



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

*Mme KENTOURI Souad*

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité: MICROBIOLOGIE-FONDAMENTALE ET APPLIQUÉE**

THÈME

*Etude de l'effet des bactériocines  
produites par les bactéries lactiques  
sur les bactéries pathogènes*

Soutenue publiquement le 29/06/2016

DEVANT LE JURY

Président	Mr CHERIGUENE Abderrahim	Prof U. Mostaganem
Encadreur	Mme CHOUGRANI Fadila	Prof U. Mostaganem
Co encadreur	Mlle ZARGOUG Amina	Doctorante U. Mostaganem
Examineur	Mr ZABOURI Younes	MAA U. Mostaganem

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

# Remerciements

« *Louange à Dieu qui nous a donné l'esprit, la volonté, le courage et le savoir* ».

Je dois l'aboutissement de ce mémoire à de nombreuses personnes. Tout d'abord, je tiens à remercier l'encadreur Mme **CHOUGRANI Fadila**, professeur à l'université *Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem*, pour l'honneur qu'elle m'a fait en dirigeant ce travail, de m'avoir permis de travailler sur un projet des plus intéressants. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour sa grande disponibilité, ses conseils et pour son écoute attentive tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Je tiens à remercier **Mlle ZARGOUG Amina** doctorante à l'université *Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem* pour l'honneur qu'elle m'a fait en codirigeant ce travail, pour sa disponibilité, ses conseils, je lui exprime ma profonde reconnaissance pour son aide précieuse.

Mes remerciements les plus sincères vont aussi à **Mr CHERIGUENE Abderrahim**, professeur à l'université *Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem*, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury.

Je tiens à remercier **Mr ZABOURI Younes** maître assistant A à l'université *Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem* d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un remerciement spécial et chaleureux à l'encontre de **Hafida**, technicienne au laboratoire de microbiologie qui m'a tant aidé sur tous les plans, merci pour tes conseils, ta gentillesse et surtout merci d'avoir été là.

Je remercie aussi l'ensemble du personnel travaillant aux laboratoires de microbiologie, Université de Mostaganem.

Mes remerciements vont également à mes enseignants qui m'ont accompagné pendant mon cursus universitaire.

Enfin j'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail surtout : **Mlle Menad, Mme Maghnia, Fadila, Djahira, Dalila, Mabrouka et Meriem.**

# *Dédicaces*

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À :

*Mon père **Mohand Ameziane**, ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation, que Dieu te donne la santé et longue vie.*

*A ma très chère mère **Hassina**, Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le Symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

*Mon cher mari **Mr. Benyagoub abdelkrim** pour ton soutien, ta compréhension, sans toi je n'aurai jamais pu continuer, tu es mon pilier, mon rock et ma force.*

*Mon beau père, ma belle mère, mon beau frère et mes belles sœurs **Fatna, Zahira, Noura, Amaria, Houria, Rahima, Soulef, Amina.***

*Mes deux anges **Mohammed Seif el islem et Meriem Alaa** qui illuminent ma vie.*

*Ma sœur **linda**, son mari et ses enfants : **Moumouh, Eléna, Daris et Adam.**  
Ma petite sœur **Tinhinane** que j'adore.*

*Mes chers frères **Lyes** et sa fiancée **Zahia** et **Nabil** que j'estime énormément.*

*Mes oncles **Zahir, Chafaa, hafid, Azeddine**, leurs femmes et enfants, mes tantes **Djamila, Chrifa, Soraya, Nadira**, leurs maris et enfants, mes grands pères et grands-mères.*

*Enfin, à mes amies et surout **Wassila.***

# SOMMAIRE

## Liste des abréviations

## Liste des tableaux

## Liste des figures

## Résumé

## Abstract

## ملخص

Introduction.....1

## Chapitre I : Bactéries lactiques

I-Définition des bactéries lactiques et leurs caractéristiques principales..... 2

II- Habitat.....4

III- Taxonomie et Classification .....4

III-1- Le genre *Lactobacillus* .....4

III-2- Le genre *Streptococcus* ..... 5

III-3- Le genre *Lactococcus*.....6

III-4- Le genre *Leuconostoc*.....6

III-5- Le genre *Bifidobacterium* ..... 6

III-6- Le genre *Pediococcus*..... 6

IV-Intérêt des bactéries lactiques ..... 7

IV-1- Dans l'industrie alimentaire .....7

IV-2 -Dans le domaine thérapeutique .....8

IV-2-1- Les bactéries lactiques comme probiotiques ..... 8

## Chapitre 2 : Interactions

I- Définition ..... 11

II- Différents types d'interactions ..... 11

II-1- Interactions directes ..... 11

Prédation et parasitisme ..... 11

Inhibition par contact direct entre les cellules ..... 11

II-2- Interactions indirectes ..... 11

➤ Mutualisme ..... 12

➤ Neutralisme ..... 12

➤ Commensalisme ..... 12

➤ Compétition..... 12

➤ Quorum sensing ..... 12

➤ Antagonisme ..... 12

III- Facteurs inhibiteurs..... 13

II-1- Acides carboxyliques..... 13

II-2- Peroxyde d'hydrogène ..... 13

II-3- Phages lactiques..... 13

II-4- Le diacétyl ..... 13

II-5- Reutéline ..... 13

II-6- Le dioxyde de carbone..... 14

II-7- Les bactériocines ..... 14

## Chapitre 3 : Les bactériocines

I-Définition..... 15

II-Nomenclature ..... 15

III- Propriétés ..... 15

IV-Classification ..... 15

IV-1-Classe I Lantibiotiques..... 16

IV-2- Bactériocine de classe II .....	17
IV-3- bactériocines de classe III .....	17
V-Mode d'action .....	18
V-2-Les bactériocines de classe II .....	18
V-3-Les bactériocines de Classe III .....	18
VI- les applications des bactériocines .....	18
VI-1- Dans le secteur alimentaire .....	19
VI-2-Dans le secteur sanitaire.....	19
VII-Spectre d'immunité .....	19
VIII- Mise en évidence de l'activité bactériocinogène .....	20
A-Test des spots (spot on the lawn) .....	20
B-Méthode des puits .....	20
C- Méthode des disques .....	21
D-Méthode de plaques de gélose .....	21
IX- Méthodes de purification des bactériocines .....	21
IX -1- Précipitation au sulfate d'ammonium .....	21
IX -2- Adsorption-désorption.....	22
IX -3- Dialyse .....	22
IX-4 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS .....	22
IX-5- Chromatographie d'exclusion stérique (gel-filtration) .....	23

## Matériel et méthodes

I-Matériel .....	24
I-1-Milieus de culture .....	24
I-2-Matériel biologique .....	24
II-Méthodes.....	25
II-1-Revivification et purification des cultures des bactéries lactiques .....	25
II-2- Conservation à courte durée des souches .....	25
II-3-Conservation à longue durée .....	25
II-4-Identification et confirmation des bactéries lactiques .....	26
II-4-1-Tests morphologiques.....	26
A-L'aspect macroscopique .....	26
B-L'aspect microscopique .....	26
Coloration de Gram .....	26
II-4-2-Tests physiologiques et biochimiques.....	26
❖ Test catalase .....	26
❖ Effet de NaCl, du pH et de la température.....	27
❖ La Thermorésistance .....	27
❖ Milieu Mannitol-mobilité .....	27
❖ Type fermentaire .....	27
❖ Production de dextrane.....	27
❖ Croissance sur lait bleu de Sherman .....	27
❖ Galerie API 20 Strep (bio Mérieux) .....	28
II-5- Interaction bactéries lactiques /bactéries pathogènes .....	28
II-5-1-Préparation des pré cultures des bactéries tests (pathogènes) .....	28
II-5-2-Préparation des pré cultures des bactéries lactiques.....	29
II-5-3-Mise en évidence de l'effet antagoniste .....	29
❖ Méthode de diffusion par puits .....	29
❖ Elimination du facteur acide .....	30
❖ Effet des enzymes protéolytiques .....	30
❖ La densité optique .....	31

❖ Traitement à différentes températures.....	31
❖ Effet de la température d'incubation sur la production des bactériocines .....	31

## **Résultats et discussions**

I-Revivification et purification.....	32
II-Confirmation de l'identité des souches lactiques.....	32
II-1-Etude morphologique.....	32
➤ Critères macroscopiques .....	32
➤ Critères microscopiques .....	33
➤ Production de la catalase.....	33
II-2-Tests physiologiques et biochimiques .....	34
➤ Le type fermentaire .....	34
➤ Tests de Température, PH, NaCl, Thermorésistance .....	35
➤ Test sur milieu Mannitol-mobilité .....	36
➤ Production de dextrane.....	37
➤ Croissance sur lait bleu de Sherman .....	37
La galerie API 20 strep .....	38
II-3- Mise en évidence de l'effet antagoniste.....	39
II-4- Détermination de la nature de l'inhibition.....	40
➤ Inhibition par le surnageant.....	40
➤ Inhibitions dû à l'acide.....	41
➤ Inhibition dû aux bactériocines .....	43
➤ La densité optique .....	45
➤ Effet de la température : Thermorésistance .....	47
➤ Effet de la température d'incubation sur la production des bactériocines .....	49
<b>Conclusion</b> .....	50
<b>Références bibliographiques</b> .....	51
<b>Annexe1</b> .....	59
<b>Annexe2</b> .....	62

## Liste des abréviations

<b>MRS</b>	Mayeux, Sandine et Elliker
<b>BAL</b>	Bactéries de l'acide Lactiques
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>ADH</b>	Arginine deshydrolase
<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>ST</b>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<b>P1, P2</b>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<b>LL</b>	<i>Lactococcus lactis</i>
<b>G+C</b>	Le ratio guanine+ cytosine Coefficient de Chargaff
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>pH</b>	Potentiel hydroélectriques
<b>VP</b>	Voges Proskauer
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de carbone
<b>ATP</b>	Adinosine triphosphate
<b>mm</b>	Millimètre
<b>Lb</b>	Lactobacillus

<b>Lc</b>	Lactococcus
<b>Ln</b>	Leuconostoc
<b>NaOH</b>	Hydroxyde de sodium

# **Liste des tableaux**

<b>Tableau 01</b> : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques .....	7
<b>Tableau 02</b> : Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire et exemples des espèces prédominantes .....	8
<b>Tableau 3</b> : Principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques .....	10
<b>Tableau 4</b> : Les quartes bactériocines de la classe III.....	18
<b>Tableau5</b> : Caractéristiques des souches pathogènes.....	24
<b>Tableau6</b> : Les bactéries lactiques et leurs références .....	25
<b>Tableau 8</b> : Résultats de l'étude morphologique et du test de la catalase .....	34
<b>Tableau9</b> : Résultats des tests biochimiques effectués sur nos souches lactiques .....	37
<b>Tableau 10</b> : Résultats des diamètres des zones d'inhibition à différentes températures .....	47
<b>Tableau11</b> : Résultats des diamètres des zones d'inhibition à différentes températures d'incubation .....	49

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Voies homofermentaire et hétérofermentaire de la dégradation du glucose .....	3
<b>Figure 2:</b> Contraste de phase (A-E) et d'électrons (F) des micrographies montrant la différence de morphologie des cellules de lactobacilles.....	5
<b>Figure 3 :</b> Séquence et structure de lantibiotique de type A (Nisine), B( Mercacidine) et d'un lantibiotique « two peptides » .....	17
<b>Figure 4 :</b> schéma de la méthode de diffusion en puits.....	30
<b>Figure 5 :</b> Spectrophotomètre.....	31
<b>Figure 6:</b> Aspect des souches lactiques pures en milieu M17 liquide .....	32
<b>Figure7 :</b> Aspect des souches lactiques pures en milieu M17 solide.....	33
<b>Figure8:</b> Observations microscopiques des bactéries lactiques après une coloration de Gram avec un grossissement (G : 10x100) .....	33
<b>Figure 9 :</b> Test de la catalase .....	34
<b>Figure 10:</b> Résultats obtenus pour le type fermentaire sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de durham .....	35
<b>Figure 11:</b> Tests de : Température, pH, NaCl et Thermorésistance.....	36
<b>Figure 12:</b> résultats obtenus pour le test sur milieu mannitol-mobilité .....	36
<b>Figure 13:</b> Le test de lait de Sherman .....	37
<b>Figure 14:</b> Résultat de la galerie API 20 strep .....	38
<b>Figure 15:</b> Diamètre des zones d'inhibition formée par les souches lactiques confrontées avec les bactéries pathogènes.....	39
<b>Figure16 :</b> Zones d'inhibitions des souches lactiques vis-à-vis de <b>A :</b> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 <b>B :</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 .....	40
<b>Figure 17 :</b> Zones d'inhibitions des surnageants vis-à-vis de <b>A :</b> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 <b>B :</b> <i>E.Coli</i> ATCC 25922 .....	40
<b>Figure 18 :</b> L'effet inhibiteur des surnageants neutralisés et non neutralisés sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	41
<b>Figure 19 :</b> L'effet inhibiteur des surnageants neutralisés et non neutralisés sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	42
<b>Figure 20 :</b> L'effet inhibiteur des surnageants neutralisés et non neutralisés sur <i>E.coli</i> ATCC 25922 .....	42
<b>Figure 21 :</b> L'effet inhibiteur des surnageants neutralisés et non neutralisés sur <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 .....	42
<b>Figure 22 :</b> Effet du surnageant de <i>Lactococcus lactis</i> traité ou non avec de la pepsine sur les bactéries pathogènes.....	43
<b>Figure 23:</b> Effet du surnageant de <i>streptococcus thermophilus</i> traité ou non avec de la pepsine sur les bactéries pathogènes.....	43
<b>Figure 24:</b> Effet du surnageant de <i>Pediococcus acidilactici</i> 1 traité ou non avec de la pepsine sur les bactéries pathogènes.....	44
<b>Figure 25:</b> Effet du surnageant de <i>Pediococcus acidilactici</i> 2 traité ou non avec de la pepsine sur les bactéries pathogènes.....	44
<b>Figure 26 :</b> Effet de la pepsine sur les bactériocines .....	44
<b>Figure 27 :</b> La croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2592 après l'ajout de bactériocines de <i>L.lactis</i> , <i>S.thermophilus</i> , <i>P.acidilactici</i> 1 et 2 .....	45
<b>Figure 28 :</b> La croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 après l'ajout de bactériocines de <i>L.lactis</i> , <i>S.thermophilus</i> , <i>P.acidilactici</i> 1 et 2 .....	46
<b>Figure 29:</b> La croissance d' <i>E.Coli</i> ATCC 25922 après l'ajout de bactériocines de <i>L.lactis</i> , <i>S.thermophilus</i> , <i>P.acidilactici</i> 1 et 2 .....	46
<b>Figure 30:</b> La croissance de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 après l'ajout de bactériocines de <i>L.lactis</i> , <i>S.thermophilus</i> , <i>P.acidilactici</i> 1 et 2 .....	47



# Résumé

Les bactéries lactiques sont très utilisées en industrie agro alimentaire grâce à leur rôle dans la fermentation et la conservation des aliments par production de plusieurs facteurs inhibiteurs et tel est l'objectif de ce travail qui consiste à rechercher le pouvoir antagoniste de quatre souches lactiques qui sont *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* et deux souches de *Pediococcus acidilactici* après les avoir revivifié et confirmé leur pureté et leur identité par des tests morphologiques et biochimiques vis-à-vis les bactéries pathogènes et d'altération.

La méthode de *Barefoot al, 1983* utilisée dans cette recherche nous a montré que ces bactéries lactiques exercent un effet inhibiteur sur les bactéries pathogènes avec des diamètres de zones d'inhibition différents d'une bactérie à l'autre.

En effet, les souches lactiques exercent un effet fortement inhibiteur sur la croissance des bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) avec des diamètres élevés compris entre 16mm et 20mm et un effet modéré « selon les souches » vis-à-vis des espèces Gram négatif (*E. coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) avec des diamètres de 4mm, 6mm et de 0, 7mm, 9mm respectivement et pour *Candida albicans* ATCC 10231, le diamètre est de 6mm seulement pour *Lactococcus lactis*.

Le test de sensibilité des bactériocines vis-à-vis de la pepsine nous a montré qu'elles sont sensibles à l'action enzymatique de cette dernière et ça nous a confirmé que ces substances antagonistes sécrétées par nos bactéries lactiques sont de nature protéique ou glucoprotéique ou lipoprotéique ;

La mesure de la densité optique des bactéries nuisibles montre qu'après une croissance rapide, le nombre de bactéries diminue rapidement après avoir ajouté le surnageant de la bactérie lactique qui contient au moins une bactériocine.

Nos isolats se sont avérés thermostables aux traitements thermiques de 30min à 80°C et à 100°C pendant 15 minutes mais ils sont thermosensibles au traitement de 120°C pendant 10 minutes et l'optimum de production des bactériocines est à une température de 30°C et 37°C.

Ces caractéristiques font penser que ces substances sont extracellulaires, thermostables et de nature protéique ce qui confirme que ce sont des bactériocines. Ces résultats suggèrent que l'utilisation des bactéries lactiques comme probiotiques permettrait de bien protéger l'homme contre les bactéries responsables des pathologies gastro-intestinales.

**Mots clés** : bactéries lactiques, bactéries pathogènes, bactériocine, zones d'inhibition, antagonisme.

## *Summary*

Lactic acid bacteria are widely used in food industry due to their role in the fermentation and preservation of food production by several factors such inhibitors and is the goal of this work of seeking the antagonistic power of four lactic strains that are *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* and two strains of *Pediococcus acidilactici* after having revived and confirmed their purity and identity by morphological and biochemical tests against pathogenic and alteration bacteria.

The method *Barefoot and al, 1983* used in this research has shown that these lactic acid bacteria exert an inhibitory effect on pathogenic bacteria with different zones of inhibition diameters from one bacterium to another.

Indeed, the lactic strains exert a strong inhibitory effect of the growth of Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) with diameters between 16mm and 20mm and a moderate effect according to strains against the Gram-negative species (*E. coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginos* ATCC 27853) with diameters of 4mm and 6mm and 0, 7mm, 9mm respectively and *Candida albicans* ATCC 10231 with the diameter of 6mm only for *Lactococcus lactis*.

Measuring the optical density of the harmful bacteria shows that after rapid growth, the number of bacteria decreases rapidly after adding the supernatant of the lactic acid bacterium which contains at least one bacteriocin. Our isolates were found thermostable to heat treatment for 30 minutes at 80 ° C and 100 ° C pendant 15 minutes but they are heat sensitive to the treatment of 120 ° C for 10 minutes and optimum production of bacteriocins is at a temperature of 30 ° C and 37 ° C.

These characteristics suggest that these substances are extracellular, heat stable and proteinaceous confirming that they are bacteriocins. These results suggest that the use of lactic acid bacteria as probiotics permettrait well protect humans against the bacteria causing gastrointestinal diseases.

**Keywords:** lactic acid bacteria, pathogenic bacteria, bacteriocin, zones of inhibition, antagonism.

## ملخص

تستخدم بكتيريا حمض اللاكتيك على نطاق واسع في الصناعات الغذائية نظرا ل دورها في التخمر و الحفاظ على إنتاج الغذاء من خلال عدة عوامل مثل مثبطات و هو الهدف من هذا العمل بالسعي للحصول على قوة معادية من أربع سلالات اللبنية التي هي *Streptococcus thermophilus*، *Lactococcus lactis* و سلالتين *Pediococcus acidilactici* من بعد أن أحيا و أكد النقاء و الهوية عن طريق الاختبارات الشكلية والكيميائية الحيوية وجها لوجه البكتيريا المسببة للأمراض. وقد أظهرت هذه الطريقة Barefootet و آل 1983 المستخدمة في هذا البحث أن هذه بكتيريا حمض اللاكتيك تمارس تأثير كاج بشكل خاص على البكتيريا المسببة للأمراض مع مناطق مختلفة من أقطار التثبيط من البكتيريا واحد إلى آخر: في الواقع في حين *P.aeruginosa* ، بأقطار أقل أهمية : ، الشيء نفسه بالنسبة ل *E.* و *C.albicans* سلالات اللبنية تمارس تأثير مثبط قوي لنمو البكتيريا إيجابية الجرام ( المكورات العنقودية الذهبية ATCC 25923 ) كان أقطار عالية بين 16مم و 20مم و تأثير معتدل "وفقا ل سلالات " وجها ل وجه مع الأنواع سالبة الجرام ( الاشريكية القولونية *coli* ATCC 25922 والزائفة الزنجارية ATCC 27853 ) بأقطار 4مم ، 6مم و 0، 7مم ، 9مم بالترتيب و المبيضات البيض ATCC 10231 و قطرها 6مم فقط ل *Lactococcus* اللبنية . اختبار حساسية البكتريوسين للبيسين أظهرت أنها معرضة للعمل الأنزيمية من هذا الأخير و أكد أن هذه المواد العدائية التي يفرزها بكتيريا حمض اللاكتيك لدينا هي من البروتينية أو *glucoprotéique* أو البروتين الدهني يباس الكثافة البصرية من البكتيريا الضارة تبين أنه بعد النمو السريع ، و عدد من البكتيريا يتناقص بسرعة بعد إضافة طاف من بكتيريا حمض اللبنيك الذي يحتوي على مبيد جرثومي واحد على الأقل . تم العثور على دينا العزلات بالحرارة لتسخين العلاج لمدة 30 دقيقة في 80 درجة مئوية و 100 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة الذي مناطق تثبيط تبقى تقريبا متشابهة لكنها حساسة لحرارة علاج 120 درجة مئوية لمدة 10 دقيقة والإنتاج الأمثل لل *bacteriocins* هو في درجة حرارة 30 درجة مئوية و 37 درجة مئوية. وتشير هذه الخصائص أن هذه المواد هي خارج الخلية ، حرارة مستقرة و البروتينية مؤكدا أنهم *bacteriocins* . وتشير هذه النتائج إلى أن استخدام بكتيريا حمض اللاكتيك كما يمكن للبروبيوتيك كذلك حماية الإنسان ضد البكتيريا المسببة لل أمراض في الجهاز الهضمي .

**كلمات البحث:** بكتيريا حمض اللاكتيك و البكتيريا المسببة للأمراض، *bacteriocin* ومناطق مبيد جرثومي من كبت، العداء .

# *Introduction*

## **Introduction**

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation des aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de levains naturels (*Chammas et al, 2006; Zamfir et al, 2006*).

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Elles sont impliquées dans un grand nombre de

fermentations spontanées de produits alimentaires (*Stiles et al, 1997*), ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (*Klaenhammer et al, 2005*).Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (*Abee, 1995 ; Hugenholtz et al, 1999*).

Les bactéries lactiques sont connues pour leur aptitude à produire des composés antibactériens leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. Parmi les substances synthétisées, des peptides, dénommés bactériocines, qui sont produits puis exportés à l'extérieur des cellules productrices.

Les bactéries productrices de bactériocines sont largement répandues dans la nature, elles ont été isolées de nombreuses sources telles que les produits laitiers (*Ayad et al., 2004; Aslim et al., 2005*), les saucissons fermentés (*Herranz et al., 2001; Noonpakdee et al., 2003*), les produits halieutiques (*Ostergaard et al., 1998*), les produits végétaux (*Uhlman et al., 1992*), l'ensilage (*Vlaemynck et al., 1994*) et même le tractus gastro-intestinal des mammifères (*Pattnaik et al,2005*).

Dans ce contexte, ce travail consiste à rechercher l'activité antagoniste de souches lactiques vis à vis des bactéries pathogènes en suivant les étapes suivantes :

- ❖ La première partie consiste à revivifier et repiquer les bactéries lactiques et les bactéries pathogènes dans leurs milieux appropriés.
- ❖ Dans la deuxième partie, on envisage d'effectuer des tests physiologiques et biochimiques sur les bactéries lactiques.
- ❖ Dans la troisième partie, nous rechercherons l'activité antagoniste des souches lactiques vis à vis des bactéries pathogènes
- ❖ Et enfin, nous allons déterminer la nature du facteur inhibiteur : acide ou bactériocine.

# *La synthèse bibliographique*

# *Chapitre 1*

## *Les bactéries lactiques*

### **I-Définition des bactéries lactiques et leurs caractéristiques principales :**

Les bactéries lactiques appelées aussi les bactéries de l'acide lactique (BAL) constituent un groupe très hétérogène de microorganismes partageant divers aspects morphologiques, métaboliques et physiologiques et dont la caractéristique fondamentale est la production de quantités appréciables de l'acide lactique comme produit principal de leur métabolisme fermentaire (*Marshall et Law, 1984 ; Axelsson, 1993*).

Les bactéries lactiques sont un groupe de bacilles ou coccobacilles à Gram positif qui ont moins de 55 % de contenu G+C dans leur ADN (à l'exception des bifidobactéries (*Ammour., 2004*)). ce sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimioorganotrophes. Elles sont Gram

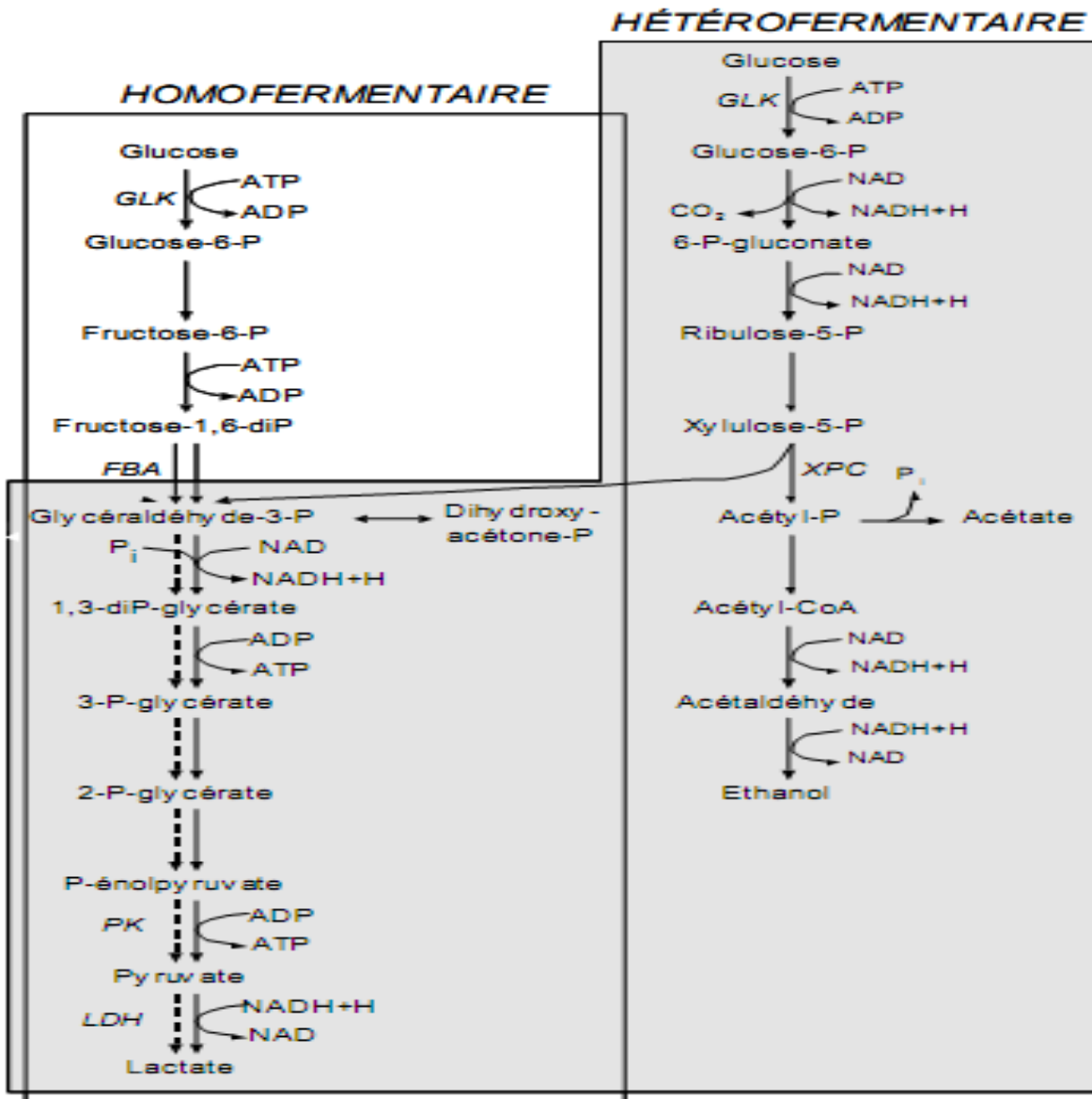
positives, généralement immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotoles (microaérophiles). Elles sont dépourvues de nombreuses activités enzymatiques comme la catalase, la nitrate réductase et la cytochrome oxydase, aussi elles ne produisent pas d'indole ni acide sulfhydrique et certaines espèces hydrolysent la caséine. En raison de leur faible capacité biosynthétique, ces bactéries ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles. (*Dellaglio et al, 1994*)

Il est possible de classer les BAL suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides. En effet, les bactéries homolactiques strictes produisent uniquement de l'acide lactique alors que les bactéries hétérolactiques peuvent produire de l'acide acétique, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> en plus de l'acide lactique. Les BAL homolactiques sont représentées par les genres *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Entérocooccus* et certaines espèces de *Lactobacillus*, alors que le genre *Leuconostoc* et certaines espèces de *Lactobacillus* appartient aux hétérolactiques. Il faut signaler, cependant qu'en fonction de la disponibilité en oxygène et en glucose, une souche homofermentaire peut se convertir en hétérofermentaire (*Rhee et Pack, 1980 ; Murphy et al, 1985 ; Borch et al, 1991*). Certaines espèces peuvent, en plus, de produire de l'acide formique ou succinique. La production de ces acides engendre la diminution du PH, qui inhibe la croissance des bactéries sporulantes et d'autres pathogènes, à cet égard il faut ajouter la capacité inhibitrice du propre acide lactique (*Smulders et al ,1986 ; Brackett, 1987*). En outre, les bactéries lactiques produisent des substances antagonistes spécifiques comme les antibiotiques et les bactériocines (*Tagg et al, 1976 ; Klaenhammer, 1993 ; Requena et Plaetz, 1995*)

Les bactéries lactiques qui ont un métabolisme homofermentaires sont : *lactocoques*, *pédiocoques* et quelque *lactobacille*. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (*Thompson et Gentry-Weeks., 1994*)

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique (moins de 1,8 moles par mole de glucose), de l'acétate, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> sont dites

hétérofermentaires. Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *leuconostocs* et certains *lactobacilles*. (*Thompson et Gentry-Weeks, 1994*)



**Figure 1:** Voies homofermentaire et hétérofermentaire de la dégradation du glucose. Les principales enzymes sont : **GLK** : glucokinase, **FBA** : fructose-1,6-bisphosphate aldolase, **XPC** : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, **PK** : pyruvate kinase, **LDH** : lactate déshydrogénase. (Raynaud, 2006)

**II-Habitat :**

Grace à leur souplesse d'adaptation physiologique, les bactéries lactiques peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique. Dans différents écosystèmes, les BAL sont capables d'exercer des effets bénéfiques ou plus rarement d'engendrer des altérations biologiques.

La source originale des bactéries lactiques est constituée par les plantes vertes, et suite à des processus d'évolution et d'adaptation, ces bactéries ont colonisé d'autres environnements et se trouvent ainsi dans divers habitats, tant que ceux-ci réunissent les conditions adéquates pour satisfaire leurs besoins nutritifs (*Fenton, 1987 ; Kelly et al, 1998 ; Carr et al, 2002*). De cette manière, le lait auquel les BAL peuvent accéder à travers le corps de l'animal, les excréments ou les végétaux, est devenu un habitat caractéristique des bactéries lactiques, et ainsi elles se trouvent associées à divers produits laitiers fermentés (*Dellaglio et al, 1994*). Il faut signaler en outre que les BAL font parti de la microflore naturelle de la bouche, du tractus intestinal et du vagin de l'espèce humaine et de nombreux animaux homéothermes (*Holzappel et al, 1998 ; Sookkhee et al, 2001*)

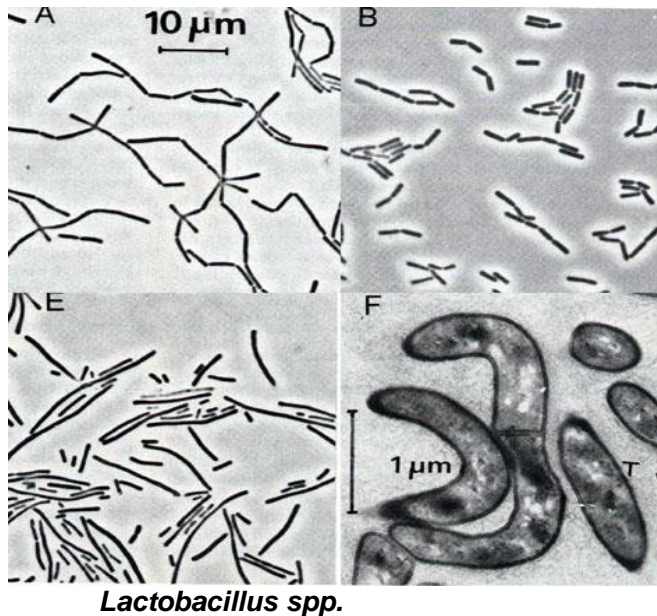
### **III-Taxonomie et classification**

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (*De Roissart et Luquet, 1994; Holzappel et al, 2001*).

Les genres les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Pediococcus* (*Drouault et Corthier, 2001*). Actuellement le groupe des bactéries lactiques associées aux aliments renferme les 12 genres suivantes : *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* et *Bifidobacterium*

#### **III-1- Le genre *Lactobacillus* :**

Les bactéries du genre *Lactobacillus* ont des aspects variés allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Ils sont Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînettes et habituellement immobiles. Les lactobacilles se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (*Siegumfeldt et al, 2000*). Les lactobacilles se répartissent en trois groupes selon leur profil fermentaire, d'après la classification de *Kandler et Weiss (1986)*



**Figure 2:** Contraste de phase (A-E) et d'électrons (F) des micrographies montrant la différence de morphologie des cellules de lactobacilles (*DE Vos et al, 2009*)

**A :** *Lactobacillus gasseri* **B :** *Lactobacillus agilis* **E :** *Lactobacillus fermentum* **F :** La forme de l'involution des lactobacilles dans une lame mince d'un grain de kéfir.

**Groupe I :** Il comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (*croissance à 45°C*) dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus*. La plupart des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers. (*Laurent, 1998*).

**Groupe II :** Ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration en glucose limitante. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles (*Laurent, 1998*).

**Groupe III :** Il est constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires, c'est-à-dire utilisant la voie des pentoses phosphates pour la fermentation des hexoses et des pentoses. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*, Outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'homme, et participent à l'équilibre de la flore intestinale (*Laurent, 1998*).

### **III-2- Le genre Streptococcus**

Comprend essentiellement des espèces d'origine humaine ou animale dont certaines sont pathogènes comme *S. pyogenes* et *S. agalactiae* d'autres sont impliquées dans la formation de la plaque dentaire (*S. mutans*). L'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène. Du fait de ses propriétés technologiques, c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique (*Laurent, 1998*).

### **III-3- Le genre *Lactococcus* :**

Le genre *Lactococcus* est formé de bactéries à Gram positif dont les cellules, en forme de coques, sont associées par paires ou en chaînettes de longueur variable. Elles sont dépourvues de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence (anaérobies aérotolérantes). Ces bactéries sont thermosensibles et ne peuvent pas croître en présence de 6.5% de NaCl ou à pH 9.6. Leur température optimale de croissance s'étend de 25 à 35°C, respectivement pour les souches de *Lc. cremoris* et *Lc. lactis*. Les *Lactococcus* sont capables de croître à 10°C mais pas à une température supérieure à 40°C (*Dellaglio et al, 1994*).

### **III-4- Le genre *Leuconostoc* :**

La famille des leuconostocaceae, contient des coques ovoïdes, pouvant être allongés ou elliptiques. Ce sont des cellules sphériques disposent en paire ou en chaîne, elles sont caractérisées par un métabolisme hétérofermentaire en convertissant le glucose en D-lactate et éthanol ou en acide acétique par la voie de transcétolase, elles sont incapables de dégrader l'arginine ce qui leurs distinguent des lactobacilles hétérofermentaires (*Gonzalez et al, 2007*). On range habituellement les leuconostocs dans les anaérobies facultatifs, mais certains les considèrent comme des anaérobies aérotolérants. Ils sont exigeants et présentent souvent une auxotrophe pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et les glucides (*Dellaglio et al, 1994*). Ce genre comprend les espèces suivantes : *Ln. mesenteroides* avec ces sous espèce *mesenteroides cremoris* et *dextranicum* et *Ln. lactis* et *Ln. Pseudomesenteroides* et *Ln. paramesenteroides* (*Collins et al, 1993 ; Laease, 2005*).

### **III-5- Le genre *Bifidobacterium* :**

Les cellules de *Bifidobacterium* se caractérisent par leur forme très irrégulière, souvent en V et Y, mais pouvant être coccoïde. Elles se différencient des autres bactéries lactiques par leur caractère anaérobie, leur G + C % élevé, et la présence d'une enzyme, la fructose-6-phosphate phosphocétolase. Celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique (rapport 3:2), ainsi qu'en moindre proportion de l'éthanol et d'autres acides organiques. Cette fermentation « lactique » a conduit à les rapprocher du groupe des bactéries lactiques. Leur température optimale de croissance est comprise entre 37°C et 41°C. Elles se développent à pH supérieur à 5. Elles sont isolées de l'homme et des animaux (*Laurent, 1998*).

### **III-6- Le genre *Pediococcus* :**

Rassemble des coques homofermentaires dont la particularité qui les différencie des autres genres est le regroupement en paires ou en tétrades. Le genre *Pediococcus* est mésophile. Leur exigence nutritionnelle, leur faible activité protéolytique et le plus souvent leur incapacité à utiliser le lactose, ne leur permettent pas d'acidifier et de coaguler le lait. Leur fermentation homolactique donne parfois de l'acide lactique racémique (acide D. L.-lactique) mais, fréquemment la forme lévogyre L prédomine: les espèces osmophiles non acidophiles ne donnent que cette forme. Ce genre est parfois utilisé comme levain lactique pour les charcuteries (*Guiraud, 1998*).

**Tableau 01** : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Laurent, 1998).

Genre	Morphologie	Fermentation	Température optimale	Nombre d'espèces
<i>Lactobacilles</i>	Bacilles	Homo ou hétérofermentaires	thermophiles ou mésophiles	G1 :23 G2 :16 G3 :22
<i>Lactococcus</i>	Coques	homofermentaires	Mésophiles	5
<i>Streptococcus</i>	Coques	homofermentaires	mésophiles ou thermophiles	19
<i>Leuconostoc</i>	Coques	hétérofermentaires	Mésophiles	11
<i>Bifidobacterium</i>	forme irrégulière	acide acétique et lactique	Mésophiles	25

#### **IV-Intérêt des bactéries lactiques :**

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

##### **IV-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*, *Streptococcus 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 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 et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (*Marth et Steele, 2001*).

**Tableau 02** : Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire et exemples des espèces prédominantes (*d'après McKay et Baldwin, 1990*).

<u>Applications</u>	<u>Espèces utilisées</u>
Fermentations des végétaux	<i>Ln. mesenteroides, P. pentosaceus, Lb. plantarum</i>
Fermentations de viandes et poissons	<i>Lb. plantarum, P. acidilactici</i>
Boissons alcoolisées	<i>Oenococcus oeni, Lb. delbruekii</i>
Sauce de Soja	<i>Lb. delbruekii, P. soyae</i>
Aliments fermentés indigènes	Bactéries lactiques variées
Ensilage	<i>Lb. plantarum</i>
Probiotiques	<i>Lb. Acidophilus, Lb. casei</i>
Pain au levain	<i>Lb. plantarum, Lb. brevis, Lb. sanfranciscensis, Lb. fermentum</i>
Biscuits	<i>Lb. plantarum, Lb. brevis, Lb. leichmannii, Lb. casei</i>
Produits laitiers fermentés	<i>Lc. lactis subsp lactis, Lc. lactis subsp cremoris, Lc. lactis subsp latis biovar diacetylactis, Ln. mesenteroides subsp cremoris, Ln. lactis, St. thermophilus, Lb. delbruekii subsp. bulgaricus, Lb. helveticus, Lb. casei, Lb. acidophilus</i>

#### **IV-2 -Dans le domaine thérapeutique :**

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff, selon lui les *Lactobacillus sp* pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant la flore intestinale. Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques. Les bienfaits des bactéries lactiques sont de plus en plus étudiés, certains sont bien établis d'autres restent encore controversés :

- \*Améliore la digestion de lactose.
- \*Le traitement de certaines infections ou diarrhées.
- \*Diminution du cholestérol sérique et dé-conjugaison des sels biliaires.
- \*Utilisation dans l'élaboration des vaccins (*Calvez et al, 2009*).

#### **IV-2-1- Les bactéries lactiques comme probiotiques:**

##### **a) Définition:**

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivant qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité appropriés ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (**FAO, 2001**) ils contiennent uniquement les microorganismes non pathogènes. De nombreux microorganismes sont considérés comme probiotiques, parmi eux des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, et *Streptococcus thermophilus* (*Sc. thermophilus*). *Lb. bulgaricus* et *Sc. Thermophilus* sont les premières souches bactériennes qui ont été utilisées pour la fabrication de yaourt. (**Makhloufi., 2012**).

#### **b) Rôle du probiotique :**

- Ils participent à l'activation de l'immunité et à la réduction d'allergies chez les sujets à risque.
- La résistance à l'acide gastrique et à la bile, permet aux probiotiques de survivre dans le tube digestif où réside une partie de l'immunité
- Les probiotiques participent au développement du système immunitaire chez le nourrisson et l'améliorent chez la personne âgée en augmentant le nombre de phagocytes et de lymphocytes Natural killer, premières défense contre un agent exogène.
- Ils agissent également sur l'immunité en colonisant le tractus intestinal, réalisant ainsi « un effet barrière » empêche d'une part la colonisation de l'épithélium par des pathogènes et renforce d'autre part l'immunité au niveau des muqueuses intestinales en augmentant la production d'IgA et de mucus, défenses locales au niveau des muqueuses. (**Makhloufi., 2012**).

#### **c) Applications des probiotiques :**

- Grâce à leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques utilisées par les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, les probiotiques sont parfois utilisés comme compléments dans des produits comme les yaourts ou bien dans des préparations pharmaceutiques sous forme de gélules. De nombreuses souches bactériennes ont montré leurs bénéfices sur la santé humaine et sont déjà commercialisées par Danone telles que *Bifidobacterium lactis*. (**Makhloufi., 2012**).

##### **• Traitement des diarrhées**

Les souches probiotiques *Lb. acidophilus* et *Lb. casei*, qu'on retrouve entre autre dans le lait fermenté, ont fait l'objet d'études montrant leur efficacité contre la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques en milieu hospitalier (**Penner et al, 2005**).

##### **• Traitements gastriques**

Des travaux prometteurs sur l'amélioration des traitements gastriques sont en cours sur la conjonction des probiotiques aux antibiotiques en vue de limiter les infections à *Helicobacter pylori*, une bactérie impliquée dans la survenue et les récurrences des gastrites et ulcères gastroduodénaux. Les études sur ce traitement se poursuivent car son efficacité reste à démontrer (**Reid et al, 2003**).

Les applications des probiotiques se sont énormément étendues ces dernières années, tant dans le domaine agroalimentaire que médical.

**Tableau 3 : Principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (PATTERSON, 2008)**

<u>Effets intestinaux</u>	<u>Effets sur le système immunitaire</u>	<u>Autres effets</u>
<p>Contrôle des troubles suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mauvaise digestion du lactose</li> <li>• Diarrhée due aux rétrovirus</li> <li>• Syndrome du colon irritable</li> <li>• Infection par <i>Héliobactrer Pylori</i></li> <li>• Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle</li> <li>• Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (colite ulcéreuse et maladie de Crohn)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulation immunitaire</li> <li>• Réduction des réactions des risques d'infection par des agents pathogènes courants (<i>Salmonella, shigella</i>)</li> <li>• Répression des réactions allergiques par réduction de l'inflammation.</li> </ul>	<p>Réduction du risque de :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Maladie de voies urinaires</li> <li>• Certains cancers (colorectal, vessie, Col utérin, sein)</li> <li>• Coronaropathie</li> <li>• Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes</li> <li>• Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle</li> </ul>

*Chapitre 2*  
*Interactions*  
*microbiennes*

## **I- Définition :**

L'évolution des conditions physico-chimiques et la disponibilité en nutriments sont des éléments importants pour le développement des micro-organismes. Ils peuvent ainsi générer des phénomènes d'interaction de différente nature. Tout au long du processus de fabrication, on observe une dynamique au sein des populations. Certains micro-organismes se multiplient activement, alors que d'autres tendent à disparaître (*Nissen et al, 2003*).

Lorsque deux populations différentes de micro-organismes partagent le même environnement, des interactions peuvent s'établir entre elles. Ces phénomènes sont relativement fréquents en oenologie en raison de la non-stérilité des milieux de fermentation (*Nissen et al, 2003*).

## **II- Différents types d'interactions :**

Il existe deux types d'interactions : directe et indirecte.

### **II-1- Interactions directes :**

Impliquent un contact entre deux micro-organismes et comprennent la prédation, le parasitisme, la symbiose et l'inhibition par contact direct entre les cellules ou « cell-cell contact mechanism » (*Nissen et al, 2003*).

#### ➤ **Prédation et parasitisme :**

Dans ce type de relation, l'une des espèces vit totalement au dépend de l'autre. La victime devient un substrat et est totalement digérée dans le cas de la prédation ou bien une partie de ses tissus est consommée comme dans le cas du parasitisme (*Nehem, 2008*).

#### ➤ **Inhibition par contact direct entre les cellules :**

Dans ce type d'interaction, une population de micro-organismes est inhibée par une autre et ceci par contact direct entre les cellules des deux populations lors de leur culture mixte. L'inhibition dans ce cas ne résulte ni d'une limitation en nutriments ni de la présence de métabolites extracellulaires inhibiteurs mais plutôt d'un contact direct avec les cellules de la population inhibitrice qui doit présenter une concentration élevée de cellules viables (*Nissen et al, 2003*).

### **II-2-Interactions indirectes :**

Elles sont dues à des métabolites extracellulaires et comprennent le neutralisme, le mutualisme, le commensalisme, l'amensalisme, la compétition et le « quorum sensing » (*Bailey et Ollis, 1986, Nissen et al. 2003, Kleerebezem et al. 1997*).

➤ **Mutualisme** :

On distingue deux phénomènes : le mutualisme (symbiose) et le synergisme (proto coopération) durant lesquels chaque micro-organisme est stimulé par la présence de l'autre. Dans le mutualisme, la présence de chaque micro-organisme est indispensable pour la survie de l'autre alors que dans la proto-coopération l'interaction n'est pas nécessaire à la survie des populations mais la présence des deux micro-organismes ensemble entraîne une amélioration de leur développement (*Nehem, 2008*).

➤ **Neutralisme** :

La présence d'une population n'affecte pas l'autre (*Nehem, 2008*).

➤ **Commensalisme** :

Le commensalisme est une interaction où un micro-organisme bénéficie de la présence d'un autre, sans que ce dernier en tire profit (*Siewverts et al, 2008*).

➤ **Compétition** :

Dans le cas de la compétition, les deux populations se développent sur le même substrat et consomment toutes les deux un ou plusieurs nutriments communs nécessaires à leur croissance ce qui aura un effet négatif sur leur vitesse de croissance et celle dont la vitesse de croissance est la plus affectée sera la plus désavantagée (*Nehem, 2008*).

➤ **Quorum sensing** :

Chez les bactéries Gram positives et Gram négatives, la capacité d'une population bactérienne entière d'exprimer un phénotype spécifique en réponse à de petites molécules signales solubles et dont l'expression dépend de la densité cellulaire (ex : lactones homosérines, phéromones) est définie comme étant le phénomène de « quorum sensing » (*Fuqua et al. 1996, Kleerebezem et al. 1997*).

➤ **Antagonisme** :

L'amensalisme est une interaction inter-espèces où la présence d'un ou de plusieurs micro-organismes a un effet inhibiteur sur le développement d'autres micro-organismes présents dans le même environnement, sans que le micro-organisme inhibiteur en tire le moindre profit. Certains métabolites tel que les acides carboxyliques, le lactate, le peroxyde d'hydrogène ou encore les bactériocines participent à ce phénomène (*Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Van de Guchte et al, 2001 ; Siewverts et al, 2008*).

Les effets inhibiteurs agissent sur la croissance des micro-organismes pathogènes, indigènes ou inoculés (*Siewverts et al, 2008*).

### **III- Facteurs inhibiteurs :**

#### **III-1- Acides carboxyliques :**

Dans les produits laitiers, les bactéries lactiques sont capables de produire la majorité des métabolites cités précédemment. L'acide lactique est le métabolite majeur issu du métabolisme fermentaire utilisé par certaines bactéries lactiques. Cet acide organique baisse le pH à un niveau conduisant à l'inhibition de la croissance des bactéries appartenant au genre *Listeria*, *Staphylococcus* ou *Clostridium* et des bactéries des flores de surface acido-sensibles. (*Oh et Marshall, 1993 ; Holzapfel et al, 1995*).

L'acide acétique a un effet inhibiteur plus important sur *L. monocytogenes* (*Ahamad et Marth, 1989*) mais les deux acides organiques peuvent agir de manière synergique. En effet, l'acide lactique abaisse le pH du milieu, ce qui augmente la toxicité de l'acide acétique (*Adams et Hall, 1988*). La plupart du temps, les acides organiques faibles ne diminuent pas la viabilité des micro-organismes mais retardent leur croissance en allongeant par exemple la phase de latence (*Oh et Marshall, 1993 ; Holzapfel et al, 1995*).

#### **III-2- Peroxyde d'hydrogène :**

Les bactéries lactiques sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène (*Van de Guchte et al, 2001*). Cette molécule neutre diffuse librement à travers la membrane cellulaire. Ce produit est une molécule très délétère pour la cellule réagissant sur de nombreux composants cellulaires essentiels tels que l'ADN, les protéines et les lipides ce qui entraîne la mort de la cellule. Le peroxyde d'hydrogène possède donc un effet inhibiteur sur la croissance de micro-organismes ne possédant aucun système de défense adéquat comme les catalases (*Touati, 2000*).

#### **III-3- Phages lactiques :**

Les bactériophages des bactéries lactiques sont un exemple connu de parasitisme. Lors de la fermentation, les phages peuvent subitement conduire à la lyse des souches dominantes, causant ainsi une altération du produit fermenté mais aussi des importantes pertes économiques pour les industriels (*Siewerts et al, 2008*).

#### **III-4- Le diacétyl :**

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus sp.* et *Pediococcus sp.* Le diacétyl (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (*El Ziney et al, 1998*).

#### **III-5- Reutéline :**

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels

que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium* (*El-Ziney et al, 1998*). La fermentation du glycérol se déroule en deux étapes. Le glycérol sera tout d'abord déshydraté par une « glycérol deshydratase » pour former de la reutéline qui sera ensuite réduite en 1,3-

propanediol par une oxydoréductase. Cette deuxième étape est inhibée en l'absence de glucose. La reutérine s'accumule alors dans le microorganisme producteur. A haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* y sont plus résistantes (*Vollenweider, 2004*).

La reutérine a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les procaryotes

Gram-positif ou Gram-négatif, les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires. Elle interfère avec la réplication de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (*Vollenweider, 2004*).

### **III-6- Le dioxyde de carbone :**

Intermédiaire de fermentation de certains substrats par les bactéries lactiques hétérofermentaires, le CO<sub>2</sub> crée des conditions anaérobies dans le milieu, pouvant conduire à l'élimination de bactéries aérobies strictes. Ceci peut en revanche aussi favoriser dans le même temps le développement de flores anaérobies qui peuvent être parfois néfastes. (*Papa Abdoulaye, 2011*)

### **III-7- Les bactériocines :**

Différentes définitions ont été données au cours du temps, cependant, la définition qui reste la plus largement utilisée est celle de *Klaenhammer (1988)* qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice.

# *Chapitre 3*

## *Les bactériocines*

## **I-Définition :**

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire sécrétés par les bactéries et leur synthèse s'effectue par voie ribosomique. Les bactériocines présentent une activité inhibitrice contre des bactéries taxonomiquement proches de la souche productrice (**Tagg et al, 1976**), et contre certains pathogènes tels que *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* et *Clostridium botulinum*. Leur activité peut être bactéricide (entraînant la mort cellulaire) ou bactériostatique (entraînant un ralentissement de la croissance). Les bactéries lactiques, appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Streptococcus*, produisent de nombreuses bactériocines et présentent un intérêt pour l'application industrielle grâce à leur innocuité reconnue pour l'homme et par leur utilisation depuis tout temps dans l'alimentation.

## **II-Nomenclature :**

La nomination des bactériocines est attachée soit au genre ou à l'espèce de la première souche productrice en ajoutant le suffixe "cine" pour indiquer le pouvoir létal ; par exemple: la plantaricine est la bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* (**Karthikeyan et Santhosh, 2009**).

Chez les bactéries à Gram positif, une souche peut produire plusieurs bactériocines. En effet les bactériocines qui présentent une légère modification dans les séquences d'acides aminés conservées par rapport à leur prépeptide n'affectant pas leur structure secondaire ni leur spectre d'action ni l'immunité de la souche productrice sont considérées comme étant des variantes naturelles. A titre d'exemple, les nisines Z, Q et U sont des variantes naturelles de la nisine A découverte en premier lieu (**Riley et Chavan, 2007**).

## **III-Propriétés :**

Certains critères des bactériocines produites par les bactéries lactiques justifient leur choix comme bioconservateurs (**Gálvez et al, 2007**) :

- Considérées comme 'GRAS' (Generally Recognized As Safe) ;
- Inactives et non toxiques contre les cellules eucaryotes ;
- Généralement thermostables et tolérantes aux variations du PH ;
- Possèdent un spectre d'activité relativement large ;
- Mode d'action généralement bactéricide (membrane cytoplasmique) ;
- Déterminants génétiques codés par les plasmides ;
- Sensibilité aux protéases et digestibilité dans le tractus intestinal.

## **IV-Classification des bactériocines :**

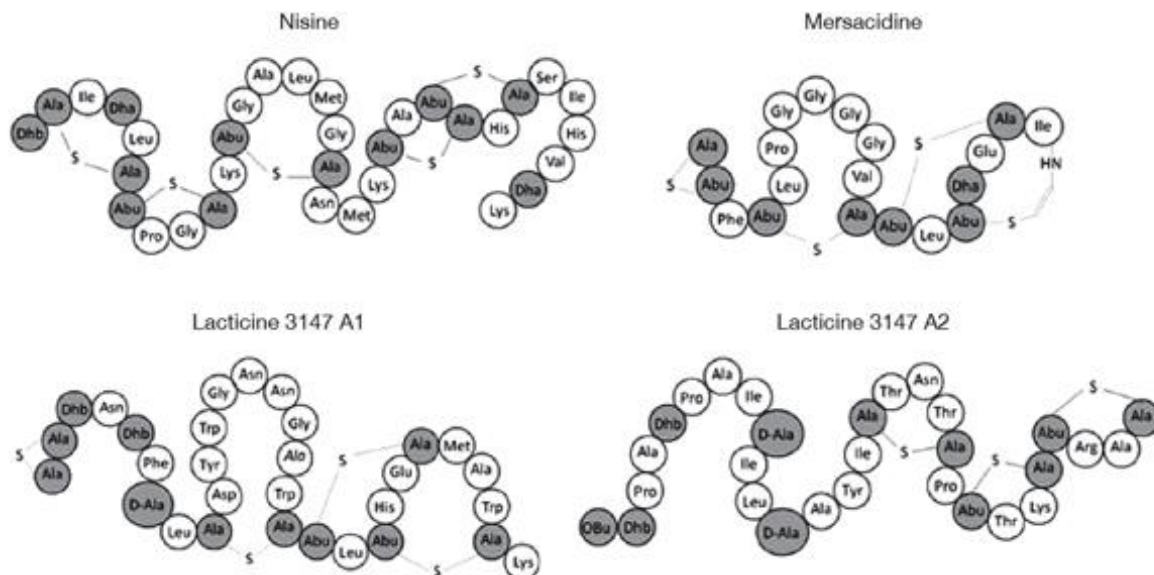
Différentes classifications de bactériocines ont été établies sur la base de : leur séquence primaire, la masse moléculaire ou la stabilité à la chaleur. La classification de **Klaenhammer (1993)** comprend quatre classes de bactériocines. Cependant l'avancée de la recherche a permis d'affiner cette classification la menant actuellement à trois classes de bactériocines.

#### **IV-1-Classe I Lantibiotiques :**

Possèdent une masse moléculaire comprise entre 1.8KDa et 4.1KDa et contiennent des acides aminés particuliers obtenus par modification post-traductionnelle (*Van Der Meer et al, 1993*), qui sont la lanthionine, la  $\beta$ -méthyl-lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine (*Carine et al, 2009*). La classe des lantibiotique est divisée en six groupes en fonction de leur homologie de séquence, on trouve les quartes groupes décrit par *Towmey et al (2002)* :

- **Groupe nisine** : Des lantibiotiques de type linéaires ; cationique structurées en hélice  $\alpha$  amphiphiles et de masse moléculaire comprise entre 2,1 et 3,5 KDa. (*Towmey et al, 2002*).
- **Groupe lacticine 481** : Ont une masse moléculaire comprise entre 2,3 et 3,5 KDa et présentent une structure linéaire en position N-terminale et globulaire dans la partie C-terminal. (*Towmey et al, 2002*).
- **Groupe Mersacidine** : Ces lantibiotiques ont une masse moléculaire comprise entre 1,8 et 2,0 KDa et possèdent une forme globulaire (*Towmey et al, 2002*).
- **Groupe cinnamycine** : Ce groupe comprend des lantibiotiques ayant une masse moléculaire comprise entre 1,9 et 2,0 KDa et sont secrétés par des bactéries appartenant au genre *Streptomyces*. (*Towmey et al., 2002*).
- **Groupe lactocine** : Un lantibiotique de 37 A.A avec une masse moléculaire de 3,7 KDa, produit par *Lb.sakei* (*Mortvedt et al, 1995*). La lactocine S présente structure linéaire avec deux anneaux localisés en position C-terminal.
- **Groupe à deux composants** : Ce groupe correspond aux lantibiotiques possédant deux composés peptidiques. La masse moléculaire de ces peptides est comprise entre 2,6 et 4,2 KDa. Les deux peptides ont un effet synergique sur les cellules cibles. (*Quadri et al, 1994*)

Les séquences et structures d'un lantibiotique de chaque type se trouvent à la **figure 2**.



**Figure 1.** Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2) — *Sequence and structure of a type A lantibiotic (Nisin), a type B lantibiotic (Mersacidin) and a « two-peptides » lantibiotic (Lacticin 3147 A1 and A2).*

**Figure 3 :** Séquence et structure de lantibiotique de type A (Nisine), B ( Mercacidine) et d'un lantibiotique « two peptides » D'après *McAuliffe et al, 2001*.

#### IV-2- Bactériocines de classe II :

Les bactériocines de la classe II sont de faible masse moléculaire (<10KDa);thermostables et ne subissent pas de modification post traductionnelle. Cette classe a un grand nombre de bactériocines et a été divisée en trois sous classe (*Dridier et al, 2009*)

- ❖ **Sous classe IIa:** Sont des peptides composés de 36 à 48 acides aminés (*Dridier et al, 2009*). Les bactériocines de cette classe sont actives contre les bactéries des genres *Listeria*, *Enterococcus*, *Lactococcus*(*Calvez et al, 2009*).
- ❖ **Sous classe II b :**La sous classe II b représente les bactériocines à deux composants peptidiques qui y a un nombre d'acides aminés compris entre 30 et 40. (*Carine et al., 2009*).
- ❖ **Sous classe IIc :**Contient les bactériocines telle que la lactococine B. La classification actuelle définit les bactériocines de la sous classe IIc comme étant les bactériocines n'ayant pas toutes les caractéristiques de sous-classes IIa et II b (*Calvez et al, 2009*).

#### IV-3-Bactériocines de classeIII:

Ont une masse moléculaire supérieure à 10KDa et sont thermosensibles(*Calvez .2009*).La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. **Voir tableau 4**

Cette classe ne contient que quatre bactériocines (*Nigotova et al, 2007*)

**Tableau 4:** les quartes bactériocines de la classe III (Moll et al,1999).

Bactériocines	Espèce producteur
Helveticin	<i>Lactobacillus helveticus A</i>
Enterolysine A	<i>Enterococcus faecium</i>
Zoocin A	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>
Millericin B	<i>Streptococcus milleri</i>

## **V-Mode d'action :**

Le mode d'action de la nisine est sans doute le plus étudié en raison de sa découverte plus ancienne et de son utilisation dans le domaine agro alimentaire. Bien que les bactériocines des bactéries lactiques puissent travailler via différents mécanismes pour exercer un effet antibactérien, l'enveloppe cellulaire est généralement la cible (Deegan et al, 2006).

### **V-1-Les bactériocines de classe lantibiotique :**

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II (undecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc penta peptides-GlcNAc), un précurseur de peptidoglycanes. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP,...etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule (Luquet et Corrieu, 2005).

### **V-2-Les bactériocines de classe II :**

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur, la mannose perméase, pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule ce qui induit la perméabilisation de la membrane et la mort de la cellule (HécharDET al, 2001;Gravesenet al, 2002).

### **V-3-Les bactériocines de Classe III :**

Le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'entérolysine A, la zoocine A et la milléricine B agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles. La zoocine A à un spectre d'action étroit alors que l'entérolysine A et la milléricine B ont un spectre d'action large.(Luquet et Corrieu, 2005 ; Nilsen et al, 2003).

## **VI- Les applications des bactériocines :**

## **VI-1- Dans le secteur alimentaire:**

L'utilisation des bactériocines dans les aliments fut introduite par *Hirsch et al* en 1951 lorsqu'il démontra que la nisine était en mesure d'inhiber la croissance de *Clostridium* dans un fromage fait de lait pasteurisé. Cette découverte eut comme effet de propulser les études sur les bactériocines. En effet, grâce à l'activité anti-microbienne de leurs bactériocines, les bactéries productrices ont la capacité de diminuer la charge microbienne d'un aliment et donc de contribuer à leur innocuité.

Ces molécules bioactives sont incorporées dans les aliments soit directement sous forme purifiée ou semi-purifiée (nisine) ou sous forme de concentré (pédiocine une bactériocine de classe IIa, est commercialisée sous cette forme sous le nom ALTA 2341) soit indirectement en appliquant la souche productrice dans le produit alimentaire (production *insitu*), comme elles peuvent être immobilisées par encapsulation ou adsorption. (*Ghalfi et al., 2006 ; Dortu et Thonart, 2009*)

A l'heure actuelle, la nisine (E-234) produite par *Lactococcus lactis* est la seule bactériocine dont l'usage est autorisé dans plus de 50 pays incluant les Etats unis, l'Union Européenne, le Brésil et la chine (*Reunanen et Saris, 2004*).

Les applications de la nisine comme conservateur des aliments envasés, les produits carnés, végétaux fermentés ainsi que dans le lait et dérivés laitiers ont fait l'objet de nombreuses études (*DelvesBroughton, 1990 ; DelvesBroughton et al, 1996 ; Thomas et DelvesBroughton, 2001 ; Ross et al, 2002*).

## **VI-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* (*Drider et al, 2006*).

## **VII-Spectre d'immunité :**

Les bactéries productrices de bactériocines ont développé des mécanismes d'immunité pour éviter leur propre destruction. Ces mécanismes peuvent dépendre d'une protéine dite d'immunité spécifique pour chaque bactériocine et qui est produite simultanément avec elle sans nécessité de système de maturation ou de sécrétion (*Nes et al, 1996*).

Les protéines d'immunité sont des petits peptides qui comportent des domaines hydrophobes, ce qui suggère leur localisation au niveau de la membrane cytoplasmique (*Abdel Dayem et al, 1996*). Les transporteurs ABC seraient également impliqués dans le mécanisme d'immunité. En effet, il a été démontré que dans le cas de la nisine les deux mécanismes décrits (protéines

d'immunité et système ABC) sont nécessaire pour atteindre des niveaux d'immunité comparables à ceux des souches productrices (*Ra et al, 1999*).

### **VIII- Mise en évidence de l'activité bactériocinogène :**

Les méthodes de détection des souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur la diffusion de ces substances protéiques dans un milieu de culture solide ou semi-solide préalablement inoculé par une souche indicatrice (*Elmoualdi et al, 2008*). Certaines bactériocines, comme la streptocine STH1, sont produites uniquement en milieu liquide (*Riley et Chavan, 2007*).

#### **A. Test des spots (spot on the lawn) :**

C'est une méthode permettant la recherche d'antagonisme de plusieurs souches à la fois, cet antagonisme peut être soit direct (simultané) ou indirect (différé).

- **Antagonisme direct** : il consiste à réaliser sur une gélose un tapis de la souche indicatrice, une culture fraîche de la souche test est ensuiteensemencée sur ce tapis sous forme de spots (touches). Après incubation, les boîtes sont examinées pour les zones d'inhibition. La densité du tapis cellulaire est un facteur déterminant dans cette méthode (*Tagg et al, 1976 ; Riley et Chavan, 2007*).

- **Antagonisme différé** : dans cette méthode, unepré culture de la souche test estensemencéesur gélose sous forme de spots, une incubation est alors réalisée permettant le développement des colonies. Une gélose molle (0.75% d'agar) inoculée par un certain volume de la souche indicatrice est ensuite versée au dessus. L'inhibition se traduit par l'apparition des halos d'inhibition ( $\geq 2$ mm) autour des souches productrices (*Mami et al, 2008*).

#### **B. Méthode des puits :**

Afin d'étudier l'effet inhibiteur de notre souche en milieu liquide, les boîtes de Pétri sontensemencées avec les germes pathogènes, des puits (diamètre de 5 ou 6 mm)sont réalisées (5 à 6 puits / boîte), et remplis par le filtrat d'une culture de 16 à 24h de la souche indicatrice.

La technique de diffusion des puits a été préconisée par (*Barefoot et Klaenharnmer, 1983*) puis reprise et modifiée par plusieurs auteurs (*Schillinger et Lucke, 1989*).

La lecture de l'activité antagoniste se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour du puits, exprimée en mm (*Puizani et al, 1992*).

Cette méthode consiste à :

1/ Les souches productrices de substances inhibitrices sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées pendant 16 à 24 heures.

2/ Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 tr/min, 10 min) et le surnageant est neutralisé avec du NAOH afin d'avoir un PH de 6,8 et il est conservé à 4°C.

3/ Dans une boîte de Pétri contenant du Müller Hinton solide etensemencé par la souche test par écouvillonnage, des puits sont réalisés avec un emporte pièce ou une cloche de durham.

4/ Ces puits recevront 100 µl du surnageant brut de la culture lactique à tester et les boîtes seront mises à 4°C pendant 2 heures pour permettre une bonne diffusion du surnageant.

5/ les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37°C.

6/ Les puits entourés d'une zone claire d'inhibition de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive.

### **C. Méthode des disques :**

Dans cette méthode, un tapis de la souche indicatrice est réalisé sur la surface d'un milieu solide, ensuite des disques stériles de papier Whatman imbibés de surnageant de la culture à tester sont déposés sur ce tapis. Après incubation, les boîtes sont examinées pour la présence des zones d'inhibition (*Berecka et al, 2009*).

### **D. Méthode de plaques de gélose :**

Dans cette méthode la gélose est inoculée par 1ml de la souche à tester et incubée pendant 24H. Des plaques sont découpées de cette gélose puis placées sur une autre gélose inoculée de 0.5ml de la souche indicatrice. Après incubation, les boîtes sont examinées pour visualiser les zones d'inhibition (*Berecka et al, 2009*).

## **IX-Méthodes de purification des bactériocines :**

Vu le rendement relativement faible de bactériocines dans les cultures de bactéries lactiques, il est recommandé d'utiliser de grands volumes de milieu de culture quand à leur purification. (*Tagg et al, 1976*).

Etant des protéines, les méthodes de purification des bactériocines sont donc les mêmes que pour les protéines. Beaucoup de protocoles de purification consistent en un enchaînement de chromatographies à différents principes en se basant sur les différentes propriétés des protéines (charge, hydrophobie, taille, etc.) (*Tagg et al, 1976 ; Hainque et al, 2008*).

### **IX-1- Précipitation au sulfate d'ammonium :**

C'est une méthode de purification et de concentration des bactériocines basée sur leur précipitation par les sels minéraux, les acides, l'éthanol ou les différents solvants.

Les sels sont les plus fréquemment utilisés grâce à leur haute solubilité dans l'eau à basse température et leurs ions sont inoffensifs pour les protéines. Le sel le plus utilisé est le sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Le principe de cette méthode est de précipiter la bactériocine à partir d'une solution par addition de différentes concentrations de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  avec agitation. La bactériocine possède une surface hydrophobe, celle-ci dans une solution se trouve entourée de molécules d'eau. Une fois le sel ajouté, l'eau est impliquée dans sa dissolution entraînant une agrégation des molécules de bactériocines suivie de leur précipitation. Le culot est récupéré par centrifugation puis dissout dans le minimum de volume d'eau distillée ou de tampon et enfin le sel est éliminé par dialyse (*Culter, 2004*).

L'inconvénient de cette méthode est qu'elle permet la précipitation de toutes les protéines existant dans la solution et son rendement est relativement faible (*Yanget al, 1992*).

### **IX--2- Adsorption-désorption :**

Cette méthode de purification proposée par *Yang et al. (1992)* est basée sur la propriété d'adsorption des bactériocines à la paroi des cellules productrices et des autres bactéries à Gram positif. Le degré de cette adsorption est en fonction du pH. Ainsi, près de 93 à 100% des bactériocines sont adsorbées à des pH voisins de 6.0 et peu d'entre elles ( $\leq 5\%$ ) sont adsorbées à pH de 1.5-2.0. La démarche consiste à chauffer la culture bactérienne afin de tuer les bactéries et désactiver les enzymes protéolytiques. Le pH est ensuite ajusté à 6.5 permettant l'adsorption des bactériocines à la surface des cellules mortes puis ces dernières sont récupérées par désorption dans le NaCl à pH 2 et centrifugation. Le rendement de cette méthode est plus élevé que celui de la précipitation (*Yang et al, 1992*). Plusieurs travaux (*Tagg et al, 1976; Pinto et al, 2009 ; Pringsulaka et al, 2011 ; Xie et al, 2011*) ont utilisé cette méthode pour la purification des bactériocines.

### **IX--3- Dialyse :**

La dialyse sert à éliminer les composés de petite taille (acides organiques, sels, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de la solution de bactériocines en la plaçant dans un sac ou boudin de dialyse. Ce dernier est fermé des deux côtés et trempé dans un liquide dit de contre dialyse (eau distillée ou tampon). Les pores de ce boudin laissent passer les substances de faible poids moléculaire tandis que les bactériocines seront retenues. Il est nécessaire de fréquemment changer le liquide de contre dialyse pour s'assurer de l'élimination complète des petites substances. La dialyse sert aussi à concentrer la solution de bactériocines en remplaçant le liquide de contre dialyse par une solution concentrée de polyéthylène glycol (PEG). Dans ce cas l'eau va quitter le boudin pour diluer cette solution de PEG entraînant la concentration des bactériocines (*Kamoun et al, 2003*).

### **IX--4- Ultrafiltration :**

Cette méthode est généralement utilisée en dernier lieu après les chromatographies sur colonnes. L'ultrafiltration permet la concentration sélective des protéines en utilisant des membranes semi-perméables assurant le passage de l'eau et des petites molécules. L'air comprimé exerce une pression sur le liquide à ultra filtrer et seules les molécules de faible poids moléculaire pouvant traverser la membrane, la bactériocine étant relativement grosse sera donc retenue par cette membrane (*Kamoun et al, 2003; Cutler, 2004*).

### **IX-5- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS :**

Cette technique sert à déterminer le poids moléculaire de la bactériocine. Elle est basée sur la séparation des protéines selon leur poids moléculaire sur gel de polyacrylamide réticulé. Ce gel constitue un filet à mailles plus ou moins fines permettant aux petites molécules de migrer plus loin. La solution tampon contenant le SDS (sodium dodécyl sulfate) sert à dissocier les sous-unités des protéines, les chaînes polypeptidiques fixent une quantité constante de SDS par gramme (1.4g SDS/g de protéine) et prennent la forme de bâtonnets dont la longueur est proportionnelle au nombre d'acides aminés donc au poids moléculaire, les petites chaînes migrant le plus loin. Leur révélation se fait par coloration. En faisant migrer un mélange de chaînes polypeptidiques de poids moléculaire connu, il est possible de déterminer le poids moléculaire des chaînes séparées (*Kamoun et al, 2003*). Cette méthode a permis de déterminer le poids moléculaire de la pédiocine LB-B1

produite par *Lactobacillus plantarum*(*Xie et al, 2011*) et de plusieurs autres bactériocines (*Albano et al, 2007 ; Pinto et al, 2009 ; Khalil et al, 2009*).

# *Matériel et méthodes*

## **I-Matériel :**

### **I-1-Milieux de culture :**

Les milieux utilisés au cours de ce travail étaient soit des milieux liquides, soit des milieux solides additionnés d'agar agar à 1,5% (m/v). (Voir annexe 1)

#### ❖ **Milieu M17 :**

Ce milieu est recommandé pour la culture de la plupart des Streptocoques, Pediocoques et Lactocoques. (*Terzaghi et Sandine, 1975*)

#### ❖ **Milieu MRS :**

Le milieu MRS (**Man Rogosa et Sharpe**) a été utilisé pour les différents tests biochimiques et physiologiques. (*De Man et al, 1960*)

### **I-2-Matériel biologique :**

#### ❖ **Bactéries pathogènes :**

**Tableau5 :** caractéristiques des souches pathogènes (*Guiraud, 1998*)

<b><u>les souches</u></b>	<b><u>Références</u></b>	<b><u>Origine</u></b>	<b><u>Caractéristiques</u></b>
<b><i>E.Coli</i></b>	ATCC 25922	Hôpital d'Oran	Bacilles ou coccobacilles Gram-, oxydase- catalase+  asporulés, fermente le glucose, elle est anaérobie  facultative
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	ATCC 25923	Hôpital d'Oran	Gram positif, coagulase +, en forme de coque, immobile sphérique, associée par groupes en amas (grappe de raisin) ou en chaînes, aéro-anaérobie facultative,
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	ATCC 27853	Hôpital d'Oran	Bacilles ou coccobacilles, gram-, saprophytes, oxydase+ ou oxydase- mais  fermentation de glucose – (aérobies), généralement mobile.
<b><i>Candida albicans</i></b>	ATCC 10231	Institut pasteur	Levure, l' <a href="#">uréase</a> négatif, colonie blanc crème, luisant et crémeuse sur gélose

			sang ou sabouraud. Responsable de candidoses.
--	--	--	--

❖ **Bactéries lactiques** : Tableau 6 : Les bactéries lactiques et leurs références

Les souches	Les références	Origine
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CNRZ 302	INRA
<i>Pediococcus acidilactici 1</i>	LMG 113847	INRA
<i>Pediococcus acidilactici 2</i>	LMG 11384 t	INRA
<i>Lactococcus lactis</i>	CNRZ 142 t	INRA

ATCC : American Type Culture Collection

LMG: Laboratory of Microbiology Gent Bacteria Collection

CNRZ : Centre National de Recherche Zootechnique

INRA : Institut national de la recherche agronomique

## **II-Méthodes :**

### **II-1-Revivification et purification des cultures des bactéries lactiques :**

Les souches lactiques étaient conservées dans du glycérol à -20°C, après décongélation elles sont revivifiées dans le milieu MRS ou M17 liquide puis incubées pendant 24 à 48h à 37°C.

La purification des souches revivifiées est réalisée par repiquages successifs alternant les milieux sélectifs MRS ou M17 liquide et solide par la méthode des stries et l'incubation est faite à 37°C pendant 24 à 48 h (*Guiraud, 1998*).

La pureté des souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur (couleur, taille et forme) (*Guiraud, 2004*). Ces colonies pures sont retenues pour la suite de l'étude.

### **II-2-Conservation à courte durée des souches :**

Elle a été réalisée par ensemencement des souches isolées sur gélose MRS inclinée en tubes à essais, les cultures pures sont conservées à + 4°C à l'obscurité et un repiquage est nécessaire toutes les quatre semaines (*Badis et al, 2003*).

### **II-3-Conservation à longue durée :**

Se fait par ensemencement des souches dans des appendorfs contenant 30% glycérol + 70% MRS liquide et on les place dans le congélateur à -20°C (*Badis et al, 2003*).

## **II-4-Identification et confirmation des bactéries lactiques :**

L'identification a été établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : production d'enzymes, température de croissance, production de gaz carbonique, fermentation de divers sucres.

### **II-4-1-Tests morphologiques :**

#### **A-L'aspect macroscopique :**

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS ou M17 solide et liquide ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies sur milieu MRS solide et le trouble dans le milieu liquide (*Badis et al, 2005*).

#### **B-L'aspect microscopique :**

##### **❖ Coloration de Gram :**

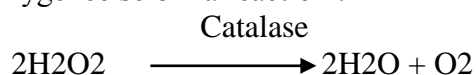
Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au *violet de cristal*; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de *Lugol*, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec 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. À ce stade les cellules gram- seront incolores, les cellules gram+ 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, on sèche le frottis au buvard et on l'examine 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-4-2-Tests physiologiques et biochimiques :**

##### **❖ Test catalase :**

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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<sub>2</sub>) (*Marchal et al, 1991*).

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

- Quatre milieux de MRS liquides ont été utilisés contenant différentes concentrations de NaCl : 2% de NaCl (2 g de NaCl par 100 ml de milieu), 4% et 6,5%, avec un pH de 6.5 et un témoin sans NaCl. Les tubes sontensemencés par nos souches et incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures.
- Une autre série d'essais a été réalisée sur le milieu MRS liquide avec un pH de 4, 6.5 et 8. Les tubes sontensemencés 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 6°C, 30, 37°C et 45°C pendant 24 à 48 heures.

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

❖ **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°C pendant 30 min, après refroidissement, elles sont incubées à 37 C pendant 24 à 48 heure. Un résultat positif se traduit par un trouble (*Badis et al, 2005*).

❖ **Milieu Mannitol-mobilité :**

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. On aensemencé les souches étudiées dans le milieu par piqûre centrale, et incubé à 37°C pendant 24h. Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol, une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (*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 onensemence les souches. Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO<sub>2</sub>, par contre les souches hétérofermentaires vont produire l'acide lactique et le CO<sub>2</sub> a proportions égales (*Carr et al, 2002*).

❖ **Production de dextrane :**

Les bactéries lactique sontensemencées en strie sur du milieu MSE(*Mayeux et al, 1962*). Après 24 h d'incubation à 37 °C. Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes. Ce test est aussi considéré comme clé d'indentification permettant aussi de différencier entre les leuconostocs productrices et non productrice de dextrane(*Dellaglio et al, 1994*).

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

Une série de tubes à essais contenantdu lait écrémé à 0,1% et 0,3 de bleu de méthylène estensemencéepar des cultures pures et incubée 24 à 48h à 30°C. Seules certaines espèces

appartenants 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)

#### ❖ **Galerie API 20 Strep (bio Mérieux):**

La galerie API 20strep comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Ces galeries contiennent des tests enzymatiques, test pour la production d'acétoïne, différents sucres...etc.

Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne (A l'aide d'un écouvillon, prélever toute la culture préalablement préparée sur milieu gélosé, et homogénéiser dans un tube contenant 2 ml d'eau distillée stérile sans additifs et réaliser une suspension très dense).

Dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH), répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles (pour cela, incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pointe de la pipette ou de la pipette sur le côté de la cupule) :

- pour les tests VP à LAP : environ 100 µl dans chaque cupule.
- pour le test ADH : remplir uniquement le tube.

Dans la deuxième moitié de la galerie (tests RIB à GLYG) :

- ouvrir une ampoule d'API GP Medium et y transférer le reste de la suspension, soit 0,5 ml au minimum. Bien homogénéiser.
- répartir cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement.
- Remplir les cupules des tests soulignés ADH à GLYG avec de l'huile de paraffine en formant un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incubé à 37°C pendant 24 h.

Après l'incubation, on ajoute les réactifs nécessaires et on laisse agir pendant 10 minutes.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture. L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification. (BioMérieux, 2009)

## **II-5- Interaction bactéries lactiques /bactéries pathogènes:**

### **II-5-1-Préparation des précultures des bactéries tests (pathogènes) :**

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

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

- *Candida albicans* sur gélose SABOURAUD ;
- *Staphylococcus aureus* sur milieu CHAPMAN ;
- *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose au cétrimide ;
- *E.Coli* sur milieu BCPL.

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 24 h.

### **II-5-2-Préparation des précultures des bactéries lactiques :**

Des colonies pures de bactéries lactiques sont ensemencées dans des tubes à essai contenant du MRS ou M17 liquide et le tout est incubés à 37°C pendant 24h..

### **II-5-3-Mise en évidence de l'effet antagoniste :**

#### **❖ Méthode de diffusion par puits (Barefoot et Klaenhammer ,1983)**

Cette méthode à été modifiée par plusieurs auteurs comme *Puizani et al, 1992*.

Cette méthode consiste à :

1/ Les souches productrices de substances inhibitrices sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées à 37°C pendant 16 à 24h en anaérobiose, ce qui évite la formation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

2/ Après incubation, le milieu est centrifugé (8000 tr/min, 10 min) et le surnageant est alors séparé du culot et filtré à l'aide d'un filtre Millipore de 0.45 µm et neutralisé avec du NaOH (N1) afin d'avoir un PH de 6,8-7 et il est conservé à 4°C.

3/ Dans une boîte de Pétri contenant du Müller Hinton solide et ensemencé par la souche test initialement préparée (DO = 0,08 à 0,1 correspondant à 10<sup>6</sup>UFT/ml à 625nm) par écouvillonnage.

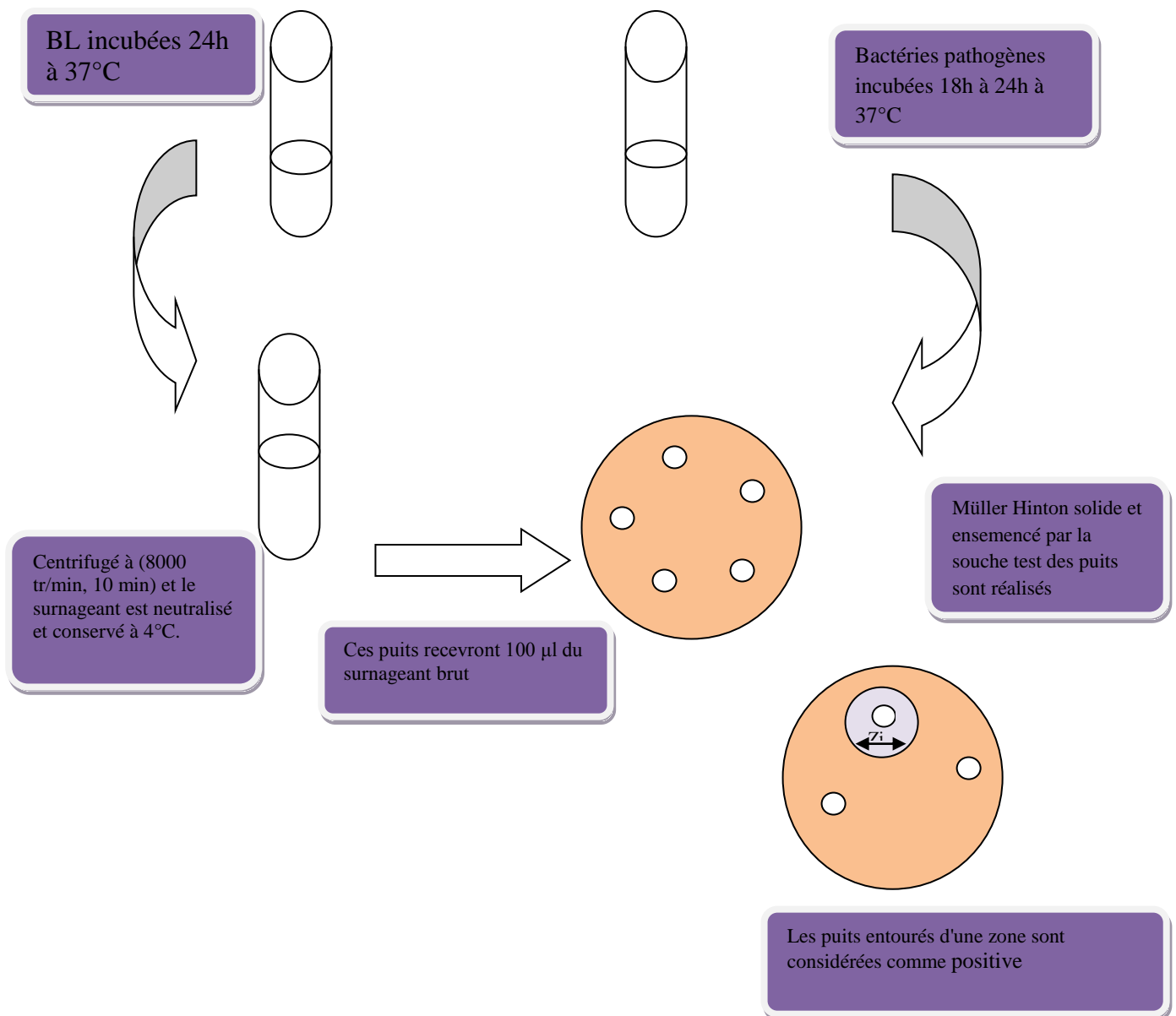
-On laisse les boîtes sécher à température ambiante pendant 30minutes, des puits sont ensuite réalisés avec un emporte pièce ou une cloche de Durham stérile.

4/ Ces puits recevront 100 µl du surnageant brut de la culture lactique à tester et les boîtes seront mises à 4°C pendant 2heures pour permettre une bonne diffusion du surnageant.

5/ les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37°C.

6/ Les puits entourés d'une zone claire d'inhibition de la souche test et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positives. (*YILDIRIM. Z et YILDIRIM. M, 2001*).

**(Figure 4)**



$Z_i$  = diamètre de la zone d'inhibition obtenue – diamètre du puits (6mm)

**Figure 4 :** schéma de la méthode de diffusion en puits

❖ **Elimination du facteur acide :**

Le surnageant est neutralisé avec du NaOH (1N) après il est ensemencé par la méthode des puits et le tout est incubé à 37°C pendant 24h.

Des boîtes témoins avec un surnageant non neutralisé sont aussi ensemencées de la même manière.

❖ **Effet des enzymes protéolytiques :**

La nature protéique de la bactériocine est mise en évidence par l'étude de sa stabilité après traitement par différentes enzymes protéolytiques.

L'extrait brut, ajusté à pH 7, est soumis à l'action de l'enzyme : la pepsine. Cette enzyme est utilisée à une concentration finale de 1mg/1ml de surnageant. Le mélange (enzyme : surnageant)

est stérilisé par des filtres millipores 0,45 µm et incubé à 37°C pendant 1 à 2 h. (*Vinod Kumar et al, 2006*).

L'activité inhibitrice est évaluée par la méthode des puits.

#### ❖ La densité optique:

Chaque souche pathogène est ensemencée dans un tube contenant 5 ml de bouillon nutritif puis étuvées à 37°C pendant 24h. La densité optique est mesurée toutes les deux heures. À la quatrième heure, 1ml du surnageant neutralisé par NaOH à un pH de 6.8 à 7, est ajouté aux cultures et la mesure de la densité optique continue jusqu'à 12h. (*VinodKumar et al, 2006*).

On règle le spectrophotomètre à la longueur d'onde de 620nm

On fait un blanc : **Faire le blanc** consiste à mesurer l'absorbance (à la longueur d'onde de travail) du solvant et des parois de la cuve ; on remplit une cuve au deux tiers avec de le solvant approprié (dans notre cas c'est le bouillon nutritif) et on la met dans l'emplacement des cuves dans le spectrophotomètre et on calibre l'appareil à A=0 ;

On prend une nouvelle cuve, on la rince avec de l'eau distillée, on l'essuie bien de tous les cotés avec du papier joseph, on la remplit au deux tiers de la solution contenant notre bactérie pathogène ;

On met notre cuve rempli dans l'appareil de façon à ce que l'un des coté transparent de la cuve soit en face de la source lumineuse ;

On mesure l'absorbance. (**Figure 5**)



**Figure 5** : Spectrophotomètre

#### ❖ Traitement à différentes températures :

Les substances antimicrobienne one été testées pour leur résistance à la température et à la conservation de leur activité vis-à-vis des souches indicatrices.

Les surnageants des cultures sont chauffés à différentes températures 80°C, 100°C, 120°C pendant 10min, 15min, 5 min respectivement.

On teste l'antagonisme par la méthode des puits. (*Achemchem et al, 2004*)

#### ❖ Effet de la température d'incubation sur la production des bactériocines :

50ml de bouillon MRS ou M17 ont été inoculé par 0,5 ml d'une culture bactérienne d'une nuit puis on incube à différentes températures 30°, 37°, 40°C pendant 24h.

On teste l'antagonisme par la méthode des puits. (*Achemchem et al, 2004*)

# *Résultats et Discussion*

## **I-Revivification et purification**

Après la revivification et purification de nos souches lactiques obtenues par plusieurs repiquages successifs sur milieu M17 (alternant milieu solide et milieu liquide), on a obtenu des souches pures, les colonies sont d'un aspect (couleur, taille et forme) typique et homogènes.

## **II-Confirmation de l'identité des souches lactiques :**

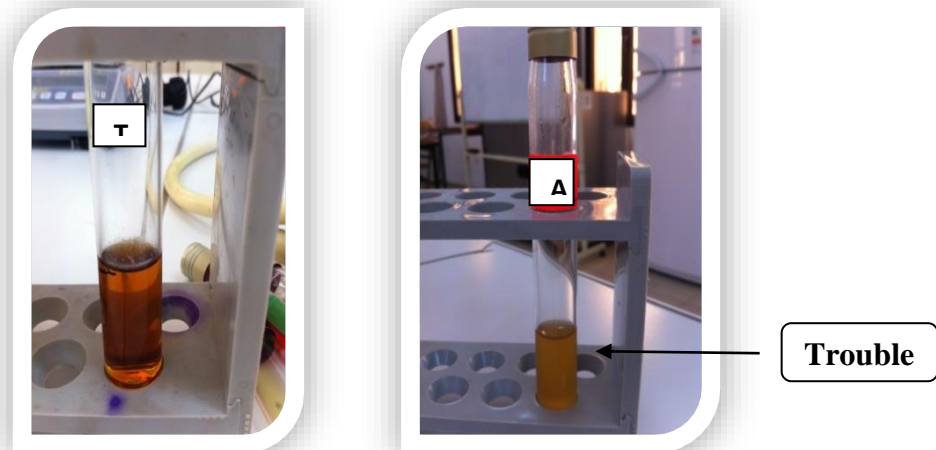
Lors de cette étude nous avons confirmé l'identité de nos souches par les procédures phénotypique conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

### **II-1-Etude morphologique :**

#### ➤ **-Critères macroscopiques :**

L'observation macroscopique du développement des bactéries lactiques dans le milieu M17 liquide est sous forme de trouble homogène fumeux. (**figure6**)

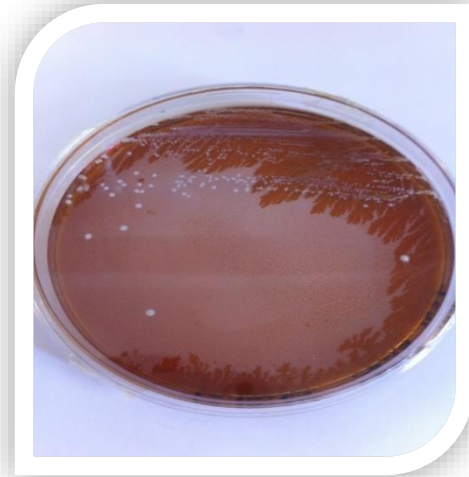
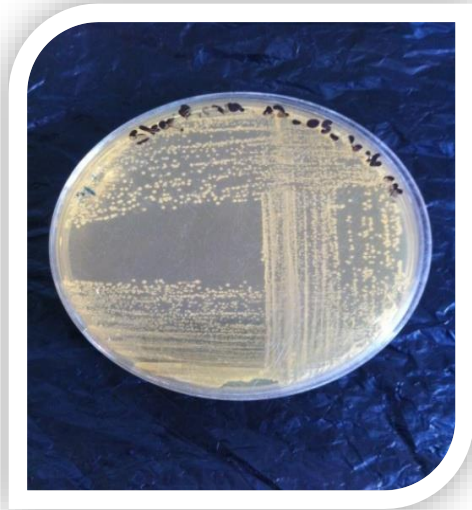
Sur milieu M17 solide, les souches ont donnés des colonies lenticulaires parfois circulaires, de petites tailles à moyennes d'environ 1mm de diamètre, blanchâtres ou laiteuses, avec un pourtour régulier et lisse. (**figure7**)



**Figure 6:** Aspect des souches lactiques pures en milieu M17 liquide

T : Témoin

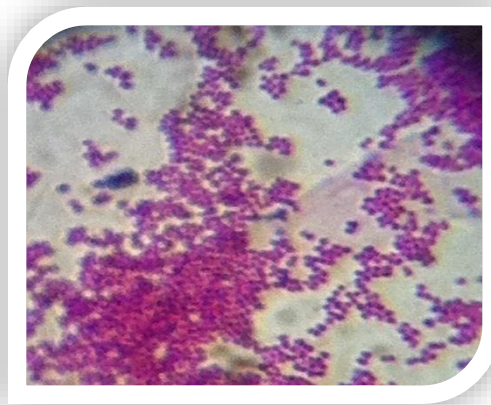
A : Culture microbienne



**Figure7** : Aspect des souches lactiques pures en milieu M17 solide

➤ **Critères microscopiques** :

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 8. (**Figure8**)



**Figure8**: Observations microscopiques des bactéries lactiques après une coloration de Gram avec un grossissement (G : 10x100)

➤ **Production de la catalase** :

Toutes les souches lactiques sont catalase négative car il y a absence de dégagement gazeux (O<sub>2</sub>) comme le montre la figure9



**Figure 9 :** Test de la catalase

**Tableau 8:** Résultats de l'étude morphologique et du test de la catalase

	<u>catalase</u>	<u>Coloration de Gram</u>	<u>Aspect microscopique</u>
<i>S.T</i>	-	+	Cocci, coques en chainettes
<i>P1</i>	-	+	diplocoques
<i>P 2</i>	-	+	Diplocoques, coques en tétrade
<i>L.L</i>	-	+	Cocci

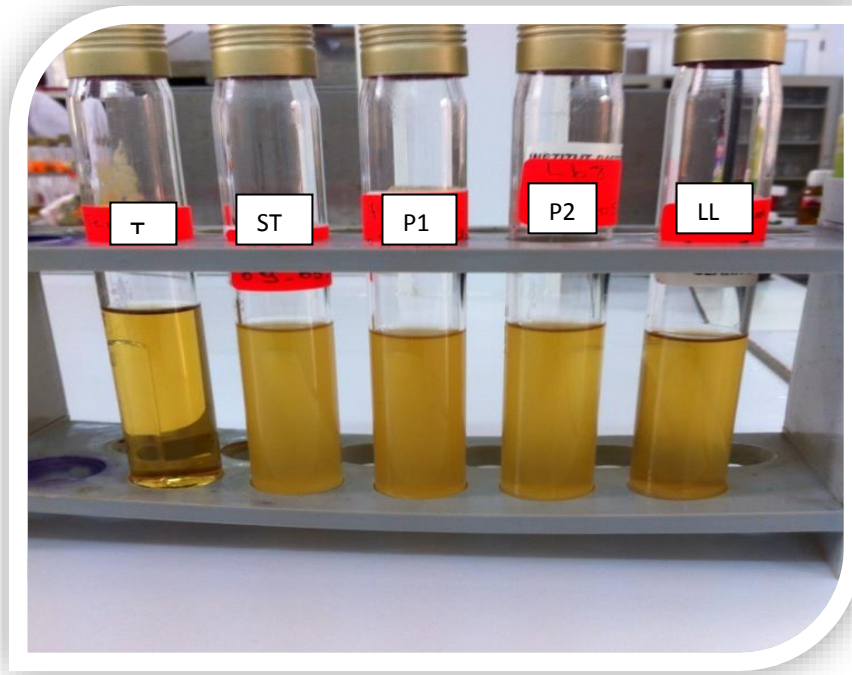
## **II-2-Tests physiologiques et biochimiques :**

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques sont résumés dans Le **tableau 9**.

### ➤ **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 CO<sub>2</sub> 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.

Chez nos quatre souches, aucune production de gaz (CO<sub>2</sub>) à partir du glucose n'a été observée, ainsi, elles sont considérées comme homofermentaires. (**Figure10**)



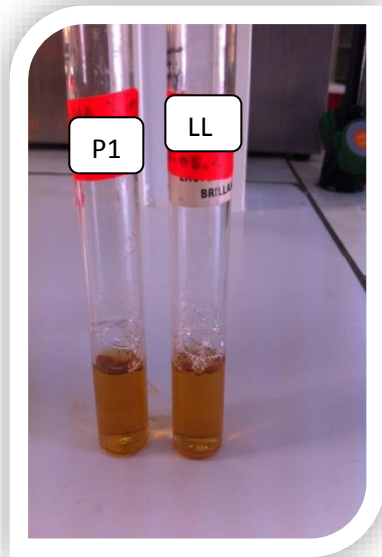
**Figure 10:** Résultats obtenus pour le type fermentaire sur milieu MRS liquide glucosé contenant la cloche de durham

T : tube témoin ST : Streptococcus ; P1, P2 : Pediococcus ; LL : Lactococcus

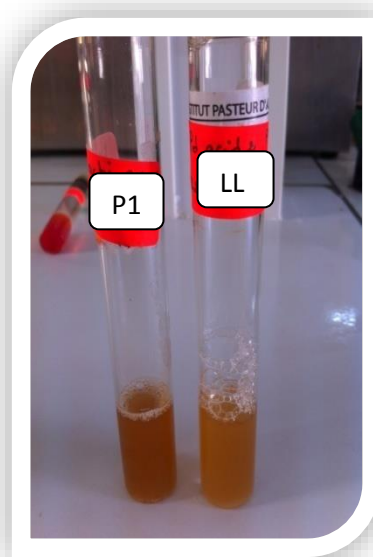
➤ **Tests de Température, PH, NaCl, Thermorésistance :**

Les expériences effectuées ont montré que :

- Les quatre souches sont capables de croître sur le bouillon MRS avec des concentrations de 2 et 4% de NaCl avec apparition d'un trouble, mais sont incapables de multiplier sur le milieu avec une concentration de 6,5%. **Voir figure 11**
- Une croissance de trois souches a été notée sur le milieu MRS à PH= 4 : P1, P2, LL mais pas ST. Sur le milieu MRS à PH=6,5, les quatre souches se sont multipliées, par contre, pour le milieu MRS avec un PH de 9,6, aucune croissance n'a été enregistrée.
- A 6°C, on a obtenu une croissance de P1 mais après une incubation de 10 jours alors que le résultat est négatif pour ST, P2 et LL. A 30°C et 37°C, il y a croissance de toutes nos souches tandis qu'à 45°C, on a obtenu une croissance chez toutes les bactéries sauf LL.
- Les souches ST et P1 sont thermorésistantes, où on observe une croissance sur bouillon MRS après un traitement thermique pendant 30 minutes à 60°C alors que P2 et LL sont dépourvues de la thermorésistance.



(A)

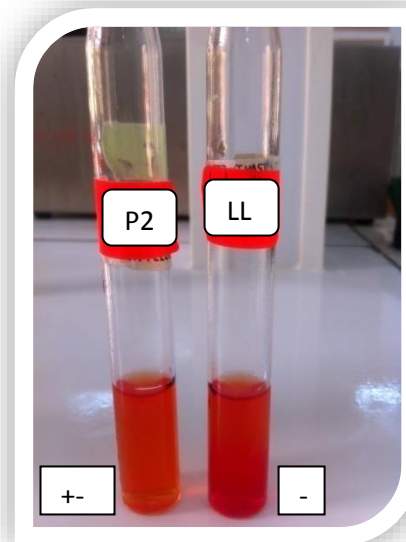
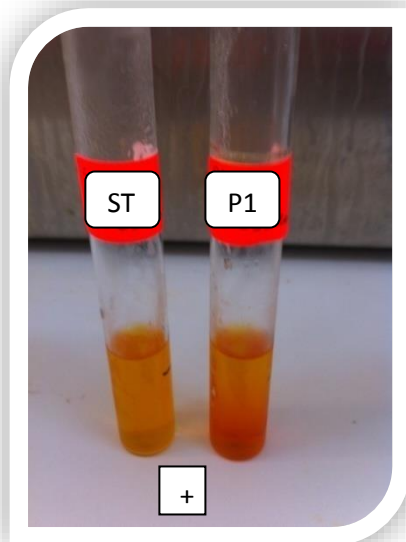


(B)

**Figure 11:** Tests de : Température, pH, NaCl et Thermorésistance ;  
 (A) : absence d'une croissance, (B) : présence d'une croissance.

➤ **Test sur milieu Mannitol-mobilité :**

Les souches ST et P1 ont pu fermenter le mannitol ce qui a permis le virage au jaune du milieu et de même pour la P2 mais légèrement, alors que la LL n'a pas pu fermenter le mannitol. Pour la mobilité, la souche P1 est mobile tandis que chez les trois souches le résultat est négatif. (Figure 12)



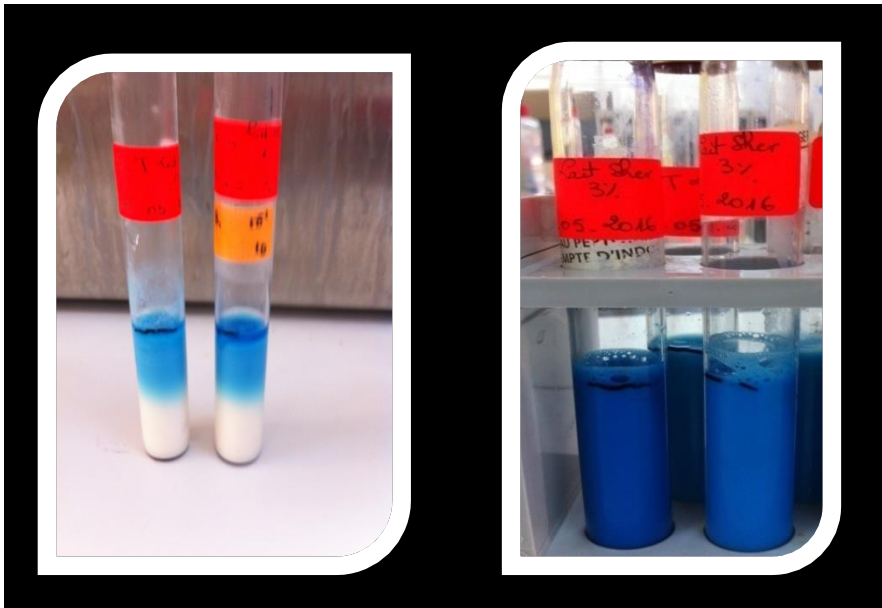
**Figure 12:** résultats obtenus pour le test sur milieu mannitol-mobilité

➤ **Production de dextrane :**

Il n'y a pas de croissance sur le milieu MSE pour les quatre souches lactiques, donc ces bactéries ne produisent pas de dextrane à partir des exopolysaccharides (EPS).

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

Toutes les souches ont pu croître sur le lait de Shermanet cela dans la concentration 0,1% avec réduction du bleu de méthylène tandis qu'il n'y a pas de réduction du bleu de méthylène dans le milieu à concentration de 0,3% donc pas de croissance. **Figure 13**



Résultat positif

Résultat négatif

Figure 13: Le test de lait de Sherman

**Tableau9** : Résultats des tests biochimiques effectués sur nos souches lactiques

	ST	P1	P2	LL
<b>Température</b>				
6°C	-	+	-	-
30°C	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+
45°C	+	+	+	-
<b>PH</b>				
4	+	+	+	+
6,5	+	+	+	+
9,6	-	-	-	-

<b>NaCL</b>				
<b>2%</b>	+	+	+	+
<b>4%</b>	+	+	+	+
<b>6,5%</b>	-	-	-	-
<b>Lait de Sherman</b>				
<b>0,1%</b>	+	+	+	+
<b>0,3%</b>	-	-	-	-
<b>Thermorésistance</b>	+	+	-	-
<b>Mannitol</b>	+	+	+ -	-
<b>Mobilité</b>	-	+	-	-

+ : croissance ; - : pas de croissance.

➤ **La galerie API 20 strep: voir annexe 2**

**-Pour le test de l'ADH : voir figure 14**

Toutes les souches sont ADH positive donc capable d'utiliser l'arginine sauf ST qui n'apas la capacité à hydrolyser l'arginine, car ne possèdent pas l'ADH (arginine déshydrogénase).

**-Pour la dégradation de l'esculine : voir figure 14**

-P1 et LL sont VP positif alors que P2 et ST sont VP négatif

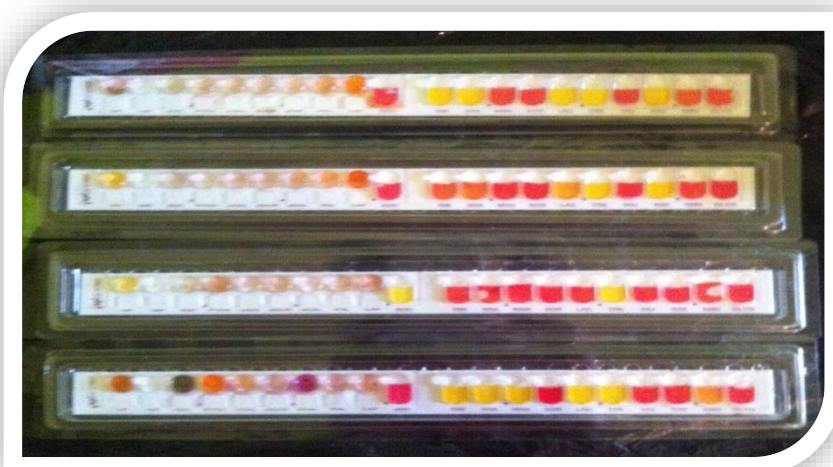
**-Pour le profil fermentaire : voir figure figure 14**

On constate que :

- ST utilise seulement le tréhalose alors qu'elle ne métabolise pas les autres sucres
- P1 utilise le ribose, l'arabinose, mannitol, lactose et le tréhalose
- P2 utilise seulement le tréhalose et le raffinose
- LL utilise le ribose, l'arabinose, le lactose, le tréhalose et le raffinose

On a remarqué que les quatre souches n'utilisent pas l'amidon, le glycogène, l'inuline et le sorbitol. Ces résultats indiquent également que la même espèce peut présenter des profils fermentaires

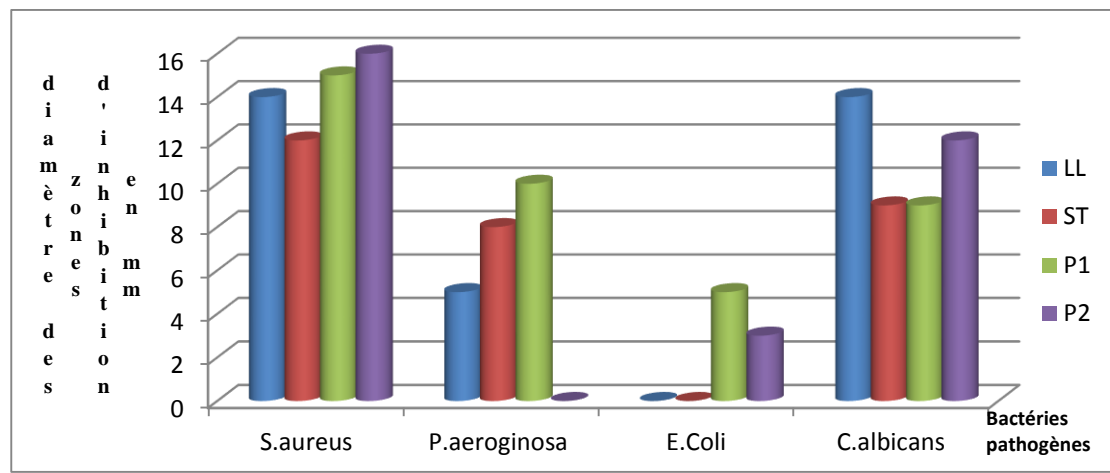
différents P1 et P2 et cela est du à des éléments de transfert comme les plasmides.



**Figure 14:** Résultat de la galerie API 20 strep

Selon le schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactiques (Carr et al, 2002) et d'après l'utilisation des tests d'identifications morphologiques et biochimiques classiques, de la Galerie API 20 strep et du profil fermentaire des sucres ça nous a permis de confirmer en se basant sur des données bibliographiques établis par (Carr et al, (2002) et Khedid et al, (2006)) que nos souches bactériennes sont *Streptococcus thermophilus*, 2 souches *Pediococcus acidilactici* et *Lactococcus lactis*.

### **II-3-Mise en évidence de l'effet antagoniste :**

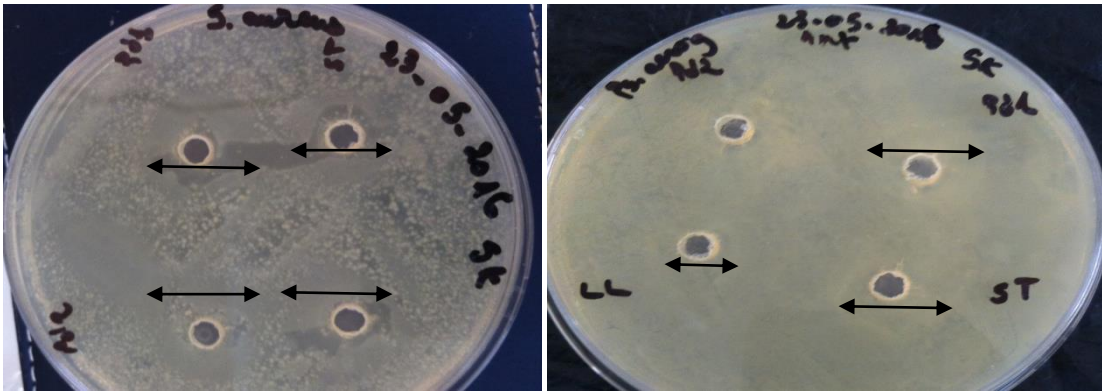


**Figure 25:** Diamètre des zones d'inhibition formée par les souches lactiques confrontées avec les bactéries pathogènes

Les souches lactiques ont une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries pathogènes qui se traduit par l'apparition des zones d'inhibitions de : 12 à 16mm pour *S.aureus*, 0 à 10mm pour *P.aeruginosa*, 9 à 14mm pour *C.albicans* et 5 à 3mm pour *E.coli* et cela a permis de mettre en évidence le pouvoir antagoniste de nos souches lactiques. (Figure 16)

Cela concorde avec les résultats de KARAM. N. E et al, (2008) qui parmi les trente huit souches testées pour l'antagonisme bactérien, cinq souches (*Lactococcus lactis ssp. diacetylactis* LV4, *Lactococcus lactis ssp lactis* LV12, *Pediococcus sp* MA1 et *Streptococcus thermophilus* inhibent la croissance de *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella thyphimurium* et *Enterococcus faecalis*.

Cette action antimicrobienne est expliquée par la synthèse de molécules comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines.



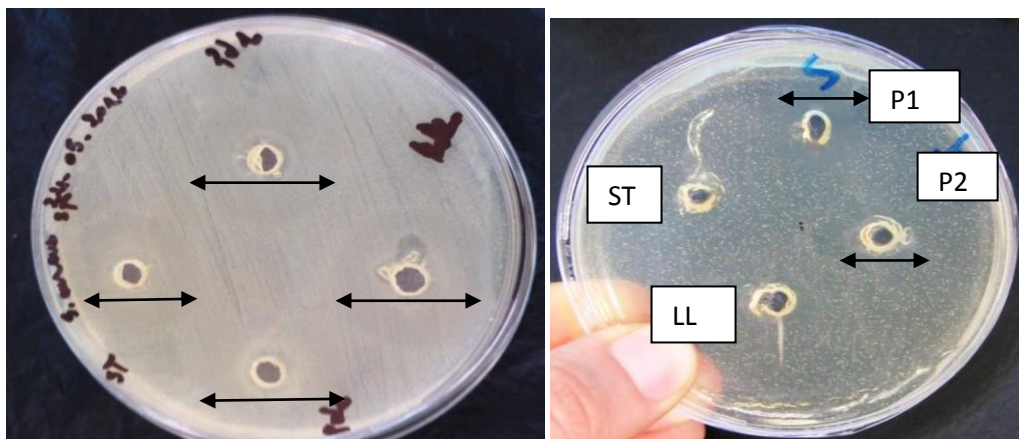
A B

**Figure 16 :** Zones d'inhibitions des souches lactiques vis-à-vis de  
**A :** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923  
**B :** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

#### II-4- Détermination de la nature de l'inhibition :

L'effet antagoniste des bactéries lactique vis-à-vis des bactéries pathogènes est dû à plusieurs facteurs tels que : l'acide organique, les bactériocines... etc.

##### ➤ Inhibition par le surnageant :



A

B

**Figure 17 :** Zones d'inhibitions des surnageants vis-à-vis de  
**A :** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923  
**B :** *E. coli* ATCC 25922  
**ST :** *Streptococcus thermophilus* ; **LL :** *Lactococcus lactis* ; **P1, P2 :** *Pediococcus acidilactici*

L'effet inhibiteur pour chaque bactérie lactique a été significativement différent d'une souche cible à l'autre. En effet, pour *S. aureus* ATCC 25923, on a des diamètres élevés compris entre 16mm et 20mm alors que *P. aeruginosa* ATCC 27853, les diamètres sont moins importants : 0, 7mm, 9mm, de même pour *E. coli* ATCC 25922 ou les diamètres sont de 4mm

et mm et *C. albicans* ATCC 10231, le diamètre est de 6mm seulement pour *Lactococcus lactis*.

-Un effet fortement inhibiteur de la croissance des bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*)

- Un effet modéré « selon les souches » vis-à-vis des espèces Gram négatif (*E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) ; et vis-à-vis de *C.albicans* aussi.

-Pour l'effet inhibiteur des bactéries lactiques vis-à-vis de *S.aureus*, nos résultats sont différents de ceux d'**AGGAG et KHELIL (2013)**, ou une seule souche lactique qui est *lactobacillus delbruckii* a un effet sur la bactérie pathogène et avec un diamètre de 8mm seulement et pour *E. Coli*, nos résultats sont similaires (diamètres de 4et 6mm).

**Onda et al. (2003)** confirme que les bactéries grampositif sont plus sensibles à l'effet bactéricide ou bactériostatique des bactéries lactiques où les bactériocinesproduites par ces dernières agissent sur les bactéries gram positif en formant des pores dans la membranecytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires, d'après **Kalchayanand et al (2008)**, toutes les bactériocines ont une activité dirigée contre les bactéries à Gram positifs puisque la membrane externe des bactéries à Gram négatifs ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne.

-Pour *C.albicans*, seulement *Lactococcus lactis* a eu un effet inhibiteur sur elle ou le diamètre de la zone était de 6mm et cela concorde avec les travaux de **Le Lay.C, (2009)**qui démontré qu'une bactériocine produite par *Lactococcus lactis ssp lactis biovardiacetylactis* inhibait la croissance de *Candida albicans*.

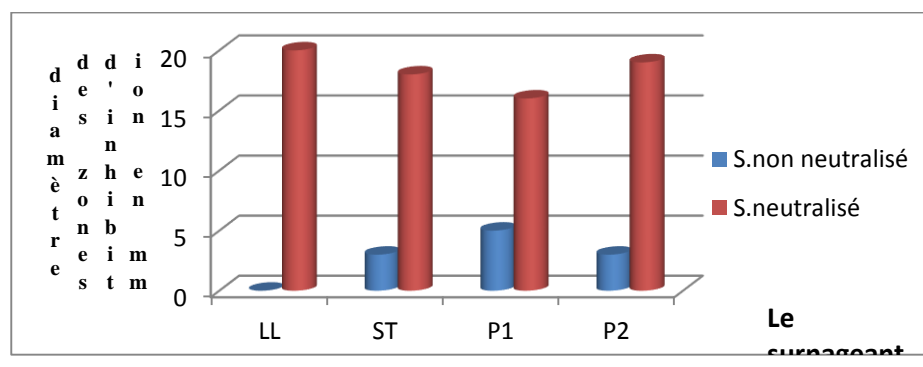
**Yateem et al. (2008)** ont isolé des souches lactiques à partir du lait de chamelle au Kuwait dont l'effet antagoniste s'était exercé uniquement sur les bactéries à Gram négatif (*Salmonella ssp* et *E. coli*), mais aucun effet n'a été détecté sur *Staphylococcus aureus*. Aucontraire, **Ammor et al. (2006)** ont isolé des souches lactiques dont l'effet antagoniste étaitrestreint aux bactéries à Gram positif, celles à Gram négatif étant résistantes.

Nos résultats diffèrent des travaux de **Savadojo etal, (2004)**, où les diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques isolées du lait fermenté sont de l'ordre de 9 à 10 mm vis-à-vis de *S. aureus* et de 8 à 9 mm vis-à-vis d'*E. Coli*.

-Pour déterminer la nature du facteur inhibiteur on a procédé de la façon suivante :

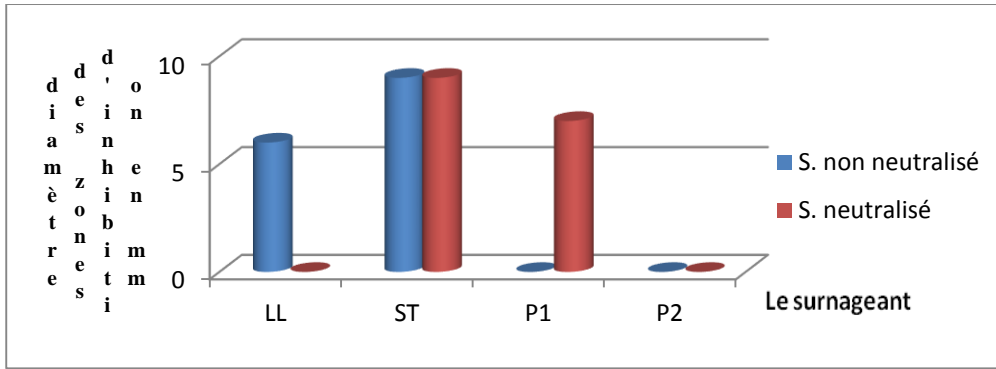
➤ **Inhibitiondue à l'acide:**

-L'effet inhibiteur des surnageants sur *Staphylococcus aureus*ATCC 25923 en présence de l'acide et en son absence a donné les résultats suivant :



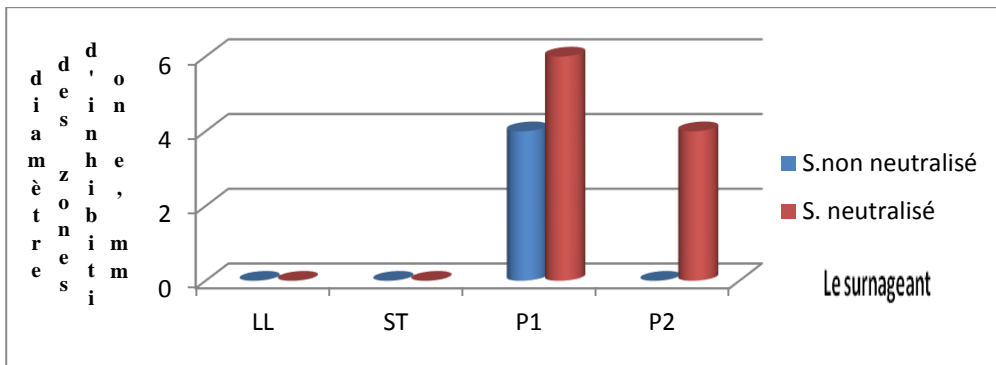
**Figure 18 :**L'effet inhibiteur des surnageants neutralisés et non neutralisés sur *Staphylococcus aureus*ATCC 25923

-L'effet inhibiteur des surnageants sur *Pseudomonas aeruginosa*ATCC 27853 en présence de l'acide et en son absence a donné les résultats suivant :



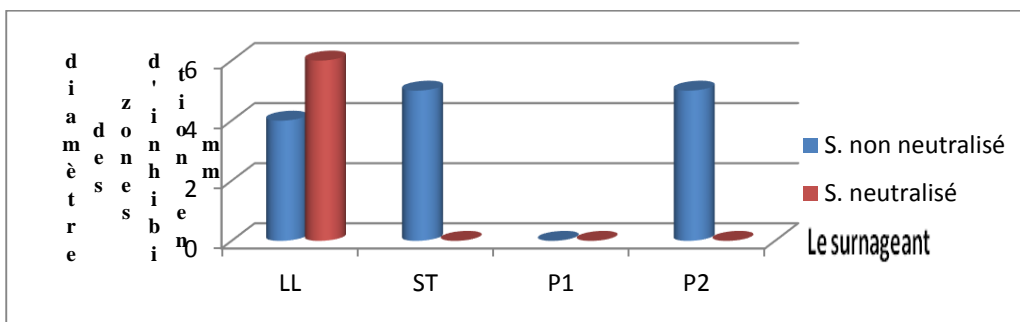
**Figure 19 :** L'effet inhibiteur des surnageants neutralisés et non neutralisés sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

-L'effet inhibiteur des surnageants sur *E.coli* ATCC 25922 en présence de l'acide et en son absence a donné les résultats suivant :



**Figure 20 :** L'effet inhibiteur des surnageants neutralisés et non neutralisés sur *E.coli* ATCC 25922

-L'effet inhibiteur des surnageants sur *Candida albicans* ATCC 10231 en présence de l'acide et en son absence a donné les résultats suivant



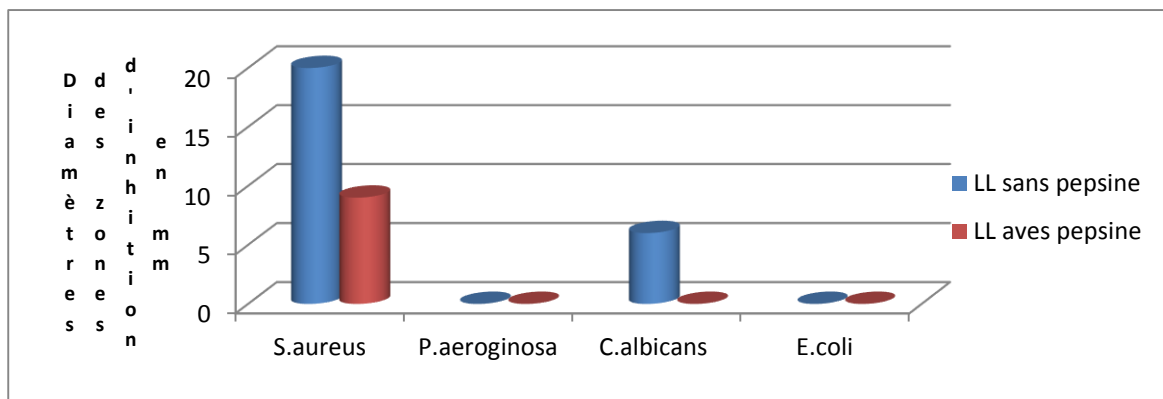
**Figure 21 :** L'effet inhibiteur des surnageants neutralisés et non neutralisés sur *Candida albicans* ATCC 10231

Il ya augmentation du diamètre des zones d'inhibition pour tous les surnageants neutralisés confrontés avec les bactéries pathogènes comme le montre les histogrammes dans les Figures 18, 19, 20, 21, donc on peut déduire que l'effet inhibiteur est du aux bactériocines non à l'acide.

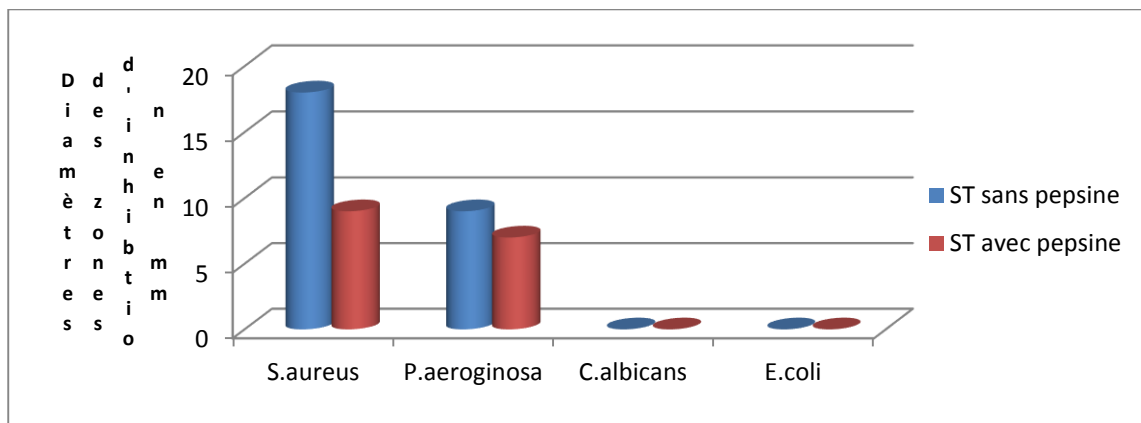
D'après *Song et al (1997)*, l'élimination de l'effet des acides organiques favorise plutôt l'activité des substances antimicrobiennes telles que les bactériocines.

➤ **Inhibition due aux bactériocines :**

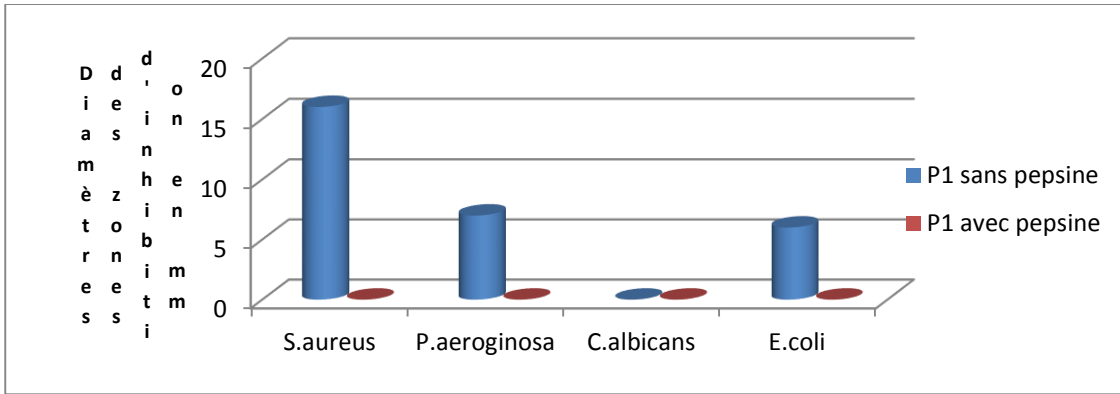
Les bactériocines sont des peptides antibactériens qui présentent un spectre étroit envers des espèces pathogènes, elles sont inactivées par les protéases. Pour cela, une enzyme protéolytique qui est la pepsine est testée pour savoir si les souches lactiques produisent des bactériocines ou non.



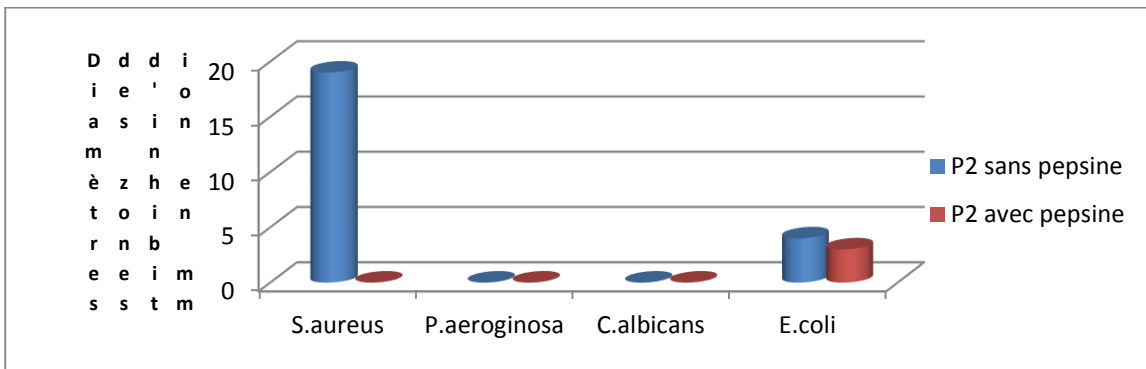
**Figure 22 :** Effet du surnageant de *Lactococcus lactis* traité ou non avec de la pepsine sur les bactéries pathogènes



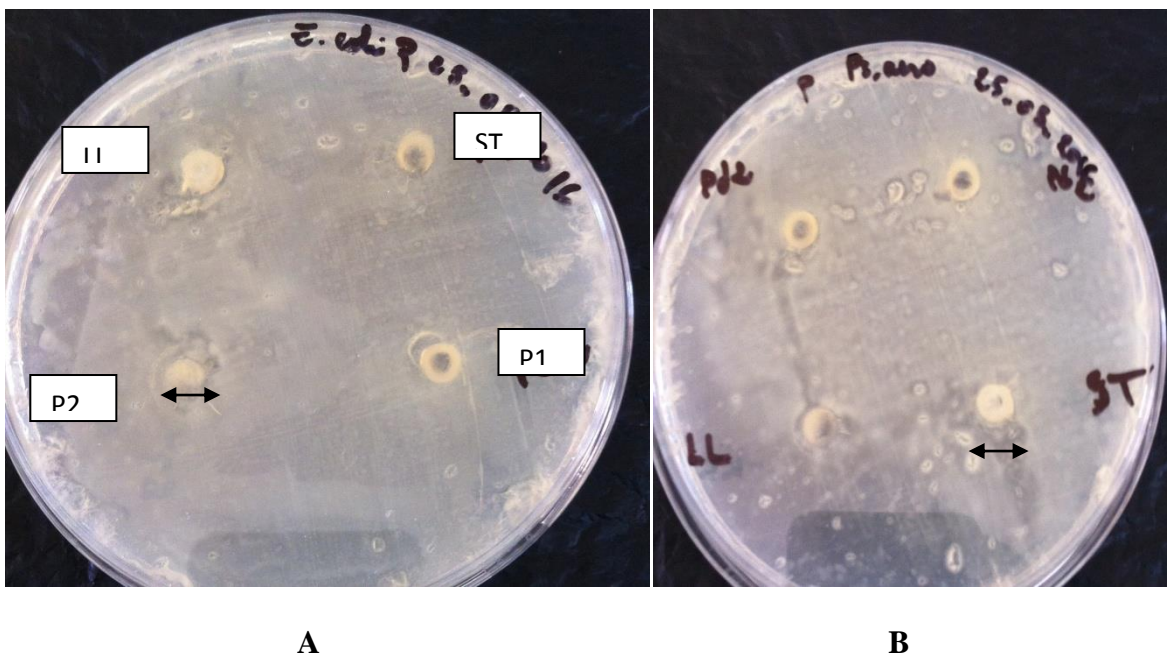
**Figure 23:** Effet du surnageant de *streptococcus thermophilus* traité ou non avec de la pepsine sur les bactéries pathogènes



**Figure 24:** Effet du surnageant de *Pediococcus acidilactici* 1 traité ou non avec de la pepsine sur les bactéries pathogènes



**Figure 25:** Effet du surnageant de *Pediococcus acidilactici* 2 traité ou non avec de la pepsine sur les bactéries pathogènes



**Figure 26 :** Effet de la pepsine sur les bactériocines pour :  
**A :** *E.Coli* ATCC 25922                      **B :** *P.aeruginosa* ATCC 27853

La recherche des bactériocines dans notre étude a montré que toutes les bactéries lactiques testées produisent des bactériocines sensibles à la pepsine.

Nos résultats ont montré des diminutions des diamètres des zones d'inhibition et même leur disparition dans le milieu avec pepsine par rapport au milieu sans enzyme pour toutes les bactéries pathogènes ce qui signifie que le facteur inhibiteur est de nature protéique donc c'est une bactériocine qui explique la dégradation de cette dernière par les enzymes protéolytiques comme le montre les histogrammes dans les figures 22, 23, 24, 25.

La diminution des diamètres des zones d'inhibition peut nous renseigner aussi que la nature des bactériocines est glycoprotéique ou lipoprotéique.

Nos résultats confirment ceux d'AGGAG et KHELIL (2013), qui ont trouvé qu'après ajout de la pepsine, les diamètres des zones d'inhibition ont diminué et même étaient nuls pour la plupart des souches pathogènes.

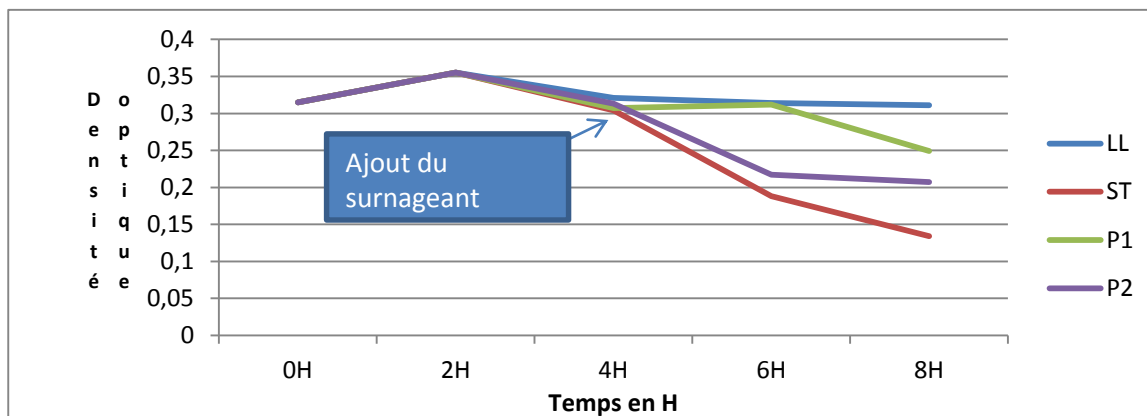
D'après Lewis et al (1991), Chikhi et Hadj Abdelkader (2009), parfois l'action des enzymes protéolytiques n'élimine pas mais diminue légèrement l'inhibition, ceci, montre que l'agent antagoniste contient seulement un composé mineur de caractère protéique, c'est le cas des bactériocines de nature glycoprotéique ou lipoprotéique.

On peut même déduire que :

- *Lactococcus lactis* produit deux bactériocines : une de nature protéique et une de nature glycoprotéique ou lipoprotéique
- *Streptococcus thermophilus* produit une bactériocine de nature glycoprotéique ou lipoprotéique.
- *Pediococcus acidilactici 1* une bactériocine de nature protéique.
- *Pediococcus acidilactici 2* produit deux bactériocines : une de nature protéique et une de nature glycoprotéique ou lipoprotéique.

➤ **La densité optique :**

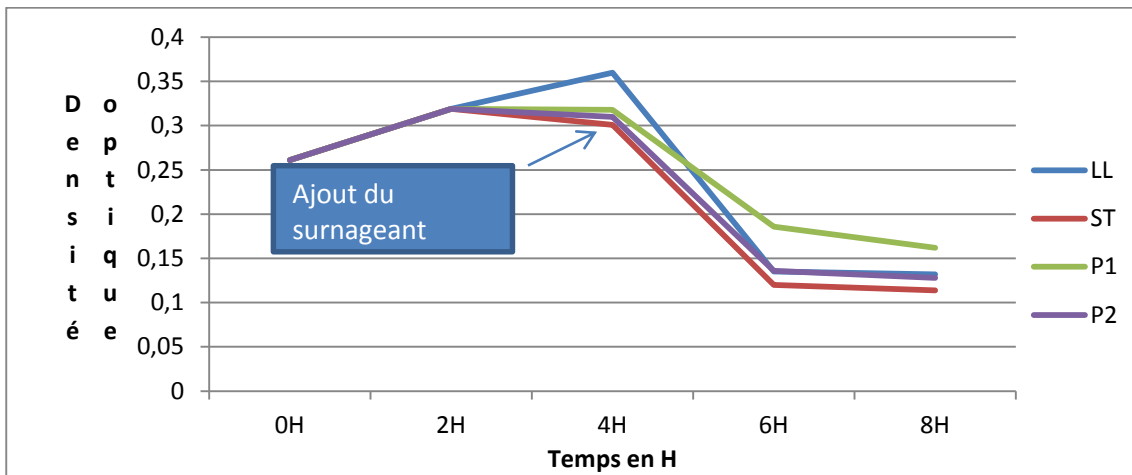
*Staphylococcus aureus* ATCC 25923



**Figure 27 :** La croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 après

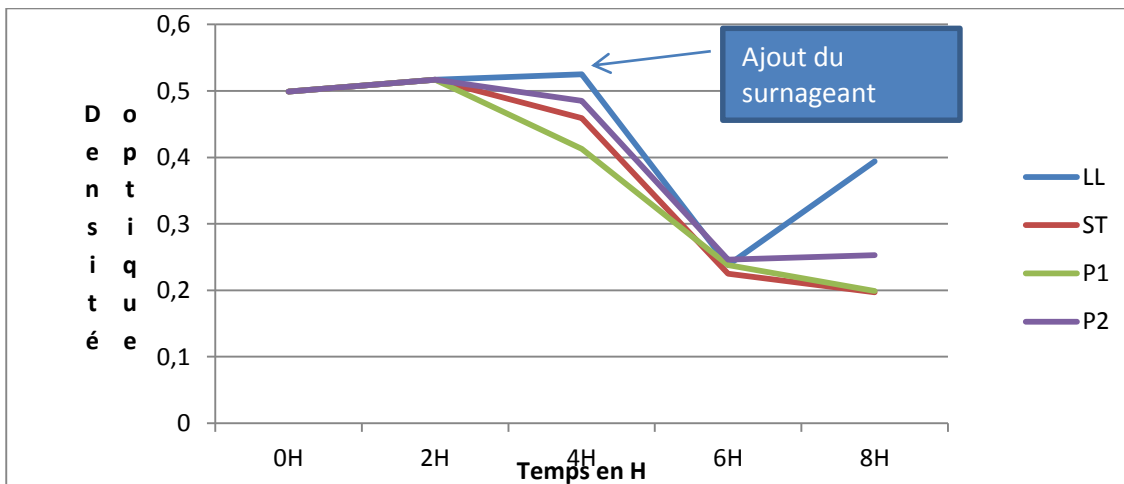
l'ajout de bactériocines de *L.lactis*, *S.thermophilus*, *P.acidilactici 1* et 2

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



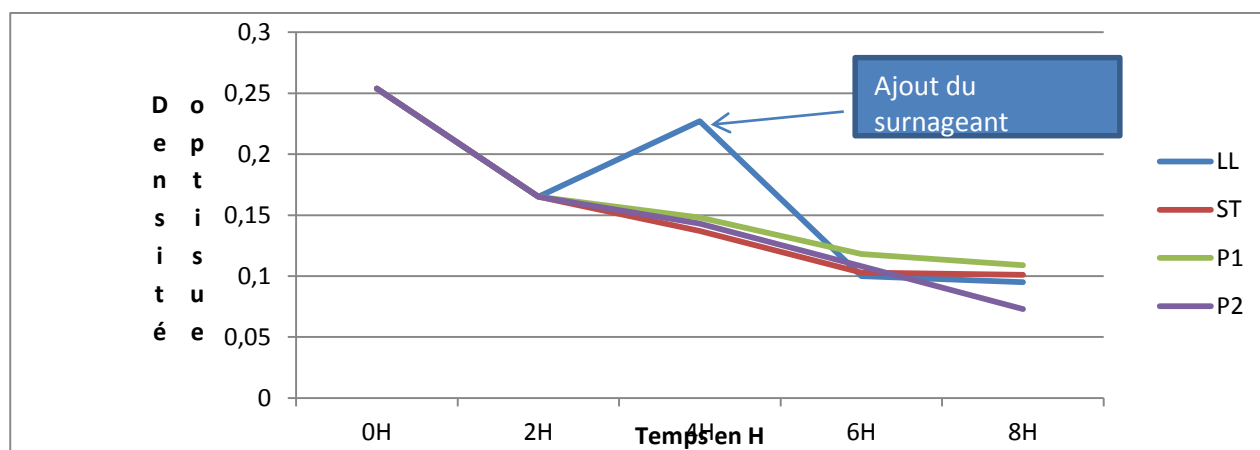
**Figure 28 :** La croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 après l'ajout de bactériocines de *L.lactis*, *S.thermophilus*, *P.acidilactici* 1 et 2

*E.Coli* ATCC 25922



**Figure 29:** La croissance d'*E.Coli* ATCC 25922 après l'ajout de bactériocines de *L.lactis*, *S.thermophilus*, *P.acidilactici* 1 et 2

## Candida albicans ATCC 10231



**Figure 30:** La croissance de *Candida albicans* ATCC 10231 après l'ajout de bactériocines de *L.lactis*, *S.thermophilus*, *P.acidilactici* 1 et 2

Les surnagés des souches lactiques ajoutés aux cultures nuisibles à la quatrième heure, engendrent une diminution rapide de la croissance de ces bactéries qui est déterminé par la mesure de la densité optique.

Les travaux de *Bhunja al. (1991)*, *O'Sullivan et al (2002)* montrent aussi une augmentation de la densité optique puis une diminution de celle-ci après l'ajout du surnageant. *Rodriguez et al. (2000)* montre aussi qu'après quelques heures d'incubation, la croissance de *Staphylococcus aureus* diminue après l'addition du surnageant de *Lactococcus lactis*.

### ➤ Effet de la température : Thermorésistance

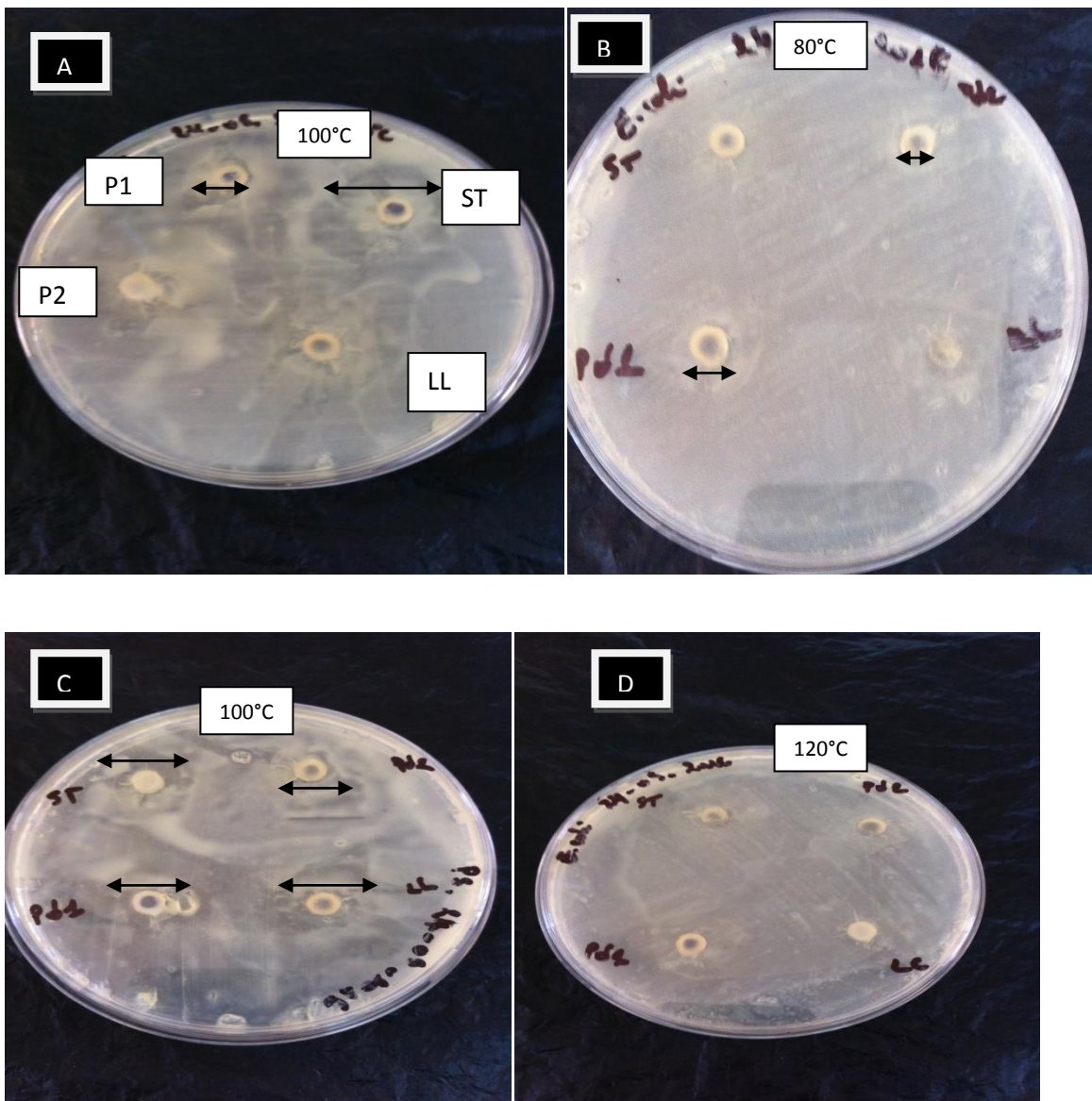
**Tableau 10 :** Résultats des diamètres des zones d'inhibition à différentes températures

<u>Température</u>	<u>Surnageant</u>	<u>S.aureus</u>	<u>P.aeruginosa</u>	<u>E.coli</u>	<u>C.albicans</u>
<u>80°C</u>	LL	20mm	0	0	6mm
	ST	18mm	9mm	0	0
	P1	16mm	6mm	6mm	0
	P2	19mm	0	4mm	0
<u>100°C</u>	LL	15mm	0	0	5mm
	ST	12mm	9mm	0	0
	P1	13mm	6mm	5mm	0
	P2	14mm	0	4mm	0
<u>120°C</u>	LL	0	0	0	0
	ST	0	0	0	0
	P1	0	0	0	0

	P2	0	0	0	0
--	----	---	---	---	---

Nos isolats se sont avérés thermostables au traitement thermique de 80°C pendant 30minutes et à 100°C pendant 15minute dont les zones d'inhibition restent presque inchangées pour 80°C et ont légèrement baissées pour 100°C mais ils sont thermosensibles au traitement de 120°C pendant 10 minutes ce qui révèle aussi la nature protéique de ces substances. **(Figure 31)**

*Vinod Kumar et al, (2006)*, ont obtenu les mêmes résultats en traitant des bactériocines de bactéries lactiques isolées de végétaux à différentes températures à différentes durées de temps ou l'activité des bactériocines à 80° et 100°C était stable mais elle était perdu à 120°C.



**Figure 31 : Aspect des zones d'inhibition :**

**A :** Aspect des zones d'inhibition formées par les surnageants traités à 100°C vis-à-vis de *P.aeruginosa* ATCC 27853

**B :** Aspect des zones d'inhibition formées par les surnageants traités à 80°C vis-à-vis d'*E.coli* ATCC 25922

**C :** Aspect des zones d'inhibition formées par les surnageants traités à 100°C vis-à-vis de *S.aureus* ATCC 25923

D : Aspect des zones d'inhibition formées par les surnageants traités à 120°C vis-à-vis d'*E.coli* ATCC 25922

➤ **Effet de la température d'incubation sur la production des bactériocines**

**Tableau11** : Résultats des diamètres des zones d'inhibition à différentes températures d'incubation

<u>Température</u>	<u>surnageant</u>	<u>S.aureus</u>	<u>P.aeruginosa</u>	<u>E.coli</u>	<u>C.albicans</u>
<b><u>30°C</u></b>	LL	20mm	0	0	6mm
	ST	18mm	9mm	0	0
	P1	16mm	6mm	6mm	0
	P2	19mm	0	4mm	0
<b><u>37°C</u></b>	LL	20mm	0	0	6mm
	ST	18mm	9mm	0	0
	P1	16mm	6mm	6mm	0
	P2	19mm	0	4mm	0
<b><u>40°C</u></b>	LL	0	0	0	0
	ST	0	0	0	0
	P1	0	0	0	0
	P2	0	0	0	0

Les diamètres des zones d'inhibition sont identiques pour toutes les souches lactiques pour les températures d'incubation de 30°C et 37°C et sont nulles pour la température de 40°C ce qui nous renseigne que la température optimale de production des bactériocines chez nos souches lactiques est 30°C et 37°C.

Nos résultats sont similaires à ceux d'*AGGAG et KHELIL (2013)* qui ont trouvé que la température optimale de la production des bactériocines est de 37°C mais pour les températures de 30°C et 40°C, nos résultats diffèrent : pour 30°C nos résultats ont donné les mêmes diamètres des zones d'inhibition que ceux de 37°C alors que leurs résultats ont donné des diamètres des zones d'inhibition qui ont diminué, de même pour la température de 40°C ou à cette température nous avons constaté qu'il n'y a pas production de bactériocines.

Ce résultat a été observé par plusieurs chercheurs étudiants l'effet de la température d'incubation sur la production des bactériocines. En effet *Lim(2010)* n'a détecté aucune activité de bactériocines de *Lactobacillus plantarum* à 40°C d'incubation. Pour expliquer ce phénomène, *Messens et al, (2003)* ont suggéré qu'à une température élevée d'incubation, des protéases sont activées en réponse au stress thermique.

La fréquence de la production des bactériocines diffère selon les souches; *Luo et al.(2011)* ont démontré que seulement cinq souches sur un total de 256 souches de bactéries lactiques testées ont produit des bactériocines. De même, *Salminen et al. (2004)* ont signalé que quatre sur cinquante deux souches de bactéries lactiques étaient productrices de bactériocines.

# *Conclusion*

## **CONCLUSION**

L'utilisation massive et répandue des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, a engendré un problème très épineux qui est la résistance des bactéries pathogènes aux traitements par les antibiotiques.

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'étudier et caractériser les substances antimicrobiennes des bactéries lactiques en se basant surtout sur la recherche des bactériocines par la méthode des interactions de ces souches productrices et les germes pathogènes (*E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*).

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

Par la suite, nous avons mis en évidence le pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques par la technique de diffusion des puits vis-à-vis des *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Candida albicans*.

On a constaté que :

- L'effet antibactérien peut varier selon la souche de bactéries lactiques et selon les conditions de cultures ;
- Les bactéries à Gram positif sont plus sensibles que les bactéries à Gram négatif ;
- Les bactériocines sont sensibles aux protéases (pepsine) ;
- La température d'incubation des bactéries lactiques influe sur la production des bactériocines ;
- La chaleur élevée n'influe pas sur l'activité des bactériocines mais une température de 120°C stoppe l'activité des bactériocines.

D'autres études seront nécessaires pour en savoir plus sur l'action des bactériocines sur les champignons, les protozoaires et ainsi sur les bactéries à Gram négatif qui sera intéressant de fonder une recherche approfondie sur ce point.

Nous espérons donner suite à ces travaux afin d'identifier les substances antimicrobiennes car pour cela, la réalisation d'une série de test est impérative à savoir le peroxyde d'hydrogène, le phage, et l'effet d'autres enzymes protéolytiques pouvant confirmer que la nature de cette substance pourrait être une bactériocine et rechercher la nature exacte des autres facteurs inhibiteurs afin de l'intégrer dans le domaine pharmaceutiques ou agroalimentaires.

# *Références bibliographiques*

## A/

- Abee T. (1995).** « Pore-forming bacteriocins of Gram<sup>+</sup> bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms ». *FEMS Microbiol. Lett.*, **129**, 1-9.
- Achemechem F, Abrini J, (2004).** Production des bactériocines par des bactéries lactiques à partir du jben d chèvre dans le nord du Maroc. *Journal of Applied Microbiology*, **70** ; 660-669
- Adams, M. R. et Hall, C. J. (1988).** Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science and Technology* **23**, 287-292.
- 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
- Ahamad, N. et Marth, E. H. (1989).** « Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid ». *Journal of food protection* **52**, 688-695.
- Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silver, J., Carneiro, L., Magalhães, R. (2009).** Evaluation of bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for « Alheira », a fermented meat sausage. *Food Control* , **20**: 764-770.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I. (2006).** « Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1- Screening and characterization of the antibacterial compounds ». *Food Control* , **17**: 454-461.
- Ammour M. S. (2004).** « Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison Identification et propriétés des bactéries lactiques ». Thèse doctorat Agrocampus Rennes.
- Aslim, B., Yuksekdog, Z.N., Sarikaya, E et Beyatli, Y. (2005).** « Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products ». *Food Science and Technology* **38**: 691-694.
- Ayad, E. H. E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H. et El-Soda, M. (2004).** « Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria ». *Food Microbiology*, **21**: 715-725.
- Axelsson. L. (1993).** Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Salminen S. and von Wright A., pp: 1-63. Marcel Dekker Inc. New York.
- ## 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 ; Guetarni.D ; Moussa Boudjemaa.B ; Henni. D. E ; Kihal. M . (2004).** Identification and technological properties of lactic bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology* **21** (2004) 579-588
- Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. 2005.** « Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle». *Scien &Tech*, **23** : 30-37.
- Bailey JE, Ollis DF. (1986).** *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2ème Edition, McGraw-Hill, Singapore
- Barefoot S.F and Klaenhammer T.R, (1983),** Detection and activity of lactacin B.a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(6). 1808-1815.
- Bergey's manual. (2009).** *Systematic of bacteriology*. Second Edition. Volume three the firmicutes. Edition springer
- Berecka, M. P., Wasko, A., Koston, D. (2009).** Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *Annales. Vol. LXIV*1.
- BioMérieux, 2009.** « API 20 Strep Système d'identification des *Streptococcaceae* et germes apparentés ».RCS LYON Marcy-l'Etoile / France
- Borch E, Berg H., Holst O. (1991).** « Heterolactic fermentation by a homofermentative *Lactobacillus* sp. During glucose limitation in anaerobic continuous culture with cell recycle ». *J.Appl. Bacteriol.* **71** : 265-269.

**Bhunia, A.K., Johnson, M. C. and Ray, B. (1991).** « Mode of action of pediocin ACh from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains ». *J. Appl. Bacteriol.* 70: 25-33.

C/

**Caplice, E., Fitzgerald, G. (1999).** Food fermentations: role of microorganisms in food

**Calvez, S ; Belguesmia, Y ; Kergourley, G.(2009).** in bactériocines : de la synthèse aux applications in bacteries lactiques : physiologique , métabolisme, génomique et applications industrielles édition : Economica .2009. p 100-122.

**Carine, D ; Tonart, P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. BASE. VOLUME 13.

**Carr F.J., Chill D., Maida N. (2002).** « The Lactic Acid Bacteria : A Littérature Survey ». *critical Rev. Microbiol.* 28 :281-370 ;

**Chammas, G.I., Saliba, R. and Béal, C. (2006).** Characterization of the fermented milk —Labanl with sensory analysis and instrumental measurements. *J. Food Sci.* 71: S156–S162

**Chikhi et Hadj Abdelkader. (2009).** Inhibitions par les bactéries lactiques du genre *Leuconostoc* isolées du lait de chèvre et de brebis et recherche des bactériocines. Mémoire de Fin d'Etudes en vue d'obtention du diplôme d'ingénieur d'Etat en Biologie. Option : contrôle de qualité et analyses. Université de Tlemcen.

**Chye, F.Y., Abdullah, A. and Ayob, M.K. (2004).** Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiol.* 21: 535–541.

**Collins, M.D., Jons, D. (1981).** « Growth Bifidobacteria in milk and preparation of Bifidobacteria infantis for a dietary adjunct ». *J. Dairy Sci,* 67 : 1376-1380.

**Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J., Wallbanks S. (1993).** « Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages : Description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species ». *J. Appl . Bacteriol.* 75 : 595-603

**Cutler, P. (2004).** Methods in molecular biology: protein purification protocols. Humana Press Inc., Totawa, NJ.

D/

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

**Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk, M.C. et Janssens, D. (1994).** « Caractéristiques générales des bactéries lactiques ». P : 25-116. In : De Roissart, Luquet F.M. (ed) *Bactéries lactiques.* Vol 1. Lorica Uriage, Paris, France.

**De Man, J.D., Rogosa, M., Sharpe, M.E. 1960.** A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. – *J. Appl. Bact.* 23: 130-135.

**De Roissart, H. et Luquet, F.M. (1994).** Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. pp. 1-286

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

**Desmazeaud, M. (1996).** Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaines : utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures,* 5, pp: 331-343.

**Devos P, Garrity G.M, Jones D, Krieg N.R, Ludwig W, Rainery F.A, Schleifer K.H ,Whiteman W .B, 2009 .** « Bergey's manual of systematic bacteriology : Firmicutes. Second edition . Volume three. Springer

**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.

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

**Drider .D ; Prévost. H. (2009).** Bactéries lactiques : physiologique, métabolisme, génomique et applications industrielles Edition : Economica

**Drouault, S. et Corthier, G. (2001).** « Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés »

E/

**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.

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

**F/**

**FAO, T. W. H. O. (2001)** .Probiotic definition

**Fenton M.P. (1987).** An investigation into the source of lactic acid bacteria in GRAS silage *J. Appl Bacteriol.* 62 :181-188

**Fuqua, C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1996).** « Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators ». *Annu Rev Microbiol* 50: 727-751.

**G/**

**Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Oma, N. (2007)** . « Bacteriocin-based strategies for food biopreservation ». *Int. J. Food Microbiol.* 120(1-2), 51-70.

**Ghalfi, 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.

**Ghrairi, 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.

**Gonzalez, et al., (2007).** In **Boudjani, W. (2009).** « Action de la flore lactique sur les bactéries contamination ». Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.

**Gravesen, A., Ramnath, M., Rechinger, K.B., Andersen, N., Jänsch, L., Héchard, Y.,**

**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.

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

**GUIRAUD J.P. 2004.** « Microbiologie alimentaire ». Edition DUNOD. P.

**H/**

**Hainque, B., Baudin, B., Lefebvre, P. (2008).** Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

**Hassaine O ; Zadi-Karam H ; Karam N.E, 2007.** « Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*) » *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (14), pp. 1720-1727,

**Hastings, J.W., Knochel, S. (2002).** « High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *L. monocytogenes*. *Microbiology*, **148** : 2361- 2369

**Hata, T., Tanaka, R., Ohmomo, S. (2010).** Isolation and characterization of plantaricin ASM1: a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A1. *Int. J. Food Microbiol .*, **137**: 94-99.

**Héchard, Y., Pelletier, C., Cenatiempo, Y., Frère, J. (2001)** « Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis* » : a mannose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology*, **147** : 1575-1580.

**Herranz, C et Driessen, A. J. (2005).** « Sec-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis* ». *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1959-1963.

**Holzappel, W. H., Geisen, R. et Schillinger, U. (1995).** Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24, 343-362.

**Holzappel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis In't Veld J.H.J. (1998).** « Overview of gut flora and probiotics ». *Int. J. Food Microbiol.* 41 :85-101

**Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73(suppl):** 365S–73S.

**Hugenholz J., Kleerebezem M. (1999).** « Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations ». *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10(5)**, 492-49

**K/**

**Kaichayanand N., Hanlin M.B. and Ray B. (2008)** - Sublethal injury makes Gram negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Letters in Applied Microbiology*, **15**: 239-243.

**Kamoun, P., Lavoigne, A., DeVerneuil, H. (2003).** Biochimie et biologie moléculaire. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

**Karthikeyan, V. et Santhosh, S. W. (2009).** « Study of bacteriocin as a food preservative and the *L.acidophilus* strain as probiotic ». *Pak. J. Nutr.* , **8**: 335-340.

**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.

**Klaenhammer.TR, (1988)** in les bacteriocines des bacteries lactiques ,caracteristiques et interets pour la conservation des produits alimentaires . BASE.VOLUME 13.

**KLAENHAMMER T R. (1993).** « Genetics of bacteriocins of lactic acid bacteria » FEMS Microbiology Reviews. **12** :39-85

**Klaenhammer TR . Barrangou R ., Logan Buck B , Azcarate-Peril M.A .( 2005).**

Genomicfeatures of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health FEMS Microbiol. Rev. **29**, 393-409

**Kandler, O., Weiss, N., (1986).** « Genus Lactobacillus ». In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology., vol 2. P.H.A, Sneath., N.S, Mair., Sharpe, M.E., Holt, J.G (Ed). Williams and Wilkins, Baltimore, M.D.

**KARAM N-E., ZADI-KARAM H., LAZREG L., DALACHE F., (2008).** « Bactériocines de bactéries lactiques : caractérisation d'une bactériocine d'Enterococcus BO2 ». Renc. Rech. Ruminants

**Kelly WJ., Davey G.P., Ward LJ. (1998).** « Characterisation of lactococci isolated from minimally processed fresh and vegetables ». *Int J. Food Microbiol.* **45** :85-92

**KHEDID K., FAID, M.,MOKHTARI, A., SOULAYMANIA ET ZINEDINE, A.(2006).** « Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Moroco ». *Microbiol.Res.***10** : 10-16. bacteria and yeast.

**Kleerebezem M, Quadri LEN, Kuipers OP, de Vos WM. (1997).** Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* **24** : 895-904.

**L/**

**Laease, (2005).** In **Boudjani, W. (2009).** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen. 73 pages.

**Laurent, S. (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. *Poly technica Paris.* 307 pages.

**Le Lay. C, (2009).** « Mise en évidence et caractérisation in vitro de l'activité antifongique de la nisine Z, une bactériocine produite *LACTOCOCCUS LA CTIS* SSP. *LPA CTIS* BIOV AR *DIACETYLLACTIS* UL 719, SUR *CANDIDA ALBICANS* ». Obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)P : 70

**Lim S.M, 2010.** « Cultural conditions arid nutritional components affecting the growth and bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* KC2 1 ». *Food Sci. Biotechnol.* **19** : 793-802.

**Luo F., Feng S., Sun Q, Xiang W., Zhao J., Zhang J., Yang Z. (2011).** « Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from kurut, a traditional naturally-fermented yak milk from QinghaieTibet plateau ». *Food Control* **22** : 50-53.

**Luquet, F.M., Keilling, J.,et de Wilde,R., (1985).** Lait et produits laitiers : vache, brebis et chèvre. Les laits de la mamelle à la laiterie. Lavoisier. France

**Luquet, F.M. et Corrieu, G. (2005).** « Bactéries lactiques et probiotiques ». Edition Lavoisier, Paris. 307 pages.

**M/**

**Makhloufi .K. M. (2012)** . « Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza ». Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Spécialité : microbiologie, biochimie (école doctorale iviv)

**Mami, A., Henni, J. E., Kihal, M. (2008).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus* . *World J. Dairy & Sci.* **3**: 39-49.

**Mami, A ;Hamedi. A ;Henni.J .Kerfouf. A ;Kihal. M. (2010).** Activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. LES TECHNIQUES DE LABORATOIRE -2010, volume 5, N°21

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

**Marshall V.M.E., Law B.A.(1984).** « The physiology and growth of dairy lactic acid bacteria ». P : 153-186. In : De Davies F.L., Law B.A. (ed) *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. Elsevier Applied Science Publisher.

**Mayeux J.V, Sandine W.E, Elliker P.R, (1962).** « A selective medium for deting *Leuconostoc* in mixed strain starter culture. *J Dairy Science.* 45 :655-656

**Mc Auliffe et al (2001).** In *Bacteriocins: biological tools for bio preservation and shelf-life extension*. International .Dairy .Journal .2006

**McKay, L.L et Baldwin, K.A. (1990).** »Applications for biotechnology : present and future improvements in lactic acid bacteria ». *FEMS Microbiol. Rev.* **87** : 3-14.

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

**Moll. G. N; Konings. W. N; Driessen. J. M. (1999)** .Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation .*Antonie Van Leeuwenhoek* 76: p 182

**Messens. W, Vesluyten.J, Leroy.F, De Vuyst. L, (2003).** « Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH1174 in response to temperature and PH values used for Europeen sausage fermentation process ». *Int. J Food Microbiol.* 81 : 41-52

**Murphy M.G., O'connor L., Walsh D., Condon S. (1985).** « Oxygen dependent lactate utilization by *Lactobacillus plantarum* ». *Arch. Microbiol.* 141 : 75-79

**N/**

**Nehem Nancy. (2008).** Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni* impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes. . THÈSE pour obtenir le titre de Docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse. Spécialité : Génie des procédés et Environnement

**Nissen P, Nielsen D, Arneborg N. (2003).** « Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* ». 20: 331-341.

**Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. et Panyim, S. (2003).** « Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage ». *International Journal of Food Microbiology*, **81**: 137-145.

**O/**

**Oh, D. H. et Marshall, D. L. (1993).** Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 20, production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50(1-2), 131-149.

**Onda T., Yanagida F., Tsuji M., Shinohara T. et Yokotsuka K. (2003).** « Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste ». *Inernational Journal of Food and Microbiology.*87 (1-2): 153-159.  
Products ». *Food Microbiology* **15**: 223-233.

**Ostergaard, A., Embarek, P. K. B., Wedell-Neergaard, C., Huss, H.H et Gram, L. (1998).** « Characterization of antilisterial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish

**O' Sullivan, L., Morgan, S. M., Ross, R. P. and Hill, C. (2002).** « Elevated enzyme produced by *Lactococcus lactis* DPC5552. J., release from Lactococcal starter cultures on exposure to the lantibiotic Lacticin 481 ». Dairy Sei. 85: 2130-2140

**P/**

**Papa Abdoulaye Fall. (2011).** « Études des interactions entre une bactérie bioprotectrice, *Lactococcus piscium* CNCM I-4031, et *Brochothrix thermosphacta* et *Listeria monocytogenes* dans la crevette tropicale ». Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ DE NANTES 239-246

**Patterson C, PhD, PAg The pathfinder Research & Management Ltd (2008).** « Probiotiques : Bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base », 1-4.

**Pattnaik, P., Grover, S. and Batish, V.K. (2005).** « Effect of environmental factors on production of lichenin, a chromosomally encoded bacteriocin-like compound produced by *Bacillus. licheniformis* 26L-10/3RA ». Microbiological Research **160**: 213-218.

**Penner et al (2005).** « Probiotics and nutraceuticals: no medicinal treatments of gastrointestinal disease s ». In Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat 2012.

**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.

**Pringsulaka O., Thongnam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., Rangsiruji, A. (2011).** Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control* , **23**: 547-551.

**Puizani R.S., Rao R.D., Sunki R., (1992).** « Antimicrobial activity of lactic culture : partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus Thermophilus* ». J. Food Science, **44**: 575-578.

**R/**

**Raynaud, S. (2006).** « Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis* ». Thèse pour obtenir le grade de docteur. Spécialité : Sciences écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries.

**Requena T., Plaetz C. (1995).** Revision : Activated antimicrobials de bacterias lacticas. Produccion de bacteriocinas. Rev. Esp. Cien. Tecnol. Aliment. **35** : 19-44 .

**Rhee S.K., Pack M.Y., (1980).** « Effect of environmental pH on fermentation balance of *Lactobacillus bulgaricus* ». J. Bacteriol. **144** : 217-221

**Ried et al (2003).** Potential uses of probiotics in clinical practice. In Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat 2012.

**Riley, M. A. et Chavan, M. A. (2007).** « Bacteriocins: Ecology and Evolution ». Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

**S/**

**Salminen. S., Ouwehand, A.C., Benno, Y., Lee, Y.K. (1999).** « Probiotics: How should they be defined ». *Trends Food Sci. Technol.* **10**: 107-110.

**Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. (2004).** « Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects ». Marcel Dekker. Inc., U.S.A.

**Savadogo, A. Ouattara, C.A.T. Savadogo, P.W. Ouattara, A.S. Barro, N. Traore, A.S. 2004.** « Microorganisms Involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso ». *Pakistan Journal of Nutrition* **3** (2): 134-139.

**Schillinger U and Luke F., (1989).** « Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat ». *Appl. Environ. Microbiol.* **55**.

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

**Siewerts, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J. et van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008).** « Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches ». *Applied and environmental microbiology* **74**, 4997-5007. August 15, 2008.

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

**Sookkhee S., Chulasiri M., Prachyabrued W. (2001).** « Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers : Inhibition of oral pathogens ». *Appl Microbiol.* 90 : 172-179

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

**Stiles, M. and Holzapfel, W. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, **36**, pp: 1-29.

**T/**

**Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W. (1976).** Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **40**: 722-756.

**TERZAGHI B. F. et Sandine . F(1975).** Improved medium for lactic *Streptococci* and their bacteriophages. *Applied. Microbiol.* 29 : 807-813.

**Thompson J., Gentry-Weeks C.R. (1994)** Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques, Vol. I, p 239-290 (Editeurs : De Roissart H., Luquet)

**Touati, D. (2000).** « Iron and oxidative stress in bacteria ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373, 1-6.

**Towmey D et al., (2002) .** in bactéries lactiques : physiologique , métabolisme, génomique et Applications Industrielles Edition : Economica .2009. P 100

**U/**

**Uhlman, L., Schillinger, U., Rupnow, J.R., et Holzapfel, W.H. (1992).** « Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables ». *International Journal of Food Microbiology* **16**: 141-151

**V/**

**Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. (1996).** « Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics ». *Microbiol. Rev.* **60**: 407.

**Van de Guchte, M., Ehrlich, S. D. et Maguin, E. (2001).** « Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii* ». *Journal of Applied Microbiology* 91, 147-153.

**Vinod Kumar J., Somesh S. et Neerja S., (2006).** « Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolated of Natural Lactic acid fermentation of vegetables ». *Food technology and Biotechnology*, 44 (3):435- 439.

**Vlaemynck, G., Herman, L et Coudijzer, K. (1994).** « Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes* ». *International Journal of Food Microbiology.* 24: 211-225.

**Vollenweider, S. (2004).** 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.* **64**, 16-27

**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/**

**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.

**Yang, R., Johnson, M. C., Ray, B. (1992).** Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* , **58**: 3355-3359.

**YILDIRIM Z. and YILDIRIM M. (2001).** Characterization of buchnericin lb produced by *Lactobacillus buchneri* LB. *Turkish Journal of Biology.* **25**: 73-82.

**Z/**

**Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J. and De Vuyst, L. (2006).** Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**: 487-495

# Annexe 1

## Milieux de culture

- **Milieu de Chapman (Guiraud, 1998)**

### Composition :

Extrait de viande.....	1g
Peptone .....	10g
Chlorure de Sodium ( NaCl ).....	75g
Mannitol.....	10g
Rouge de phénol.....	0,025g
Gélose.....	18g
Eau distillée.....	1000 ml

Autoclaver à 120°C/20mn

- **Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

### Composition :

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

pH6.5.

Autoclaver à 120°C/20mn

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

- **M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)**

Tryptone.....	2,50 g –
Peptone pepsique de viande .....	2,50 g –
Peptone papainique de soja .....	5,00 g –
Extrait autolytique de levure.....	2,50 g
Extrait de viande .....	5,00 g
Lactose .....	5,00 g
Glycérophosphate de sodium .....	19,00 g
Sulfate de magnésium .....	0,25 g
Acide ascorbique .....	0,50 g
Agar bactériologique.....	15,00 g

pH: 7,1 ± 0,2.

• **Mannitol-mobilité :**

Peptone trypsique de viande ..... 20 g  
Agar.....4 g  
Mannitol ..... 2 g  
KNO<sub>3</sub>..... 1 g  
Rouge de phénol à 1 % ..... 4 ml  
Eau distillée q.s.p ..... 1000 ml  
pH=7.6-7.8

Autoclaver à 120°C/20mn

• **Mueller Hinton :**

Infusion de viande de boeuf .....2 g  
Amidon..... 15 g  
Hydrolysat de caséine .....17g  
Agar .....17 g  
Eau distillée..... 1000 mL  
pH =7

Autoclaver à 120°C/20mn

• **Eau physiologie :**

NaCl ..... 9g  
Eau distillée ..... 1000 ml

Autoclaver à 120°C/20mn

• **Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)**

Tryptone 20 g  
Gélatine 2.5 g  
Extrait de levure 5 g  
Saccharose 100 g  
Glucose 5 g  
Citrate de sodium 1 g  
Azide de sodium 0.075 g  
Agar-Agar 15 g  
Eau distillée 1000 ml  
PH 6,8 Autoclavage 120°C/ 20 minutes

• **Sabouraud :**

Peptone de gélatine..... 10g  
Glucose .....20g  
Agar..... 17g  
Eau distillée..... 1000 ml  
pH5.6

Autoclavage 120°C/ 20 minutes

**Gélose nutritive (GN)**

Peptone..... 15g  
Extrait de levure..... 3g  
NaCl .....6g

- Agar .....15g  
Eau distillée..... 1000ml  
- PH 7.5±0.2  
Autoclavage à 121°C pendant 15min

- **Bouillon nutritif** est non additionné de gélose à raison de 1.5 %

- **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

- **BCPL**

Peptone .....5,0 g  
Extrait de viande de bœuf ..... 3,0 g  
Lactose .....10,0 g  
Pourpre de bromocrésol ..... 25 mg  
Agar .....15 g  
Eau distillée .....1000ml

(pH = 6,8)

Autoclavage 120°C/ 20 minutes

- **Gélose au cétrimide :**

Peptone de gélatine:.....16,0 g  
Peptone de caséine..... 10g  
Bromure de tétradonium cétrimide..... 0,2g  
Acide nalidixique..... 15mg  
Sulfate de potassium.....10g  
Chlorure de magnésium.....1,4g  
Agar..... 15g

pH = 7,1

Autoclavage 120°C/ 20 minutes

# Annexe 2

**Tableau :** les résultats de l'api 20 strep Biomérieux

	<b>ST</b>	<b>LL</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>
VP : production d'acétoïne (Voges Proskauer)	-	+	-	-
HIP hydrolyse (acide HIPpurique)	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>
ESC : hydrolyse $\beta$ -glucosidase (ESCuline)	-	-	+	-
PYRA : PYRrolidonyl Arylamidase	-	-	+	-
$\alpha$ GAL : $\alpha$ GALactosidase	-	-	-	-
$\beta$ GUR : $\beta$ -GIUcuRonidase	-	-	-	-
$\beta$ GAL : $\beta$ -GALactosidase	-	-	+	-
PAL : Phosphatase ALcaline	-	-	-	-
LAP : Leucine AminoPeptidase	-	+	+	+
ADH Arginine DiHydrolase	-	+	+	+
RIB : D-ribose	-	+	-	+
ARA : L-arabinose	-	+	-	+
MAN : D-mannitol	-	+	-	-
SOR : D-sorbitol	-	-	-	-
LAC : D-lactose (origine bovine)	-	+	-	+
TRE : D-tréhalose	+	+	+	+
INU : inuline	-	-	-	-
RAF : D-raffinose	-	-	+	+

AMD : amidon	-	-	-	-
GLYG : glycogène	-	-	-	-

**Tableau :** les résultats de la mesure des densités optiques

	<b>0H</b>	<b>2H</b>	<b>4H</b>	<b>6H</b>	<b>8H</b>
<i>S.aureus</i>	0,315	0,355	LL : 0, 321	LL : 0,314	LL : 0, 311
			ST : 0,304	ST : 0,188	ST : 0,134
			P1 :0,307	P1 :0,312	P1 :0,249
			P2 :0,313	P2 :0,217	P2 :0,207
<i>P.aeruginosa</i>	0,261	0, 319	LL : 0,360	LL : 0,135	LL : 0,132
			ST : 0,301	ST : 0,120	ST : 0,114
			P1 :0,318	P1 :0,186	P1 :0,162
			P2 :0,301	P2 :0,136	P2 :0,128
<i>E.coli</i>	0,499	0,517	LL : 0,525	LL : 0,238	LL : 0, 394
			ST : 0,459	ST : 0,225	ST : 0,197
			P1 :0,413	P1 :0,238	P1 :0,199
			P2 :0,485	P2 :0,246	P2 :0,253
<i>C.albicans</i>	0,254	0,165	LL : 0,227	LL : 0,100	LL : 0,095
			ST : 0,137	ST : 0,103	ST : 0,101
			P1 :0,148	P1 :0,118	P1 :0,109
			P2 :0,143	P2 :0,108	P2 :0,073

**Tableau :** Diamètres des zones d'inhibition formés par les souches lactiques confrontés avec les bactéries pathogènes en mm

	<i>Stahylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	14mm	5mm	0mm	14mm
<i>Streptococcus thermophilus</i>	12mm	8mm	0mm	9mm
<i>Pediococcus acidilactici1</i>	15mm	10mm	5mm	9mm
<i>Pediococcus acidilactici2</i>	16mm	0mm	3mm	12mm

**Tableau :** Diamètres des zones d'inhibition formés par les surnageants non neutralisés confrontés avec les bactéries pathogènes en mm

	<i>Stahylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	0mm	6mm	0mm	4mm
<i>Streptococcus thermophilus</i>	3mm	9mm	0mm	5mm
<i>Pediococcus acidilactici1</i>	5mm	0mm	4mm	0mm
<i>Pediococcus acidilactici2</i>	3mm	0mm	0mm	5mm

**Tableau :** Diamètres des zones d'inhibition formés par les surnageants neutralisés confrontés avec les bactéries pathogènes en mm

	<i>Stahylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	20mm	0mm	0mm	6mm
<i>Streptococcus thermophilus</i>	18mm	9mm	0mm	0mm
<i>Pediococcus acidilactici1</i>	16mm	7mm	6mm	0mm
<i>Pediococcus acidilactici2</i>	19mm	0mm	4mm	0mm

**Tableau:** Diamètres des zones d'inhibition formés par les surnageants non traités avec la pepsine confrontés avec les bactéries pathogènes

	<i>Stahylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	20mm	0mm	0mm	6mm
<i>Streptococcus thermophilus</i>	18mm	9mm	0mm	0mm
<i>Pediococcus acidilactici1</i>	16mm	7mm	6mm	0mm
<i>Pediococcus acidilactici2</i>	19mm	0mm	4mm	0mm

**Tableau:** Diamètres des zones d'inhibition formés par les surnageants traités avec la pepsine confrontés avec les bactéries pathogènes

	<i>Stahylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	9mm	0mm	0mm	0mm
<i>Streptococcus thermophilus</i>	10mm	7mm	0mm	0mm
<i>Pediococcus acidilactici1</i>	0mm	0mm	0mm	0mm
<i>Pediococcus acidilactici2</i>	0mm	0mm	3mm	0mm