrait de viande.....	1,0 g
Extrait de levure.....	2,0 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
Agar agar	6.0 g
L'eau distillée.....	1000 ml

pH = 7.

Mac Conkey:

Peptone.....	20,0 g
Lactose.....	10,0 g
Sel biliaires n°	31,5 g
Cristal violet	0,001 g
Rouge neutre	0,05 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar.....	15,0 g



6715 UV / Vis .spectrophotometer



ROTOFIX 32 A