



DEPARTEMENT DE BILOGIE

N°...../SNV/2018

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Seddaoui M'hamed

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : MICROBIOLOGIE FONDAMENTAL E

THÈME

**Essai de caractérisation des bactériocines
Issues des bactéries lactiques et l'étude
De l'effet antagoniste vis-à-vis de quelques
Germes pathogènes.**

Soutenu publiquement le **04/07/2018**

DEVANT LE JURY

Président	Mr CHERIGUENE Abderrahim	Prof C.U. Tissemsilt
Encadreur	Mme CHOUGRANI Fadela	Prof U. Mostaganem
Co encadreur	Mr ZABOURI Younes	MAA U. Mostaganem
Examineur	Mme ZARGOUG Amina	MAA U. Mostaganem

Laboratoire de Microbiologie
Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

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

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

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

Nos remerciements les plus sincères vont à **Mr ZABOURI Younes MAA** à l'université de *Mostaganem* pour l'honneur qu'il nous a fait en codirigeant ce travail, nous tenons à lui exprimer notre reconnaissance pour sa grande disponibilité, ses conseils et pour son écoute attentive tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Nous remercions **Mr CHERIGUENE**, professeur au *Universitaire de Mostaganem*, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury.

Nous remercions également **Mme ZARGOUG**, *MAA* à l'université de *Mostaganem* d'avoir accepté d'examiner ce travail.

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

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

Dédicace

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

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

A mes très chères sœurs Souad , Fatima et samia yasmine, et à mon Abdelkader, qui m'ont aidé et Frère donné le courage

A tous ma très chère amie

Je dédie aussi ce mémoire, à tous mes collègues de la promo .

Liste des abréviations

ADH : Arginine Deshydroloase.

ADN: Acide Désoxyribonucléique.

ARN: Acide Ribonucléique.

ATB : Antibiotique.

ATCC : American Type of culture collection

ATP: Adénosine Triphosphate.

ATP : Adinosine triphosphate.

BAL : Bactérie lactique.

BCP : Bromocrésol pourpre.

BN : Bouillon nutritive.

BPO : Bactéries pathogènes opportunistes

BPS : Bactéries pathogènes spécifiques

C° : Degré celçus.

cm: Centimètre

CO₂ : Dioxyde de carbone.

D : Diamètre.

E.coli : *Escherichia coli*.

g : Gramme.

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

GN : gélose nutritive.

GRAS: généralement considérées comme sûres.

G+C: Guanine + Cytosine

H : Heure.

HCl: Chlorure d'hydrogène

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

kDa : Kilo Dalton.

Lb: *Lactobacillus*.

ml : Millilitre.

Mm : millimètre.

mM: Milli-molaire

min : Minute.

MSE : Gélose de MAYEUX, SANDINE et ELLIKER

MRS : de Man, Rogosa et scharpe.

NaCl: Chlorure de sodium.

NaOH: Hydroxyde de sodium

O₂ :oxygène..

pH : Potentiel hydrogène.

VP: Voges-Proskauer

μl: Microlitre

μ: Micron

μg: Microgramme

μm: Micromètre

Liste Des Figures

Figure 1 : Schéma de différenciation des principaux genres de bactéries lactiques	03
Figure 2 : Schéma très simplifié des voies de fermentation des sucres par les bactéries lactiques.....	04
Figure 3 : Structures moléculaires des antibiotiques représentatifs des différents types	14
Figure 4 : les modèles de formation des pores (A) : pores en forme de coin, (B) : pore en forme de tonneau en bois debout.....	15
Figure 5 : observation microscopique électronique de <i>salmonella typhi</i> et <i>salmonella infantis</i>	21
Figure 6 : observation microscopique électronique de <i>Listeria monocytogenes</i>	22
Figure 7 : Aspect morphologique de la souche de <i>Staphylococcus aureus</i> observée au microscope électronique	23
Figure 8 : <i>Escherichia coli</i> observée au microscope électronique.....	24
Figure 9 : Observation de cellules <i>p.aeruginosa</i> entières vu avec le microscope électronique à balayage.....	24
Figure 10 : Méthode de de détection de l'antagonisme bactérien en milieu liquide, méthode de diffusion en puits	30
Figure 11 : Méthode de détection de l'antagonisme bactérien en milieu solide, méthode de double couche.....	31
Figure 12 : aspect lenticulaire de couleurs blanches des colonies des bactéries lactiques sur milieu MRS solide après incubation à 30 ⁰ C pendant 24h.....	32
Figure 13 : Aspect des souches lactiques pures en milieu MRS liquide.....	33
Figure 14 : résultats de Coloration de Gram des souches lactiques.....	34
Figure 15 : les bactéries lactiques poussent dans le bouillon MRS avec des concentrations 4% (a), et 6.5% (b) de NaCl.....	35
Figure 16 : le test du type fermentaire des différentes souches lactiques	36
Figure 17 : le test croissance sur le lait «bleu de Sherman».....	37
Figure 18 : Résultats du test de l'arginine (ADH) arginine déshydrogénase.....	38

Figure 19 : résultats de test de profil fermentaire des souches étudié	39
Figure 20 : résultat de test de production du dextrane.....	40
Figure 21 : test de citrate sur le milieu.....	41
Figure 22 : résultat de test de production d'acétoine.....	42
Figure 23 : aspects microscopiques des souches pathogènes utilisées.....	42
Figure 24 : résultats de l'activité de bactériocine dans le milieu liquide	43
Figure 25 : histogramme représente résultats de l'activité de bactériocine dans le milieu liquide	44
Figure 26 : résultats de la méthode de double couche.....	45
Figure 27 : l'action d'enzyme protéolytique	46
Figure 28 : histogramme représente l'action d'enzyme protéolytique.....	47
Figure 29 : résultats d'effet de la température sur les extraits des bactéries lactiques vis-à-vis de souches staphylococcus aureus.....	48
Figure 30 : Résultats d'effets du ph sur les extraits des bactéries lactiques vis-à-vis de souches.....	49
Figure 31 : histogramme représente Résultats d'effets du ph sur les extraits des bactéries lactiques vis-à-vis de souches	50

Liste des tableaux

Tableau 1 : principaux produits issus de la fermentation des bactéries	09
Tableau 2 : classification des bactériocines de bactéries lactiques	12
Tableau 3 : les principales bactériocines des bactéries lactiques	14
Tableau 4 : Exemples d'application de bactériocines en protection de produits carnés.....	17
Tableau 5 : quelques principales bactéries pathogènes spécifiques facultatives.....	18
Tableau 6 : quelques principales bactéries pathogènes spécifique obligatoires.....	19
Tableau 7 : Flores commensales normales humaines	19
Tableau 8 : Flores exogène.....	20
Tableau 9 : bactérie à exotoxines protéiques	21
Tableau 10 : les caractères macroscopiques des 5 souches des bactéries lactiques	33
Tableau 11 : critères morphologiques le Gram des 05 souches des bactéries lactiques	34
Tableau 12 : représente les résultats des tests de catalase, Croissance à différentes températures, Thermorésistante, Croissance en milieu hyper salé.....	36
Tableau 13 : représente les résultats du test du type fermentaire sur MRS liquide...	37
Tableau 14 : représente les résultats du test de l'arginine (ADH) des isolats retenus	38
Tableau 15 : profils fermentaire des sucres par les souches étudiée.....	39
Tableau 16 : résultat de test de production du dextrane.....	40
Tableau 17 : représente résultats de test de production de citrate	41
Tableau 18 : représente le résultat de test de production d'acétoine.....	41
Tableau 19: représente Le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes	43
Tableau 20 : représente Le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes	44
Tableau 21 : représente révéle l'action d'enzyme protéolytique.....	46
Tableau 22 : résultats d'Effet de la température sur les extraits des bactéries lactiques vis-à-vis de souches staphylococcus aureus.....	48

Sommaire

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

Partie bibliographique

Chapitre I: Les bactéries lactiques

I. Les bactéries lactiques	2
I.1. Définition	2
I.2. Habitat	2
I.3. Taxonomie des bactéries lactiques	2
I.3.1. Taxonomie classiques des bactéries lactiques	2
I.3.2. Taxonomie moderne des bactéries lactiques	2
I.4. Métabolisme des bactéries lactiques	3
I.5. 1. Métabolisme glucidiques	3
I.6. Les différents genres des bactéries lactiques	4
I.7. Propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques	6
I.7.1. Formation d'arôme	6
I.7.2. Diacétyle.....	6
I.7.3. Acétaldéhyde	7
I.7.4. Propriétés gazogènes	7
I.7.5. Propriétés texturantes	7
I.7.6. Activité acidifiante	7
I.7.7. Métabolisme des sucres	7
I.7.8. Propriétés protéolytiques et peptidasiques.....	7
I.7.9. Propriétés lipolytiques	8
I.7.10. Activité antimicrobienne	8

I.7.11. Probiotiques.....	8
I.8.Importance technologique et industrielle des bactéries lactiques.....	8
I.8.1.Utilisation des bactéries lactique dans l’industrie alimentaire	8
I.8.1.1.Rôle dans la conservation.....	9
I.8.2.Intérêt des bactéries lactiques en santé humaine	9
I.8.2.1.Applications des probiotiques.....	10

Chapitre II : Les bactériocines

II - Les bactériocines	11
II.1.Historique	11
II.2. Généralité	11
II.3.Classification des bactériocines des bactéries lactiques	11
II.4.Mode d’action des bactériocines	15
II.5.La production des bactériocines	15
II.6.Facteurs limitant l’efficacité des bactériocines dans les aliments	16
II.7.L’intérêt des bactériocines.....	16
II.8.Application des bactériocine	16
II.8.1.Technologie alimentaire	16
II.8.2. Exemples d’application de bactériocines en protection de produits carnés	17
II.8.3.effet de bactériocines sur la santé	17

Chapitre III : Les bactéries pathogènes

III. Les bactéries pathogènes.....	18
III.1.Définition	18
III.2Classification des bactéries pathogènes.....	18
III.2.1.Bactéries pathogènes spécifiques (BPS).....	18
III.2.2.Bactéries pathogènes opportunistes (BPO)	19

III.3.Pouvoir pathogène des bactéries.....	20
III.3.1.La contagiosité.....	20
III.3.2.La toxigénèse.....	20
III.3.2.1.Toxines protéiques ou Exotoxines.....	20
III.3.2.2.Toxines Glucido-lipo-polypeptidiques ou Endotoxines	21
III.4.Principale bactérie pathogènes plus fréquente	21
III.4.1 <i>Salmonella</i>	21
III.4.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	22
III.4.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	22
III.4.4. <i>Escherichia coli</i>	23
III.4.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24

Partie expérimentale

Matériel et Méthodes

I. Matériel et méthodes.....	25
❖ Objectif.....	25
❖ Site d'étude	25
I.1.Milieus de culture	25
I.2.Matériel biologique.....	25
Bactéries lactiques.....	25
Bactéries pathogènes.....	25
II.Méthodes	25
II.1.Revivification et purification des cultures des bactéries lactiques.....	25
II.2.Conservation des souches	26
II.2.1.conservon à courte durée des souches	26

II.2.2.conservation à longue durée	26
II.3. Confirmation de l'identité des souches lactiques	26
II.3.1.Tests morphologiques	26
A. L'aspect macroscopique.....	26
B. L'aspect microscopique	26
❖ Coloration de Gram	26
II.3.2.Tests physiologique biochimique	27
❖ Test catalase	27
❖ Croissance en milieu hyper salé.....	27
❖ Croissance à différentes températures	27
❖ Test de Thermorésistante	27
❖ Type fermentaire.....	27
❖ La croissance sur le lait «bleu de Sherman».....	27
❖ Etude du métabolisme azoté (recherche de l'arginine déshydrolyase (ADH))	28
❖ Etude du profil fermentaire.....	28
❖ Production de dextrane	28
❖ Utilisation du citrate	28
❖ Production d'Acétoïne	29
II.4.Etude de l'activité antimicrobienne des souches lactiques	29
II.4.1. Préparation de la pré-culture bactérienne	29
II.4.2.Préparation de l'extrait de bactériocine	29
II.4.3. Préparation de pré-culture de la bactérie test (pathogène)	29
II.4.4.essai de l'activité de bactériocine dans le milieu liquide	29
II.4.4.1.Méthodes des puits	29
II.4.5.essai de l'activité de bactériocine dans le milieu solide.....	30

II.4.5.1.méthode de double couche	30
II.5.Caractérisation de la nature de l'agent inhibiteur.....	31
II.5.1. Effet des enzymes protéolytiques	31
II.5.2.Effet de la température	31
II.5.3. Effets du ph	31

Résultats et discussions

I. Revivification et purification.....	32
II. Confirmation de l'identité des souches lactiques	32
II. Etude morphologique	32
➤ Critères macroscopique	32
➤ Critères microscopiques	34
II.1. Tests physiologiques et biochimiques	35
➤ Test de la catalase	35
➤ Croissance en milieu hyper salé	35
➤ Croissance à différentes températures	35
➤ Test de Thermorésistante	35
➤ Type fermentaire.....	36
➤ La croissance sur le lait «bleu de Sherman».....	37
➤ Test de l'ADH	37
➤ Etude du profil fermentaire.....	38
➤ Production de dextrane	40
➤ Utilisation du citrate	40
➤ Production d'Acétoine	41
➤ Aspects macroscopiques des souches pathogènes	42

III. Etude de l'activité antimicrobienne des souches lactiques	43
III.1.Essai de l'activité de bactériocine dans le milieu liquide « Méthodes des puits ».....	43
III.2.Essai de l'activité de bactériocine dans le milieu solide « méthode de double couche »	44
III.3Caractérisation de la nature de l'agent inhibiteur.....	45
III.3.1. effet des enzymes protéolytiques	45
III.3.2.Effet de la température	47
II.3.3.Effets du ph	49
Conclusion et perspectives	51
Références bibliographiques.....	52

Annexe

Résumé :

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

Notre étude a portée en premier lieu :

A la confirmation de l'identité de nos souches lactiques à savoir : *Lactobacillus plantarum* KP178099, *Enterococcus faecium* CP013994, *Enterococcus faecium* KT124593, *Enterococcus faecium* KF303433, *Enterococcus faecium* JQ806726 à travers des tests physiologiques, biochimiques, et une observation macro et microscopique.

En deuxième lieu, ; nous avons procédé à la recherche de la bactériocine et des substances antibactérienne a été réalisée suivant la **méthode de double couche** et **méthode des puits** que nous a permet de quantifier les inhibitions et de déceler les agents inhibiteurs élaborés par les souches lactiques; notre étude a également portée sur les inhibitions entre souche lactique et pathogène Les resultats ont montré que nos souches lactiques ont un pouvoir inhibiteur contre les bactéries pathogènes à savoir *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *E.coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,

En dernier lieu de notre étude, on a testé l'effet de quelques paramètres sur l'action des bactériocines,. On a constaté que l'activité antimicrobienne des bactériocines se manifeste à des pH entre 2.4 et 9 ; l'activité des bactériocines reste constante après la réalisation d'un chauffage a 100°C pendant 30mins.et ces bactériocines Perdez ses activités après un traitement à la pepsine, à la trypsine

Mots clés : bactériocine, souches lactiques, souches pathogènes, agents inhibiteurs

Summary :

Lactic bacteria are naturally part of our environment. It has long been recognized that lactic acid bacteria have the property of producing antimicrobial substances. Indeed, lactic acid bacteria have the particularity to synthesize inhibiting substances, among others bacteriocins. Those ones are also used as pharmaceutical and parpharmaceutical products.

Our study reaches in the first place:

A confirmation of the identity of our lactic strains namely *Lactobacillus plantarum* KP178099, *Enterococcus faecium* CP013994, *Enterococcus faecium* KT124593, *Enterococcus faecium* KF303433, *Enterococcus faecium* JQ806726, through physiological, biochemical tests, and macroscopic and microscopic observation .

Secondly, we conducted the search for bacteriocin and antibacterial substances was carried out using the double layer method and well method , that allows us to quantify the inhibitions and identify inhibitors developed by lactic strains, our study also focused on the inhibitions between lactic and pathogenic strain. The results showed that our lactic strains have inhibitory effects against pathogenic bacteria namely *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 , *E.coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Finally, in our study, we tested the effect of some parameters on the action of bacteriocins ; The antimicrobial activity of bacteriocins has been found to occur at pH between 2.4 and 9; the bacteriocin activity remains constant after heating at 100 ° C. for 30 minutes. and these bacteriocins lose their activities after treatment with pepsin, trypsin

Keyword : bacteriocins, lactic strains pathogenic strains , inhibitors .

ملخص:

أثناء دراستنا تطرقنا في المقام الأول إلى التأكد من هوية السلالات اللبنية وهي البكتيريا اللبنية هي بطبيعة الحال جزء من بيئتنا والنظام الغذائي لدينا. وقد تم الاعتراف منذ فترة طويلة أن بكتيريا حمض الالكتيك لديها خاصية إنتاج المواد المضادة للميكروبات.

في الواقع، بكتيريا حمض الالكتيك لديها خصوصية تركيب المواد المانع، من بين البكتيريا الأخرى و هي البكتريوسين

Lactobacillus plantarum KP178099, *Enterococcus faecium* CP013994, *Enterococcus faecium* KT124593, *Enterococcus faecium* KF303433, *Enterococcus faecium* JQ806726

عبر دراسات فيزيولوجية واختبارات كيميوية والملاحظة بالعين المجردة والمجهرية .

ثانياً أجرينا بحثاً عن مثبت بكتيري باستخدام طريقة الطبقة المزدوجة و طريقة الأبار الذي سمح لنا بقياس وتحديد مواع التي وضعتها مثبتات السلالات البنية والسلالات المسببة للأمراض.

لقد تبين لنا من خلال النتائج بان السلالات البنية لديها مثبت ضد البيكتيريا المسببة للامراض وهي

Staphylococcus aureus ATCC 25922, *E.coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

في آخر مقام من دراستنا أجرينا اختبارات حول تأثير بعض المعلمات على عمل Bactériocine,

وجد أن نشاط مضاد الميكروبات Bactériocine يكون بين 2.4ph و 9 ph يبقى نشاط Bactériocine ثابتاً بعد التسخين عند 100 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة , هذه Bactériocine تفقد أنشطتها بعد العلاج مع البيبين، التربسين.

الكلمات المفتاحية: Bactériocine , السلالات المسببة للامراض والسلالات اللبنية , مثبتات .

INTRODUCTION

Introduction :

Les bactéries lactiques sont de très anciens microorganismes dont les ancêtres auraient pu voir le jour il y a trois milliards d'années elles seraient donc apparues avant les cyanobactéries photosynthétique (**Tailliez, 2001**),

Les bactéries lactiques sont des microorganismes largement utilisées dans l'industrie alimentaire dans une variété de fermentations tels que le développement de produits à base de viande, de légumes, et des produits laitiers, y compris de nombreux laits fermentés, fromage, yaourt ou le beurre. (**Dortu et Thonart, 2009**).

Ces microorganismes produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**), ces peptides antimicrobiens ont la capacité d'inhiber la croissance des germes pathogènes (**Delves-Broughton, 1990**).

L'action inhibitrice de bactéries lactiques (LAB) est principalement due à l'accumulation des principaux métabolites primaires comme les acides lactiques et acétiques, l'éthanol et de dioxyde de carbone. En outre, les LAB sont capables de produire également des composés antimicrobiens tels que l'acide benzoïque, le peroxyde d'hydrogène diacétyle, l'acétoïne et les bactériocines. Les niveaux de et les proportions de ces composés dépendent de la souche, des paramètres physiques du milieu (**Tannock et al., 2004**)

Les bactéries lactiques représentent une classe importante qui produit les bactériocines qui deviennent un sujet d'actualité pour plusieurs recherches. Ces bactériocines sont actuellement explorées pour leur utilité chez l'homme et l'animal, dans le domaine de la santé, de la nourriture, la bio préservation et les utilisations agricoles (**Parada et al, 2007, Todorov et al, 2011**)

Les bactériocines sont produites puis excrétées à l'extérieur des cellules productrices Ils présentent une activité bactéricide ou bactériostatique. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large (**Jack et al, 1995; Chen et al.2003**) De nombreuses possibilités d'utilisation ont été envisagées, pour répondre aux besoins de l'industrie alimentaire, cosmétique et de la médecine.

Les bactériocines dirigées contre les germes pathogènes pourraient être utilisées comme agent de conservation sous forme d'additif, permettant ainsi de diminuer le nombre d'intoxications alimentaires et d'augmenter la durée de conservation et de commercialisation.

C'est dans cette optique que s'inscrit notre étude qui porte dans un premier temps a :

L'effet antimicrobien des bactéries lactiques, De mettre en évidence la production de bactériocine chez quelques bactéries lactiques et De déterminer la nature des bactériocines chez quelques bactéries lactiques et leur effet sur quelques bactéries pathogènes.

CHAPITRE I

LES BACTÉRIES LACTIQUES

Chapitre I : les bactéries lactiques

I- LES Bactéries lactique :

I.1. Définition:

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme (Stiles *et al*, 1997) Les LAB sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-oraganotrophes. Elles sont des coques ou des bâtonnets, Gram positives, généralement immobiles, asporulés, anaérobies mais aérotolérantes (microaérophiles). Elles sont dépourvues de nombreuses activités enzymatiques comme la catalase, la nitrate réductase et le 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 fermentes cibles. (Achemchem ,2014).

I.2. Habitat :

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

I.3. Taxonomie des bactéries lactiques :

I.3.1. Taxonomie classiques des bactéries lactiques :

La base générale de la classification des bactéries lactiques est liée au travail (d'Orla-Jensen .1919). 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; Holzapfel *et al*, 2001).

I.3.2. Taxonomie moderne des bactéries lactiques :

Elle s'appuie principalement sur les techniques d'électrophorèses des protéines et des études des acides nucléiques et les caractéristiques moléculaires comme le pourcentage de G+C de l'ADN, l'hybridation ADN-ADN, la structure et la séquence des ARNr, sont devenus des outils taxonomiques importants. (ALEXANDRE *et al*, .2008) . Les séquences ARNr sont utilisées avec précision pour déterminer les relations phylogénétiques entre bactéries. Ont conduit à la réorganisation de certains genres de bactéries lactiques (par exemple, la reclassification de streptocoques lactiques à *lactococcus* spp.) (Elmer H et Marth, 2001)

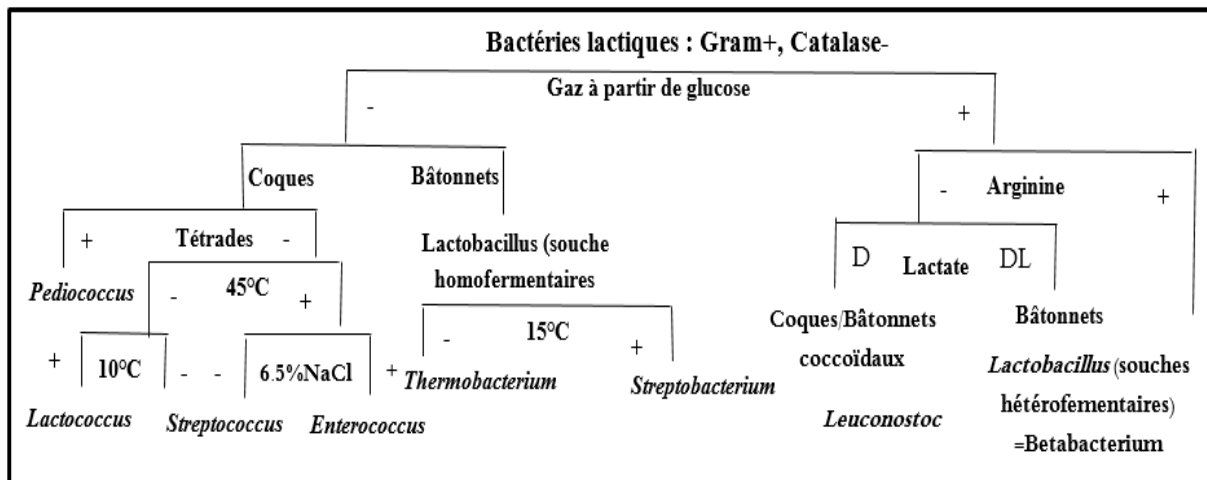


Figure 01 : Schéma de différenciation des principaux genres de bactéries lactiques.

(D'après Carr *et al*, 2002)

I.4. Métabolisme des bactéries lactiques :

La principale caractéristique du métabolisme des bactéries lactiques est la dégradation de différents hydrates de carbone et composés apparentés principalement à l'acide lactique. Ceci est couplé avec la production d'énergie (adénosine-tri-phosphate=ATP). Généralement, le produit final prédominant est l'acide lactique, mais des changements dans les conditions de croissance peuvent entraîner des profils de produits finaux significativement différents. (Radomir 2009)

I.5. 1. Métabolisme glucidiques :

En se basant sur la voie empruntée et le produit final de la fermentation, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes :

- **Homofermentaires** : toutes les bactéries lactiques (à l'exception des genres : *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et certains membres du genre *Lactobacillus*) empruntent la voie de la glycolyse pour dégrader les hexoses (ex : glucose). Après son transfert vers la cellule, le glucose subit une phosphorylation pour se transformer en fructose qui est à son tour phosphorylé en fructose 1-6 di-phosphate puis clivé en dihydroxyacétone phosphate et glycéraldéhyde phosphate (GAP), ces deux derniers sont convertis en pyruvate. Le pyruvate est dans une dernière étape réduit en acide lactique qui est le produit unique: c'est la fermentation homolactique. Dans les conditions défavorables telles la limitation du glucose, ces bactéries produisent également l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol et/ou le CO₂ par la voie de fermentation des acides mixtes (Mozzi *et al*, 2010)
- **Hétérofermentaires** : ce groupe de bactéries lactiques utilise la voie des pentoses phosphate (ou 6-phosphogluconate) qui consiste à une déshydrogénation du glucose, après sa phosphorylation, pour donner le 6-phosphogluconate qui subira une décarboxylation. Le pentose résultant est clivé en glycéraldéhyde phosphate (GAP) qui suit la voie de la glycolyse donnant l'acide lactique et l'acétyl phosphate qui sera réduit en éthanol. En raison de la production de CO₂, d'éthanol ou de l'acétate en plus

Chapitre I : les bactéries lactiques

de l'acide lactique, cette fermentation est appelée hétérolactique (Salminen *et al*, 2004).

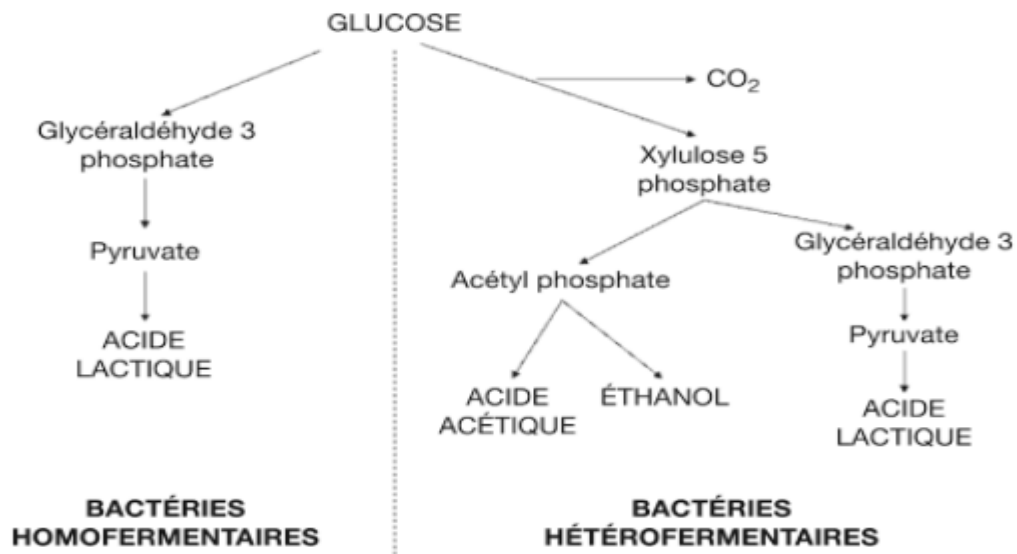


Figure 02 : Schéma très simplifié des voies de fermentation des sucres par les bactéries lactiques. (LONVAUD *et al*, 2010)

I.6. Les différents genres des bactéries lactiques :

Le groupe de bactéries lactiques est hétérogène, il est représenté par plusieurs genres à différente importance dans les industries agro-alimentaires, leur cellules sont soit des coques comme *streptococcus*, *lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *pediococcus*, soit des bacilles comme *lactobacillus* (Kandler et weisis ; 1986)

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 chainettes et habituellement immobiles. Les lactobacilles se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (Siegumfeldt *et al*, 2000), ils produisent de l'acide lactique, ils préfèrent les conditions acides relatives (pH 5,5 à 6,5). (CORRIEU et LUQUET, 2008). Phylogénétiquement, ils appartiennent à la branche *Clostridium* des bactéries Gram positives. (Schleifer et stackebrandt, 1983)

Le genre *Lactobacillus* est divisé en trois groupes basé sur les capacités de fermentation de l'espèce (Kandler et Weiss, 1986).

Groupe I : obligatoirement espèces homofermentatives, dégradent les hexoses presque complètement à l'acide lactique et ne fermentent pas les pentoses ou gluconate. (Kandler et

Chapitre I : les bactéries lactiques

Weiss, 1986). 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 et al, 1998**)

Groupe II : Les espèces du groupe II sont facultative hétérofermentaire et produire de l'acide acétique, de l'éthanol et l'acide formique sous la limite de glucose, en plus à l'acide lactique. Les pentoses sont généralement fermentés. (**Kandler et Weiss, 1986**). Il est constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles (**Laurent et al, 1998**).

Groupe III : contient les lactobacilles obligatoirement hétérofermentaires qui fermentent les hexoses à l'acide lactique, à l'acide acétique, éthanol et dioxyde de carbone. Les pentoses sont fermentés l'acide lactique et l'acide acétique. (**Kandler et Weiss, 1986**). Ce groupe 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 et al, 1998**).

Le genre *Streptococcus* :

Les membres du genre *streptococcus* sont gram positif, catalase négative, cytochrome négatif, (**Ekstedt et stollerman, .1960**), le genre *Streptococcus* était réservé aux cellules organotrophiques coccoïdes ou coccobacillaires non sporulées, disposées en paires ou en chaînes. Les streptocoques fermentent les hydrates de carbone avec de l'acide lactique comme produit final majeur et sont généralement aérotolérants. (**CORRIEU et LUQUET, 2008**), ,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 et al, 1998**).

Le genre *Lactococcus* :

Les lactocoques sont des cocci à Gram positif de 0,5 à 1,5 um de taille; former des chaînes courtes; ce sont des hexoses de ferments mésophiles produisant de manière homofermentaire de l'acide lactique L (+); et ont des exigences de croissance complexes, (**Sampo et al , 2012**) 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**). Le genre *Lactococcus* comprend actuellement cinq espèces validées. Le plus connu est *Lactococcus lactis* avec trois sous-espèces *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et *Lacto coccus lactis* subsp. *hordniae*. Ces sous-espèces se trouvent principalement dans les produits laitiers (lait cru, lait fermenté, fromage) et les amygdales de mammifères (**Pot et al. 1996**).

Chapitre I : les bactéries lactiques

Le genre *Leuconostoc* :

Leuconostocs sont Gram positif, non motile, et les bactéries asporogènes, dont les cellules sont ellipsoïdales à sphérique, souvent de forme allongée et se produisent habituellement dans les paires ou les chaînes (**Garvie, 1986**). Lorsqu'elles sont cultivées sur un milieu solide, les cellules sont allongées et peuvent être prises pour des bâtonnets. De vraies capsules cellulaires ne se forment pas, mais de nombreux leuconostocs produisent du dextran extracellulaire qui forme un revêtement dense aux électrons à la surface des cellules. Ils sont anaérobies facultatifs et catalase (**Johansson et al, 2011**) négatifs, 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, (**Gonzalez et al, 2007**).

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**).

Pediococcus :

Les pédiocoques se trouvent couramment sur les matières végétales et dans divers aliments, mais aussi en tant qu'agents d'altération dans les boissons alcoolisées, comme la bière et le vin. Les membres du genre *Pediococcus* sont typiquement de forme sphérique et forment le plus souvent des tétrades caractéristiques. Ils sont ou anaérobies facultatifs, chimiorganotrophes; homofermentaires ou micro-organismes hétérofermentaires qui nécessitent des milieux de culture riches pour la croissance. (**CORRIEU et LUQUET, 2008**),

Enterococcus :

Ce genre regroupe des couques Gram-positifs ayant un faible contenu en G+C (< 50%), exempts de l'enzyme catalase, et disposés en paire ou en chaînes courtes, ils sont anaérobies facultatif, chimiorganotrophes, exempts de quelque cytochrome, pendant la croissance les entérocoques produisent l'acide lactique comme métabolite final (homofermentaires) et des très petites quantités d'acide acétique, d'acide formique et d'éthanol mais sans production de gaz. (**klein, 2003**)

I.7. Propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques :

I.7.1. Formation d'arôme : Les bactéries lactiques produisent, en plus de l'acide lactique, divers métabolites secondaires tels que l'éthanol, l'acétate, le CO₂, le formiate, acétoïne. Susceptibles d'avoir un impact aromatique. (**CORRIEU et LUQUET, 2008**),

I.7.2. Diacétyl:

Le diacétyl est un composant de l'arôme, il est produit par presque tous les genres de LAB par fermentation du citrate. En effet, **Harvey et Collins (1962)** ont expliqué l'exigence d'un environnement acide pour sa biosynthèse. il inhibe la croissance des bactéries à Gram négatives on réagissant avec l'utilisation d'arginine. Les bactéries à Gram négatif étaient plus

Chapitre I : les bactéries lactiques

sensibles au diacétyle de bactéries Gram- positives, anciennement, ils ont été inhibées par le diacétyle à 200 µg /ml (**Jay, 1982**).

Récemment, il est démontré que le diacétyle à 344 µg/ ml inhibe les souches de *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, *E. coli* et *Aeromonas* (**Ammor et al, 2006**).

I.7.3.Acétaldéhyde :

L'acétaldéhyde, un composé aromatique important dans les produits laitiers, peut être produit par LAB à travers plusieurs voies. Un précurseur métabolique important pour la synthèse d'acétaldéhyde par LAB est le glucose à travers le pyruvate et les acétyl-CoA intermédiaires de la glycolyse, de nombreuses études indiquent que son impact aromatique s'exprime dans le yaourt (**CORRIEU et LUQUET, 2008**),

I.7.4.Propriétés gazogènes :

Plusieurs espèces de bactéries lactiques sont capables de produire du CO₂ dans les fromages et les laits fermentés. En fonction du produit concerné, il s'agit soit d'une propriété recherchée, soit d'un défaut. (**CORRIEU et LUQUET, 2008**)

I.7.5.Propriétés texturantes :

Les propriétés texturantes des bactéries lactiques sont principalement utilisées pour améliorer les qualités organoleptiques des produits laitiers frais fermentés. Ainsi la production d'exopolysaccharides par les bactéries lactiques, lors de leur développement dans le lait, évite d'augmenter le taux protéique du produit ou d'avoir recours à l'ajout d'additifs, tels que des texturants et des épaississants, lors de la production de yaourt (**Sodini et al, 2004**). Le rôle principal des exopolysaccharides est d'améliorer les propriétés mécaniques des gels lactiques en augmentant leur texture et leur viscosité. (**CORRIEU et LUQUET, 2008**)

I.7.6.Activité acidifiante :

Il s'agit, pour un ferment donné, de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Ce niveau d'acidité finale dépend des spécificités du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches. (**CORRIEU et LUQUET, 2008**)

I.7.7.Métabolisme des sucres:

Le choix d'un ferment est conditionné à son aptitude à produire, soit de l'acide lactique presque exclusivement (métabolisme homofermentaire), soit de l'acide lactique et d'autres produits finaux tels que l'éthanol et le CO₂ (métabolisme hétérofermentaire) (**CORRIEU et LUQUET, 2008**)

I.7.8.Propriétés protéolytiques et peptidasiques :

Les bactéries démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée. (**CORRIEU et LUQUET, 2008**)

Chapitre I : les bactéries lactiques

I.7.9. Propriétés lipolytiques : généralement faibles chez les bactéries lactiques, elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (**CORRIEU et LUQUET, 2008**)

I.7.10. Activité antimicrobienne :

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacétyl et les bactériocines. Les composés antimicrobiens produits par les LAB peuvent empêcher la croissance des bactéries pathogènes; contaminants possibles des produits fermentés (**Zamfir et al., 2006**).

I.7.11. Probiotiques :

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité appropriées 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**).

I.8. Importance technologique et industrielle des bactéries lactiques :

I.8.1. Utilisation des bactéries lactique dans l'industrie alimentaire :

L'utilisation des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire pour transformer des matières premières très diverses, soit d'origine animale (lait, viandes, poissons), soit d'origine végétale (fruits, légumes, céréales), Ces transformations aboutissent à une grande diversité de produits, parmi lesquels on peut citer les fromages, les laits fermentés (yaourts, laits fermentés probiotiques), les produits carnés et végétaux fermentés (notamment : saucisson, choucroute, olives, soja), les pains au levain et certains vins (fermentation malolactique). (**CORRIEU et LUQUET, 2008**),

Chapitre I : les bactéries lactiques

Tableau 01: principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (**Penaud, 2006**)

Genre	Substrat	Exemples de produits
<i>Bifidobacterium</i>	lait	laits fermentés
<i>Lactobacillus</i>	lait	yaourts, laits fermentés, kéfirs, fromages
	viande	saucissons secs, jambons secs
	végétaux	choucroute, olives, "yaourts" au lait de soja
	céréales	pain au levain, bières
<i>Lactococcus</i>	lait	fromages, kéfirs
<i>Leuconostoc</i>	Végétaux	choucroute, olives, vin
	lait	fromages, kéfirs
<i>Pediococcus</i>	végétaux	choucroute
	viande	saucisses semi-séchées
<i>Oenococcus</i>	végétaux	vin
<i>Streptococcus</i>	lait	yaourts, laits fermentés, fromages

I.8.1.1. Rôle dans la conservation :

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans les procédés de fermentation permettant la conservation de produits alimentaires (**CORRIEU et LUQUET, 2008**),

*production d'acide lactique : les bactéries lactiques ont un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques.

*production de bactériocine : ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactique, ils sont généralement thermorésistantes.

I.8.2. Intérêt des bactéries lactiques en santé humaine :

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 :

*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, première 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

Chapitre I : les bactéries lactiques

production d'IgA et de mucus, défenses locales au niveau des muqueuses. (Makhloufi., 2012).

I.8.2.1.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*

- **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 , 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* (*H. pylori*), une bactérie impliquée dans la survenue et les récives des gastrites et ulcères gastro-duodénaux. Les études sur ce traitement se poursuivent car son efficacité reste à démontrer (Reid , 2003).

CHAPITRE II

LES BACTÉRIOCINES

II - Les bactériocines

II.1.Historique :

En 1925, Gratia a découvert les bactériocines lorsqu'il a été impliqué dans le processus de recherche des moyens de tuer les bactéries ,qui a observé que la croissance de certaines souches de *E.coli* est inhibée par la présence d'un composé antibactérien dénommé colicine V, qui ont également abouti au développement d'antibiotiques et à la découverte de bactériophages (**Gratia 1925 ; Gratia 2000**), seconde fut découverte chez une bactérie lactique *lactococcus lactis* en 1927, La première caractérisation détaillée de l'activité bactériocinogène des lactobacilles a été rapportée en 1961 (**De kirek et Coetzee 1961**).

II.2. Généralité :

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens 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 JR,et al,1976**), et contre certains pathogènes tels que *B. cereus*, *Clostridium botulinum* et *L. monocytogenes*.

Leur activité peut être bactéricide (entraînant la mort cellulaire) ou bactériostatique (entraînant un ralentissement de la croissance). Les bactéries productrices sont protégées de l'action de leurs propres bactériocines par une ou plusieurs protéines d'immunité. Les bactéries lactiques, appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lacto- coecus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *replococcus*, 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.(**Klaenhammer T ; 1993**), les bactériocines sont présentes dans de nombreux d'aliments (fromages, lait, saucissons...) ;(**RENOUF ; 2013**)

II.3.Classification des bactériocines des bactéries lactiques :

Les bactériocines des LAB constituent un groupe hétérogène d'antagonistes bactériens dont la taille moléculaire peut aller de quelques milliers de daltons jusqu'à des molécules beaucoup plus complexes, mais dont la nature est exclusivement protéique. en se basant sur leurs caractéristiques structurelles et activité biologique **klaenhammer(1993)** a établi quatre classes de bactériocines, dont seulement trois sont maintenues actuellement (**nes et al, 1996**) la découverte et la caractérisation de nouvelles bactériocines ont imposé des modifications notables sur la classification proposée par klaenhammer (**Nes et al, 1996 ; Franz et al, 1999 ; Van Belkum et Stiles,2000 ;Cleveland et al, 2001 ; Diep et Nes, 2002 ;Ross et al, 2002**),

De façon qu'à l'heure actuelle on reconnaît trois classes de bactériocines avec plusieurs sous-classes :

Tableau 02 : classification des bactériocines de bactéries lactiques (d'après NES *et al.* 1996)

classes	Sous catégories
Classe I : lantibiotiques	Type A : molécules linéaires Type B : molécules globulaires
Classe II : bactériocines non-modifiées, thermostables	Classe IIa : anti-Listeria Classe IIb : bactériocines à deux composants Classe IIc : autres bactériocines
Classe III : bactériocines de grande taille, sensibles à la chaleur	

Classe I : Lantibiotiques.

Composée petits peptides hydrophobes (< 5 kDa) caractérisés par la présence d'acides aminés inhabituels : lanthionine (Lan), B-méthyl-lanthionine (Metlan), di-deshydroalanine et di-deshydrobutyrine. (Sahl et Bierbaum, 1998). Ces molécules, produites exclusivement par des bactéries à Gram positif, sont hautement thermostables et agissent au niveau de la membrane cellulaire (McAuliffe *et al.*, 2001). Récemment, Diep et Nes (2002) ont proposé deux sous-classes:

Sous-classe A:

Peptides linéaires et cationiques, capables de former des pores dans la membrane cellulaire; ces peptides présentent des similitudes d'arrangement de leurs ponts « lanthionine », ces bactériocines sont principalement synthétisées par les genres lactococcus, lactobacillus, streptococcus, les membres les plus étudiés de cette classe sont la nisine produite par *lc.lactis*, l'épidermine produite par *lc.lactis*, l'épidermine produite par *staphylococcus epidermis* et la subtiline produite par *bacillus subtilis* (McAuliffe *et al.*, 2001).

Sous-classe B:

Peptides globulaires et plus rigide que celle des peptides de type A, sans charge nette ou ayant une charge nette négative et contenant jusqu'à 19 acides aminés, (**Ryan et al, 1999**), font de bons exemples de cette sous-classe (Figure x)

Classe II :

La classe II est constituée de petites bactériocines (<10kDa) thermostables, cette catégorie comprend une série de peptides cationiques et thermorésistants exempts de résidus modifiés (**Hechard et Sahl, 2002**), cette catégorie est la plus largement représentée avec plus de 50 bactériocines caractérisées, ce qui a conduit à la création de trois sous classes :

Sous-classe IIa :

les bactériocines de sous-classe IIa sont des peptides ayant une structure similaire à celle de la pédiocine, elles ont toutes une activité contre *Li.monocytogenes*. (françois marie luquet gerges corrieu)

Sous-classe IIb :

bactériocines hétérodimériques , dont l'activité dépend de l'existence de deux peptides ; α et β , c'est le cas de la lactococcine G de *L.lactis* (**NISSEN-Mayer et al, 1992**), la lactacine F de *Lact.johnsonii* (**Allison et al, 1994**) et des plantricines Ef et JK de *Lact.plantarum* (**Anderssen et al, 1998**).

Sous-classe IIc :

regroupe des peptides caractérisés par une activité dépendante de la présence d'un groupement thiol dans la molécule (**Klaenhammer, 1993**) ou bien par une sécrétion qui s'effectue à travers le système général sec (**Nes et al, 1996**), les bactériocines de classe II n'appartenant pas aux sous-classes IIa et IIb , seront considérées ici comme étant de sous-classe IIc. (**CORRIEU et LUQUET, 2008**).

Classe III – protéines :

les bactériocines de classe III sont caractérisées par leur grande taille .il s'agit de protéines dont la masse est supérieure à 30 kDa.sensibles à la chaleur.(**Joerger et Klaenhammer,1986**)

Classe IV – Bactériocines complexes :

Les bactériocines de classe IV étaient définies comme des protéines associées à une composante non protéique, lipidique et/ou oligosaccharidique, possède une activité antibactérienne sensible à des enzymes lipolytiques et glycolytiques (**Jimenez-Diaz et al. 1993**), cette classe présentée par Klaenhammer (**1993**).

Tableau 03 : les principales bactériocines des bactéries lactiques (Piard *et al*, 1992)

Dénomination	Espèce productrice	Espèces sensibles
Nisine	<i>Lc.LactisSubsp.lactis</i>	<i>Lactococcus</i> , Bactéries Gram positif (dont : <i>Clostrédium</i> , <i>bacillus</i> , <i>Listeria</i>)
Lacticine 481	<i>Lc.LactisSubLactis</i>	<i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Clostridium</i>
Diplococcine	<i>Lc.LactiSubsp.cremoris</i>	Lactocoques
Lactostrepcine (S)	<i>Lc.LactiSub.Lactis</i>	Lactocoques, Streptocoques, hémolytiques, <i>Lb.helveticus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Listeria</i>
lactocidine	<i>Lb.Fermentum</i>	<i>Lactobacillus</i>
Lactocine 27	<i>Lb.Helveticus</i>	<i>Lb.Helveticus</i> , <i>Lb.Acidophilus</i>
Helveticine J	<i>Lb.Helveticus</i>	<i>Lb. Helveticus</i> , <i>Lb.Bulgaricus</i> , <i>Lb.Lactis</i>
Lacticine B	<i>Lb.Acidophilus N2</i>	<i>Lb.Leichmanii</i> , <i>LbBulgaricus</i> , <i>Lb.Lactis</i> , <i>Lb.Helveticus</i>
Lacticine F	<i>Lb.Acidophilus SS</i>	<i>Lb.Fermentum</i> , <i>Enter.faecalis</i>
Plantaricine A	<i>Lb.plantarum</i>	<i>Lb.Plantarum</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Pentosaceus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Paramesenteroides</i>
Pediocine A	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Clostridium.Botulinum</i> , <i>Cl.Sporogène</i> , <i>Staphylococcus.aureus</i> , <i>Lb.Brevis</i> , <i>Lc.Lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i>

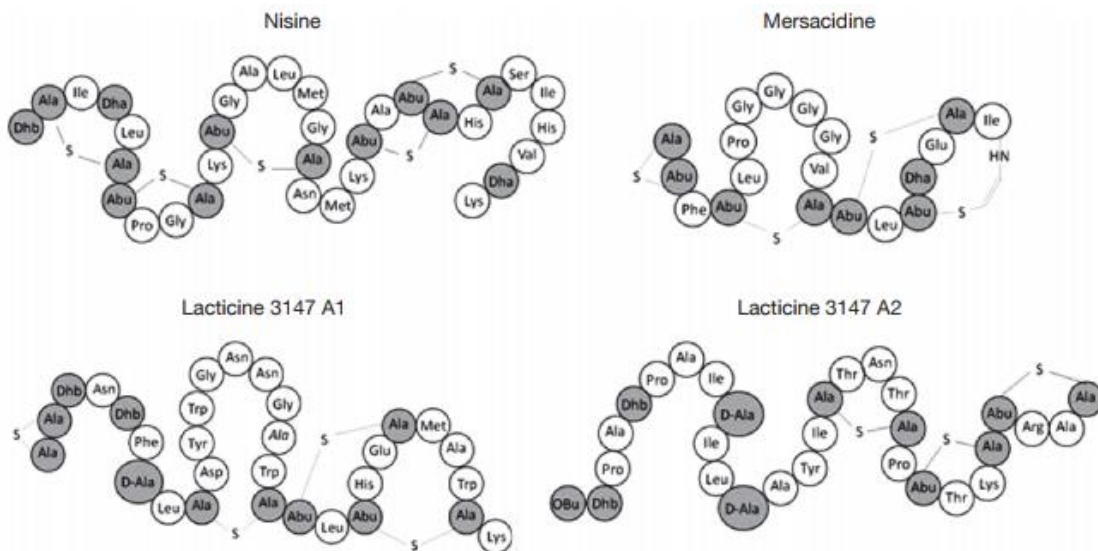


Figure 03 : Structures moléculaires des lantibiotiques représentatifs des différents types (D'après McAuliffe *et al*, 2001)

II.4. Mode d'action des bactériocines :

L'activité inhibitrice des bactériocines se manifeste par une interaction avec les lipides anioniques constituant les membranes bactériennes (**Hécharde et Sahi, 2002**). Elle aboutit à

- la formation de pores dans la membrane cytoplasmique des cellules cibles
- la chute du potentiel de membrane menant à la perte de leur force proton motrice
- une rupture du métabolisme énergétique
- l'arrêt de la synthèse de macromolécules qui conduisent à la mort des cellules cibles.

L'action des bactériocines sur les cellules cibles peut également entraîner des effets bactériostatiques et sporostatiques (**Gonzalez et al.1994, Daba et al, 1991, Tagg et al.1976**)

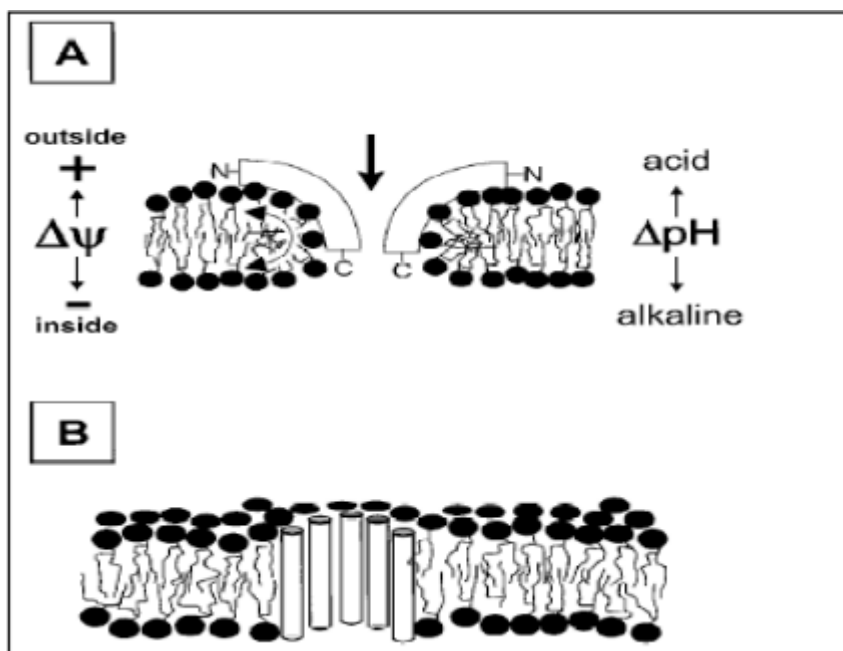


Figure 04 : les modèles de formation des pores (A) : pores en forme de coin, (B) : pore en forme de tonneau en bois debout. (**Moll et al, 1999**)

II.5. La production des bactériocines :

Les bactériocines sont produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance. Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice (**Savijoki et al, 2006**), ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture. Les facteurs influençant la production de bactériocines sont:

- La souche productrice
- la température
- le ph

-la composition du milieu

-la technologie de la fermentation employée

L'optimisation de la croissance ne résulte pas forcément en l'optimisation de production des bactériocines (**Parente et al, 1999**). Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production (**Verluyten et al, 2004**). Les températures et PH optimaux de production sont souvent inférieurs à ceux optimaux pour la croissance.

La composition du milieu, particulièrement les sources et concentrations de carbone et d'azote affectent fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques productrices de bactériocines nécessitent de nombreux nutriments pour leur croissance. (**Aasen et al.,2000; Nel et al.,2001 ;Mataragas et al,2004 ;Todorov et al.,2004; Verluyten et al, 2004**). D'autres études ont montré que la source de carbone et sa concentration est aussi un facteur important dans l'optimisation de la croissance des bactériocines. (**Leal-Sanchez al. 2002; Leroy et al. 2006; Chen et al. 2007; Anastasiadou et al. 2008**)

II.6.Facteurs limitant l'efficacité des bactériocines dans les aliments :

Selon **Daeschel (1993)** les facteurs pouvant limiter la production sont : la faible production dans aliments, la perte de la capacité de production, l'infection de la souche productrice par des bactériophages, et éventuellement l'antagonisme exercé par d'autres micro-organismes. Alors que les facteurs limitant l'efficacité des bactériocines sont : l'apparition de bactéries pathogènes ou d'altération résistantes aux bactériocines, l'inactivation par des protéases ou des processus d'oxydation, l'adsorption aux composants alimentaires, l'inactivation par les additifs, la faible solubilité et la distribution irrégulière, et instabilité face aux changements de ph (**Schillinger et al, 1996**)

II.7.L'intérêt des bactériocines:

Les bactériocines sont maintenant largement utilisées en science alimentaire pour prolonger la durée de conservation des aliments (**Ghraiiri et al, 2012**), qui inhibent l'infection pathogène des maladies animales (**van Heel et al, 2011**) et l'industrie pharmaceutique et médicale pour le traitement des cancers malins (**Lancaster et al, 2007**).

II.8.Application des bactériocine :

II.8.1.Technologie alimentaire :

Les bactériocines sont des additifs alimentaires naturels en raison de la présence de bactéries productrices de bactériocines dans de nombreux types d'aliments depuis l'Antiquité, tels que les fromages, les yaourts et la viande fermentée portugaise (**Yang et al, 2012, Todorov et al, 2014**). Les bactériocines peuvent être ajoutées sous forme de préparations de bactériocines ou par inoculation directe de la souche productrice de bactériocine. La préparation de bactériocine peut être une bactériocine purifiée ou semi-purifiée ajoutée comme conservateur alimentaire, telle que la nisine (**Cotter et al, 2005**).

Récemment, des bactériocines ont également été incorporées dans des films d'emballage pour contrôler les bactéries pathogènes d'origine alimentaire assurant une libération graduelle des

bactériocines dans la nourriture et évitant l'inactivation de la bactériocine par interaction avec les composants alimentaires (Guerra *et al*, 2005) .

II.8.2. Exemples d'application de bactériocines en protection de produits carnés :

Tableau 04 : Exemples d'application de bactériocines en protection de produits carnés.

Bactériocine	Application	Conclusion	Référence
Nisine A	Incorporation de nisine dans un film alimentaire	Inhibition de bactéries indésirables dans des produits carnés reconstitués	Cutter et Siragusa 1998
Entéroisine	Addition d'entéroisine à du jambon, du paté de la saucisse de la viande de porc ou de poulet .	Contrôle de <i>L.monocytogenes</i> dans diverses conditions	Aymerich <i>et al</i> , 2000
Piscicoline 126	Contrôle de <i>L.monocytogenes</i> dans la pate de jambon par la piscioline 126.	Plus efficace que les bactériocines commerciales.	Jack <i>et al</i> , 1996
Leucocine A	Contrôle de la dégradation de produits carnés par <i>Leuconostoc gelidum</i> UALI87 producteur de leucocine	Retard de la contamination de viande de bœuf par <i>Lactobacillus sakei</i> pendant 8 semaines	Leisner <i>et al</i> , 1996
Leeucocine A et C	Utilisation d'un <i>Leuconostoc carnosum</i> producteur de leucocines pour inhiber <i>L.monocytogenes</i> dans du cervelas	Inhibition et contrôle de la croissance de <i>L.monocytogenes</i> à 5 ⁰ et 10 ⁰ C pendant 4 semaines	Jacobsen <i>et al</i> .2003

II.8.3. effet de bactériocines sur la santé :

Ces dernières années, plusieurs in vitro et in vivo ont montré que LAB bactériocines présentent un effet protecteur dans le tractus gastro - intestinal (GIT) en excluant les agents pathogènes ou la promotion de la colonisation intestinale (Corr *et al*, 2007 , Dobson *et al*. 2012 ; Kommineni *et al*, 2015).

Les infections gastro-intestinales sont une préoccupation majeure pour la santé humaine, mais les antibiotiques ont un effet néfaste sur le microbiote intestinal. Par conséquent, l'effet anti-infectieux des bactériocines productrices de LAB est une alternative prometteuse aux antibiotiques, en particulier pour les cas particuliers où d'autres méthodes ne sont pas autorisées (par exemple, les femmes enceintes) (Hammami *et al*, 2013).

CHAPITRE III

LES BACTÉRIES PATHOGNES

Chapitre III : les bactéries pathogènes

III. Les bactéries pathogènes:

III.1.Définition :

Les bactéries pathogènes sont des bactéries qui ont la capacité de provoquer une maladie chez leur hôte (Homme, animal...), (Delarras., 2014), Les bactéries pathogènes contaminent de nombreux produits alimentaires et peuvent constituer un grave danger pour leur qualité et leur conservation. Plusieurs espèces présentent un danger au point de vue sanitaires. (Joseph, 2003) Les bactéries pathogènes sont à l'origine de toxi-infection alimentaire (intoxication) et les maladies infectieuses d'origine alimentaire. (Isaac, 2009)

III.2 Classification des bactéries pathogènes :

III.2.1.Bactéries pathogènes spécifiques (BPS)

Bactéries pathogènes spécifiques (BPS) Ce sont des bactéries provoquant des maladies cliniquement définies et physiopathologiquement spécifiques

On peut les diviser en deux groupes :

➤ 1^{er} Groupe : Les bactéries pathogènes spécifiques facultatives

Ces BPS facultatives peuvent se développer dans la nature. Sur la peau et les muqueuses de l'homme ou des animaux

Tableau 05 : quelques principales bactéries pathogènes spécifiques facultatives. (Delarras., 2014),

Bactéries pathogènes spécifiques facultatives	Maladies spécifiques humaines	Transmission et contamination pour l'homme
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listériose humaine d'origine alimentaire et animale	Produits de charcuterie, fromages crus à pâtes molles, poissons fumés....
<i>Salmonella Typhi</i>	Fièvre typhoïde	Eaux, aliments contaminés
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulisme animal et humain	Conserves ou semi-conserves mal préparées ou stérilisées (fruits et légumes, jambon de porc, poissons)

Chapitre III : les bactéries pathogènes

➤ 2^{ème} Groupe : Les Bactéries pathogènes spécifiques obligatoires

Ces BPS obligatoires incapable de se multiplier en dehors d'un foyer infectieux

Tableau 06 : quelques principales bactéries pathogènes spécifique obligatoires (Delarras., 2014),

bactéries pathogènes spécifiques obligatoire	Maladies spécifiques	Transmission et contamination pour l'homme
<i>Brucella melitensis</i>	Brucellose humaine ou fièvre de malte (homme : hôte accidentel)	Consommation des aliments contaminés
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (bacille de Koch)	Tuberculose humaine	Contamination surtout aérienne par contact avec un malade
<i>Mycobacterium leprae</i> (bacille de Hansen)	Lèpre	Transmission directe ou indirecte par les malades (crachats, sécrétions nasales)

III.2.2. Bactéries pathogènes opportunistes (BPO) :

Ce sont des bactéries commensales, parfois saprophytes, dont la présence dans un organisme ne provoque pas habituellement une maladie, elle devient pathogène dans des conditions favorisantes telles que l'immunodépression. (Pebret, 2003)

Tableau 07 : Flores commensales normales humaines. (Delarras., 2014),

Flores	Bactéries principales
Cutanée	<i>Staphylococcus</i> , <i>Corynebacterium</i>
Rhino-buccale	<i>Staphylococcus</i> , <i>Sterptococcus</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> et autres bactéries anaérobies non sporulées.
Intestinale	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Bacteriodes</i> et autres bactéries anaérobies Gram-
Génitale (vaginale)	<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> (bacille de Doderlein)

Chapitre III : les bactéries pathogènes

Tableau 08 : Flores exogène (Delarras., 2014),

Flore exogène d'origine diverse	Bactéries principales
Eaux des vases à fleurs, évier...	<i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Aeromonas</i>
Eaux douces et marines	<i>Vibrio</i> , <i>Plesimonas</i>
Animaux, ensilage de végétaux pour nourrir les animaux	<i>Listeria</i>

III.3. Pouvoir pathogène des bactéries :

Le pouvoir pathogène des bactéries s'exprime de deux processus différents : la contagiosité et la toxigénèse. (jacxsens,2011)

III.3.1. La contagiosité

La contagiosité est la capacité d'un microorganisme à se développer à l'intérieur d'un tissu et à y déclencher des maladies. (jacxsens,2015) . Cette contagiosité se traduit par la capacité des microorganismes à :

- se fixer à la surface du tissu et à y pénétrer;
- résister à la phagocytose;
- produire des enzymes agressifs
- se multiplier à l'intérieur du tissu.

III.3.2. La toxigénèse.

De nombreux micro-organismes et en particulier des bactéries peuvent fabriquer des toxines, véritables poisons qui sont souvent toxiques, voir mortels pour l'homme. On peut en distinguer deux types :

III.3.2.1. Toxines protéiques ou Exotoxines :

Elles sont des protéines élaborées dans le cytoplasme des bactéries, puis elles sont général libérées dans le milieu extracellulaire, elles sont principalement produites par des bactéries à Gram+, mais aussi par quelques bactéries à Gram-(Delarras., 2014),, les exotoxines produites par les bactéries responsables de la diphtérie, du tétanos et botulisme. (jacxsens,2011)

Chapitre III : les bactéries pathogènes

Tableau 09 : bactérie à exotoxines protéiques (Delarras., 2014)

Bactéries	Formes bactériennes	Gram	Maladie
<i>Vibrio cholerae</i>	Bacillus incurvés en vibrions	-	choléra
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci sphériques	+	Intoxication alimentaire
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Bacilles à extrémités enflées « en massue » ou « en haltère »	+	Diphthérie
<i>Yersinia pestis</i>	coccobacille	-	peste

III.3.2.2. Toxines Glucido-lipo-polypeptidiques ou Endotoxines :

Elles sont constituées de complexes de polysides. De lipide et de protéines qui sont dénommés antigènes glucido-lipido-polypeptidiques ; ils seront libérés dans le milieu extracellulaire après lyse des bactéries en fin de croissance, (Delarras., 2014)

Les endotoxines provenant de la paroi cellulaire de bactéries gram-négatives elles provoquent généralement de la fièvre et des troubles circulatoires.(jacxsens,2015)

Ces toxines correspondent aux antigènes somatiques de bacilles à Gram : certaines entérobactéries (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Shigella* autre que *S. dysenteriae*):

- *Pseudomonas aeruginosa*...

III.4.Principale bactérie pathogènes plus fréquente :

III.4.1 *Salmonella* :

Les salmonelles sont des bactéries à Gram négatif de la famille des entérobactériacées anaérobie facultatives, capable de se multiplier à des températures comprises entre 5 et 45°C et des valeurs de pH de 4,5 à 9. Les salmonelles considérées comme des agents pathogènes parmi les plus répandus, à la fois chez l'homme et chez les animaux. Elles sont à l'origine de salmonellose qui l'une des toxi-infections alimentaires les plus courantes et les plus répandues (Jomaa, 2007, Sperber et Schlepner, 1987) les espèces isolées les plus communes sont *salmonella typhimurium* et *salmonella enteritidis* (Levine *et al*, 1991)

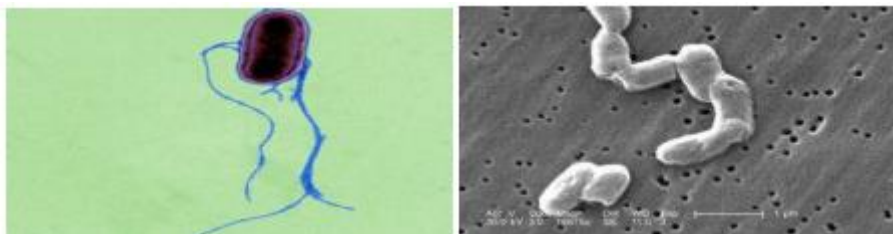


Figure 05 : observation microscopique électronique de *salmonella typhi* et *salmonella infantis* (Gx10000) (Prescott *et al*, 2003)

III.4.2. *Listeria monocytogenes* :

Listeria monocytogenes appartient à la famille des listériaceae. Est un bacille (0.4 à 0.5 μm de diamètre et 0.5 à 2 μm de longueur) à gram positif non asporulé et non capsulé. Aérobie-anaérobie facultative. Elle est catalase positive et oxydase négative (**Vazquez et al, 2001**). *Listeria monocytogenes* est la principale espèce pathogènes du genre listeria, cette bactérie est à l'origine d'infection sévères chez la plupart des espèces animales, incluant l'homme et les mammifères, les oiseaux et les animaux à sang froid ,plus de la moitié des infections à *L.monocytogènes* sont observées chez la femme enceinte. L'infection du système nerveux central est fréquente chez le nouveau-né. (**Denis., 2002**), *Listeria monocytogenes* est fréquente dans les produits laitiers souvent fortement contaminés : lait cru (45 % de contamination), fromages tant au lait cru .On retrouve également *Listeria monocytogenes* dans les produits carnés (contamination de 41 % des viandes hachées surgelées 32 % des produits de charcuterie crue, 60 % des poissons fumés) ainsi que dans les produits de la mer et les légumes, salades ou champignons. Cette bactérie est un psychrophile se développant à température inférieure à 4°C. (**Flandrois., 1997**)



Figure 06 : observation microscopique électronique de *Listeria monocytogenes* (**Denis, 2002**)

III.4.3. *Staphylococcus aureus*:

Staphylococcus aureus est une bactérie sphérique à Gram positif, aérobie ou anaérobie facultative. Toutes les souches sont coagulase positive et fermentent le glucose, et quelques-unes son habitat naturel est la peau et les muqueuse de l'homme et des animaux.(**Hans ., 1988**), elle produit diverses toxines dont des entérotoxines de différents types antigéniques (A à F). Provoquant une intoxication alimentaire ou toxi-infection alimentaire, il peut être responsables d'infection cutanées (impétigo,furoncles...) ,de la sphère ORL (sinusites, otites...), d'infections diverses et d'infections septicémiques redoutables. D'infections nosocomiales. (**Delarras., 2010**)

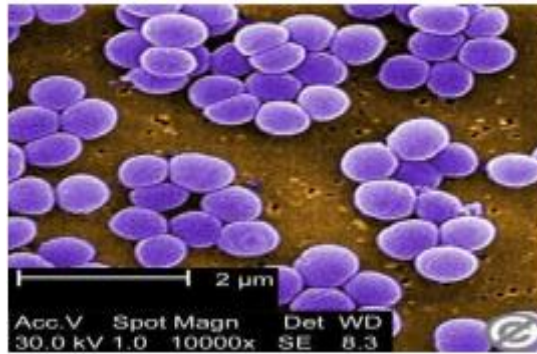


Figure 07 : Aspect morphologique de la souche de *Staphylococcus aureus* observée au microscope électronique (Leyral et Vierling, 2007)

III.4.4. *Escherichia coli* :

Escherichia coli sont des bacilles ou coccobacilles Gram-, anaérobie facultatives, oxydase- catalase+ asporulés. Ils réduisent les nitrates en nitrites, ils fermentent le glucose (Joseph; 2003), *Escherichia coli* ou « colibacille » est l'hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud c'est un coliforme fécal, germe indicateur de contamination fécale dans les eaux et les aliments

Les souches d'*Escherichia coli* responsables d'infections chez l'homme sont différentes de celles qui constituent l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie des adultes et des enfants . (Delarras., 2010)

Différents groupes ou classes d'*Escherichia coli*, sont impliqués dans des syndromes diarrhéiques chez l'homme et les jeunes enfants dans les pays en voie développement (PVD) ou les pays développés selon les cas:

- *Escherichia coli* entérohémorragiques (ETEC ou ECET), agent de la diarrhée du voyageur et de diarrhées infantiles, l'infection faisant suite à la consommation d'eau ou d'un aliment contaminé
- *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC ou ECEP), agents de gastro-entérites infantiles....
- *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC). Agents de colites hémorragiques...
- *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines, dénommées Shiga-toxin-producing *E.coli* (STEC)



Figure 08 : *Escherichia coli* observée au microscope électronique (Gx10000) (Goubau et Pellegrims, 2000).

III.4.5. *Pseudomonas aeruginosa* :

Est un bacille à Gram négatif, aérobic strict à flagelle polaire, est un genre présent dans l'environnement on le trouve dans les milieux humides. A l'hôpital, ce germe est répandu dans le milieu type d'environnement (robinet, évier, douches, surface des thermomètres buccaux, humidificateurs...), par ailleurs, cette bactérie peut vivre en commensale de l'homme au niveau du tube digestif. Elles contaminent les produits alimentaires qu'elles peuvent dégrader de façon importante. Ils se multiplient bien sur milieu ordinaires étant mésophiles ou psychrophiles, *Pseudomonas aeruginosa* est un germe typique des infections nosocomiales c'est donc une bactérie pathogène « opportuniste ». (Flandrois., 1997)

Pseudomonas aeruginosa est exceptionnellement l'agent de gastro-entérites (vomissement, diarrhées, crampes abdominales). A partir d'aliments contaminés par des lésions cutanées ou plus rarement des fèces et elle est parfois rencontrée dans l'eau conditionnée. Elle possède au moins six toxines (Joseph; 2003)



Figure 09 : Observation de cellules *p.aeruginosa* entières vu avec le microscope électronique à balayage (Pommerville,2017)

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel et Méthode

❖ Objectif :

Cinq souches de bactéries lactiques et quatre souches pathogènes ont été utilisées. Dont la réalisation des objectifs suivants :

- ✓ Caractérisation et pré-identification des bactéries lactiques
- ✓ De mettre en évidence la production des bactériocines chez les bactéries lactiques et leurs effets sur les bactéries pathogènes
- ✓ Déterminer la Caractérisation de la nature de l'agent inhibiteur

❖ Site d'étude :

Ce travail a été réalisé au laboratoire de recherche de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Mostaganem.

I.1.Milieus de culture :

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

I.2.matériel biologique :

❖ Bactérie lactique : tableau x : les bactéries lactiques et leurs références

- Lactobacillus plantarum* KP178099 origine lait de chamelle (4.18)
- Enterococcus faecium* CP013994, origine lait de chamelle (4.19)
- Enterococcus faecium* KT124593 origine lait de vache (35)
- Enterococcus faecium* KF303433 origine lait de vache (14.2)
- Enterococcus lactis* JQ806726 origine lait de chèvre (10)

❖ Bactéries pathogènes :

Staphylococcus aureus ATCC 25922 provienne d'Hôpital d'Oran.

E.Coli ATCC 25922 provienne d'Hôpital d'Oran.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 provienne d'Hôpital d'Oran.

Candida albicans ATCC 10231 Institut pasteur.

II.Méthodes :

II.1.Revivification et purification des cultures des bactéries lactiques :

Les souches lactiques étaient conservées dans le glycérol a -20°C , après décongélation elles sont Revivifiées dans le milieu MRS liquide puis incubées pendant 24 à 48h à 37°C . La purification des souches revivifiées est réalisée par repiquages successifs, alternant le milieu sélectif MRS liquide et solide par la méthode des stries et l'incubation est faite à 37°C pendant 24 à 48h (**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

II.2.1.conservation à courte durée des souches :

Les souches pures lactiques ont été pris etensemencées sur le milieu MRS solide incliné. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage tous les 15 jours (**Badis et al, 2005**).

II.2.2.conservation à longue durée :

A partir des jeunes cultures (18-48 h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot. Le milieu de conservation contient du lait écrémé, 0,2 % d'extrait de levure et 30 % de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes Eppendorfs à -20°C. Indiquent que des suspensions très concentrées résistent mieux à la congélation. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé à 0,5 % d'extrait de levure, avant utilisation (**Saidi et al , 2002**).

II.3.Confirmation de l'identité des souches lactiques :

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

II.3.1Tests morphologiques :

A-L'aspect macroscopique :

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats, après la croissance des souches on a observé l'aspect des colonies (la taille, la forme, la couleur) sur milieu MRS solide ainsi la détection des troubles dans le bouillon MRS (**Badis et al, 2005**).

B-L'aspect microscopique :

L'observation microscopique au grossissement (G x100) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (**Joffin et Leyral, 1996**).

➤ Coloration de Gram :

Nécessaire à l'observation microscopique car elle nous oriente suite aux formes observées vers les démarches à suivre pour les autres tests. Cette étape sert à colorer les bactéries Gram en rose et les Gram en violet.

II.3.2. Tests physiologiques et biochimiques :

➤ Test catalase :

La catalase est une enzyme capable de dégrader le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en eau et oxygène; c'est une enzyme sécrétée par les bactéries anaérobies strictes ou facultatives, elle catalyse la réaction suivante:



La recherche de la catalase se fait par la mise en contact d'une colonie bien isolée avec une goutte d'eau oxygéné; un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygéné sous l'action de la catalase (**Guiraud, 1998**).

➤ Croissance en milieu hyper salé : (Annexe)

On teste l'aptitude des bactéries lactiques à croître dans un milieu salé à différentes concentrations de chlorure de sodium, ce test peut donner des renseignements précieux pour l'identification des isolats.

Pour cela, des souches pures et jeunes sont ensemencées dans le bouillon MRS contenant 4% (4g de NaCl par 100 ml de milieu) et 6.5% de NaCl, l'incubation se fait à 37 °C durant 24-48h. (**GUIRAUD, 2003**)

➤ Croissance à différentes températures :

Des cultures sont ensemencées sur bouillon MRS et incubées pendant 5 jours et sont incubées à des températures différentes 4°C, 30°C, 37°C et 45°C (**Guessas et Kihal, 2004**) La croissance est exprimée par le trouble du milieu et l'apparition du dépôt au fond du tube.

➤ Test de Thermorésistance :

On a ensemencé les isolats dans de MRS liquide puis ils subissent un chauffage à 60°C au bain marie pendant 30 min puis on à incubé à 37 °C pendant 24h à 48h (**Badis et al, 2004**)

➤ Type fermentaire

Le but de ce test est de déterminer les bactéries hétérofermentaires ou homofermentaires. La méthode se fonde sur l'ensemencement des cultures jeunes des souches lactiques pures (incubées à 30°C/18h) dans un tube contenant bouillon MRS pourvu d'une cloche de Durham et incubé à 30°C/24h. Si la bactérie est hétérofermentaire le CO₂ dégagé s'accumule dans la cloche (**Badis et al, 2005**).

➤ La croissance sur le lait «bleu de Sherman» (Annexe)

Le milieu utilisé est le lait écrémé contenu dans des tubes à essais de 9mL ; 1mL d'une solution de bleu de méthylène à 0,3% et 0,1% sont ajoutés dans chaque tube. Le milieu est ensemencé avec les souches à tester et incubé à 37°C durant 48 heures (**Carr et al, 2002 ; Mathara et al, 2004**).

➤ **Etude du métabolisme azoté (recherche de l'arginine déshydrogénase (ADH)) (Annexe)**

Le milieu utilisé pour ce test contient un indicateur de pH qui est le pourpre bromocrésol. Les bactéries qui possèdent l'ADH (Arginine déshydrogénase) vont acidifier le milieu en fermentant le lactose (le BCP va virer au jaune), puis en déshydratant l'arginine, elles vont ré-alcaliniser le milieu et de ce fait la couleur du BCP redeviendra violette. Les bactéries qui ne possèdent pas cette enzyme vont seulement acidifier le milieu (**Thomas, 1973**).

➤ **Etude du profil fermentaire**

Certainement les bactéries lactiques dégradent différentes sources de carbone. Ce test a été réalisé sur le bouillon MRS BCP dépourvu de l'extrait de viande et sans glucose (**Annexe**), Les sucres que nous avons utilisés sont : Glucose, Cellulose, Mannitol, Leuvilose, Rhamnose, Rafinose, Xylose, Galactose, Adonitol, Arabinose et Sorbitol

La suspension bactérienne est obtenue à partir d'une préculture sur milieu MRS qui est incubé à 37°C pendant 18 heures. 2 mL de la culture jeune était centrifugé à 5000 trs/min pendant 5 min. Le culot contenant les cellules bactériennes est ensuite lavé deux fois avec de l'eau physiologique, Ensuite, 2mL de MRS/M17 + BCP (milieu MRS sans sucre avec un indicateur de pH : le pourpre de bromocrésol à 0,004% (p/v)) sont ajoutés au culot ce qui représente l'inoculum. ensuite les 12 sucres sont répartis séparément dans des tubes contenant Milieu MRS BCP+ culot, Les conditions d'anaérobiose sont assurées par ajout d'une couche d'huile de paraffine à la surface et l'incubation se fait dans des conditions optimales 37°C, pendant 48 heures (**Guessas et Kihal, 2004**), le virage de la couleur du milieu du violet au jaune explique un résultat positif.

➤ **Production de dextrane :**

La production du dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu solide MSE (**Annexe**) (**Mayeux et al, 1962**), les souches productrice de dextrane sont caractérisées par la formation des colonies larges, visqueuses et gluantes.

➤ **Utilisation du citrate :**

L'utilisation du citrate a été étudiée sur milieu kempler et Mc kay (**Annexe**). Ce milieu contient une solution de ferrocyanure de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le potassium ferrocyanide. Les colonies qui ont fermentées le citrate ont lancées la réaction entre ces ions, il en résulte la formation de colonies bleues ou ayant un centre bleu (après 18 h 72 h d'incubation) (**kempler et Mc kay, 1980**).

Les colonies incapables a fermentées le citrate restent blanches.

➤ **Production d'Acétoïne :**

La recherche de l'acétoïne est testée par la réaction de Voges Proskauer (VP) (**Harrigan et McCance, 1976; Zourari et al, 1991 Facklam et Elliot, 1995**) après une culture de 24h à 30°C sur milieu Clark et Lubs (**Annexe**).

Ajouter 5 gouttes du réactif VPI (solution de soude NaOH à 16 % dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VP2 (alpha - naphthol à 6 % dans l'alcool à 95 °C), agiter soigneusement les tubes et attendre un temps maximum de 10 min. La présence d'acétoïne se traduit par une coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu.

II.4. Etude de l'activité antimicrobienne des souches lactiques :

II.4.1. Préparation de la pré-culture bactérienne :

Chaque souche lactique ont étéensemencées dans les milieux MRS liquides à pH 6,8 puis les incubées à 37°C pendant 24H (**Labioui et al, 2005**).

II.4.2. Préparation de l'extrait de bactériocine :

Après incubation de la culture bactérienne, la récupération du surnageant qui contient l'extrait brut de bactériocine se fait par centrifugation à 4000g pendant 20min, puis il se conserve à 4°C (la neutralisation de l'extrait permet d'éliminer l'effet des acides organiques). Ensuite, l'extrait est filtré sur filtre millipore stérile de diamètre 0,22um (**Tagg et al, 1976**)

II.4.3. Préparation de pré-culture de la bactérie test (pathogène) :

Avant l'utilisation de la souche pathogène, celle-ci est cultivée à 37 ±1°C sur 10mL de bouillon nutritif (**Annexe**), pendant 18 à 24 heures. La culture d'une nuit obtenue servirait d'inoculum.

II.4.4. essai de l'activité de bactériocine dans le milieu liquide :

II.4.4.1. Méthodes des puits :

Cette méthode est réalisée sur les bactéries lactiques inhibitrices possédant les plus grande zones d'inhibition montrant la présence de substances inhibitrices, ces substances peuvent diffuser dans un milieu de culture solide Les bactéries lactiques sont repiquées dans du milieu MRS liquide et incubées pendant une période de 18h à 37°C. Après incubation une centrifugation réfrigérée (4°C) est réalisée à 4000 tr/min pendant 15 min.

Des puits de 5 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce (cloche de Durham) sur milieu **Moller Hinton** Agar (**Annexe**) inoculé par la souche indicatrice (pathogène) et seront remplies avec 100 µL du surnageant de culture ou d'extrait cellulaire. Les boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C/4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (**Doumandji et al, 2010**). Les boites sont incubées à 37°C et la présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 24h d'incubation (**Hwanhlem et al, 2011**).

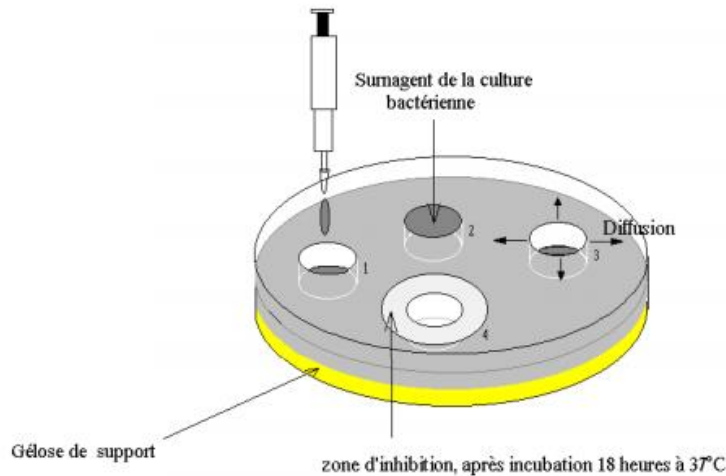


Figure 10 : Méthode de de détection de l'antagonisme bactérien en milieu liquide, méthode de diffusion en puits de **Tagg et Mc Given (1971)**

II.4.5.essai de l'activité de bactériocine dans le milieu solide :

II.4.5.1.méthode de double couche

La détection en milieu solide de l'antagonisme bactérien est réalisée selon la méthode décrite par **Tagg et al (1976)**, À partir des boîtes d'isolement, plusieurs colonies par échantillon et par milieu de culture (MRS) sont transférées, à l'aide de cure-dents stériles, dans des boîtes de Pétri en réplique contenant le même milieu tamponné (tampon phosphate 0,1 M, pH 7,0). L'ensemble des boîtes de Pétri est incubé à 30°C pendant 16 à 24 h. Pour chaque milieu de culture, l'une des boîtes répliques est maintenue à 4°C, tandis que les autres boîtes sont recouvertes par la sur-couche contenant le micro-organisme indicateur. Après solidification et une pré- incubation de 2 h à 4°C, les boîtes sont incubées à la température optimale de croissance de la souche indicatrice pendant 16 à 24 h. Les boîtes sont ensuite examinées pour la formation des zones d'inhibition de la souche indicatrice autour des colonies (**Figure 10**).

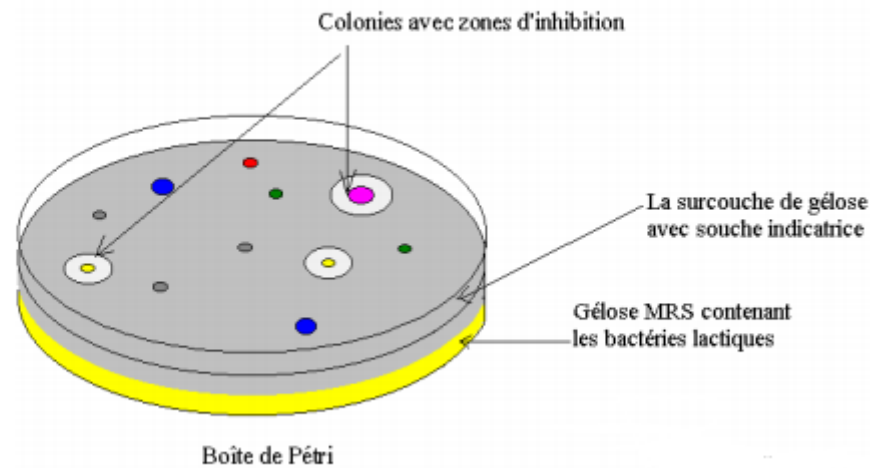


Figure 11 : Méthode de détection de l'antagonisme bactérien en milieu solide, méthode de double couche (**Guessas,2007**)

II.5.Caractérisation de la nature de l'agent inhibiteur

II.5.1. Effet des enzymes protéolytiques :

Les bactéries lactiques sécrètent les bactériocines dans le milieu extracellulaire d'où l'intérêt de rechercher de ces substances dans les surnageants de culture. Les bactériocines qui sont des substances protéiques, sont dégradées par des enzymes protéolytiques (**Klaenhammer, 1993**).

L'effet des enzymes protéolytiques a été déterminé selon la méthode décrite par **Hirsch (1979)**, 10 μ L de l'enzyme [trypsine, pepsine, lysozyme (1 mg/ml, préparé dans 50 mM Tris-HCL, pH 8.0)], tous les enzymes ont été dissoute dans la solution tampon, elles ont ajoutées au surnageant brut actif, Charger les puits avec 70 μ L des solutions suivantes :, surnageant sans enzyme et surnageant avec enzyme des boites déjà ensemencées par la souche pathogène. Laisser diffuser 1heure à la paillasse, puis incubé 24 heures à 37°C.

II.5.2.Effet de la température

Pour l'effet de la chaleur sur l'activité des extraits, un surnageant de chaque culture des souches bactériocinogènes a été chauffé à 100°C pendant 15 minutes, 20 minutes, 30 minutes. Après refroidissement, l'activité antibactérienne a été vérifiée vis-à-vis de la souche pathogène par la méthode de diffusion en puits (**Tagg et Mc Given, 1971**).

II.5.3. Effets du ph :

La sensibilité du pH sur l'activité des bactériocines a été évaluée en ajustant les surnageants des cultures lactiques à un intervalle de pH acides ou basique se situant de 2.4 , 4.6 , 7, 9 , en utilisant du NaOH 1N ou HCl 1N puis tester leur activité antibactérienne

(**Albano *et al*, 2007**). La lecture des résultats se fait par comparaison, de l'effet inhibiteur des surnageants traités et non traités.

Résultats et discussion :

I. Revivification et purification

Après la revivification et purification de nos souches lactiques obtenues par plusieurs repiquages successifs sur milieu MRS (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 la confirmation de l'identité des souches est faite par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques (Carr *et al*, 2002).

II. Etude morphologique :

➤ Critères macroscopique :

La caractérisation macroscopique, permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide MRS (Ana Belen florez *et al*, 2006) et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité), Pour les isolats testés, on a observé sur milieu solide des petites colonies d'environ 1mm de diamètre, de forme lenticulaire de couleur blanchâtres ou laiteuse , avec une surface lisse et un contour circulaire régulier (**figure11**), La croissance en milieu MRS liquide est caractérisée par l'apparition du trouble (**figure 12**).



Figure 12 : aspect lenticulaire de couleurs blanches des colonies des bactéries lactiques sur milieu MRS solide après incubation à 30°C pendant 24h

Tableau 10 : les caractères macroscopiques des 5 souches des bactéries lactiques

Code de Souche	Couleur	taille	Aspect
Ent.JQ806726 10	Blanchâtre	Petite	lenticulaire
Ent.KF303433 14.2	Laitieuse	Petite	lenticulaire
Ent.KT124593 35	Blanchâtre	petite	lenticulaire
Ent. CP013994 4.19	Blanchâtre	Petite	lenticulaire
Lac.KP178099 4.18	Blanchâtre	Petite	lenticulaire

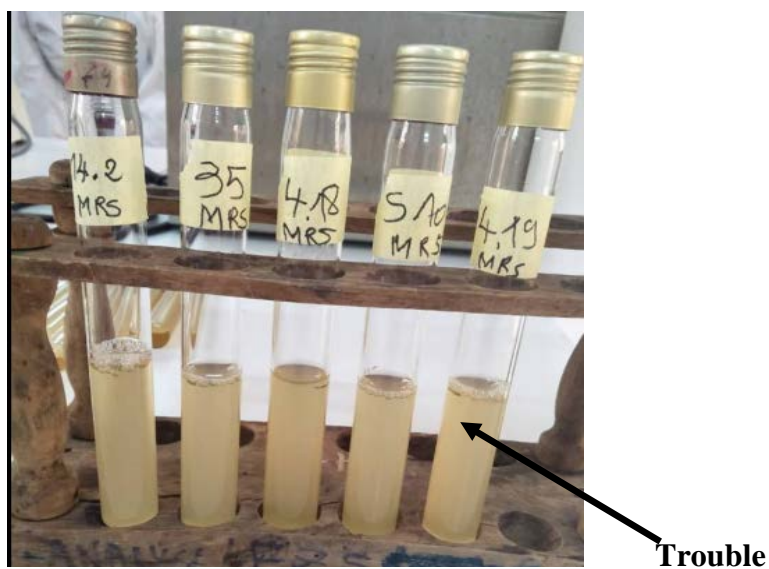


Figure 13 : Aspect des souches lactiques pures en milieu MRS liquide

➤ **Critères microscopiques :**

L'observation microscopique a montré que toutes les souches sont gram positif, il y a des souches se présentent sous forme de coques disposés en diplocoques et de forme bâtonnets aux extrémités arrondies regroupées en paire (**figure 13**)

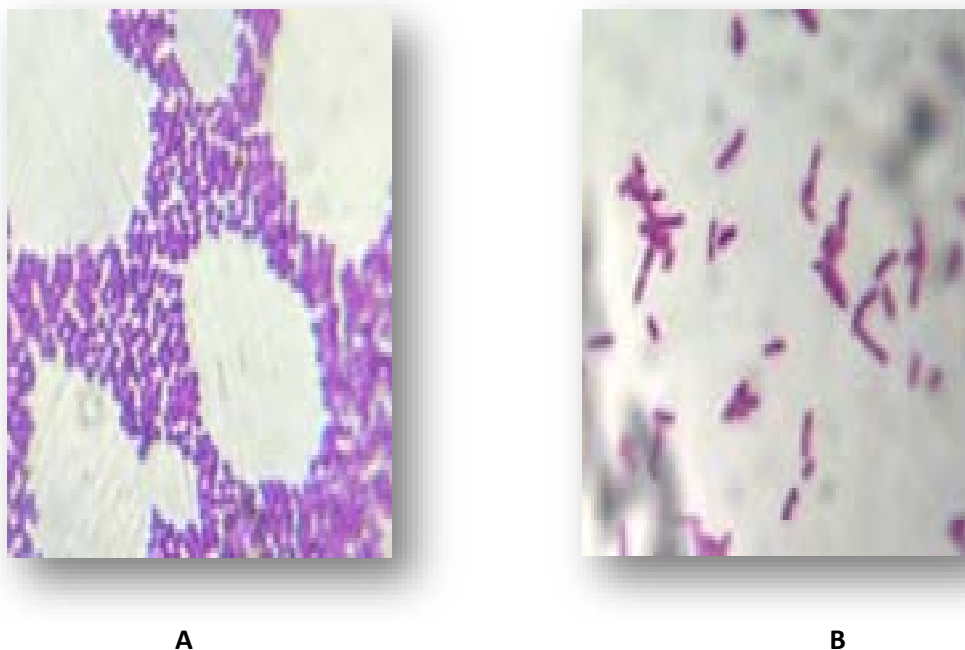


Figure 14 : résultats de Coloration de Gram des souches lactiques.

A : *Enterococcus faecium*, **Gram +**

B : *Lactobacillus plantarum*, **Gram+**

Tableau 11 : critères morphologiques le Gram des 05 souches des bactéries lactiques

Code de Souche	Gram	Forme	Mode d'association
Ent.JQ806726 10	+	cocci	Diplocoques et en courtes chaînes
Ent.KF303433 14.2	+	cocci	Diplocoques
Ent.KT124593 35	+	cocci	Diplocoques et en courtes chaînes
Ent. CP013994 4.19	+	cocci	Diplocoques
Lac.KP178099 4.18	+	bâtonnets aux extrémités arrondies	En chaînes et en diplobacilles

II.1. Tests physiologiques et biochimiques :

➤ Test de la catalase

Toutes les souches lactiques ne possèdent pas l'activité catalasique (absence de dégagement gazeux (O₂), donc elles sont dites catalase négatives.

➤ Croissance en milieu hyper salé :

Les cinq souches sont capables de croître sur le bouillon MRS avec des concentrations de 4% et 6.5% de NaCl, se traduit par l'apparition d'un trouble (figure 14)

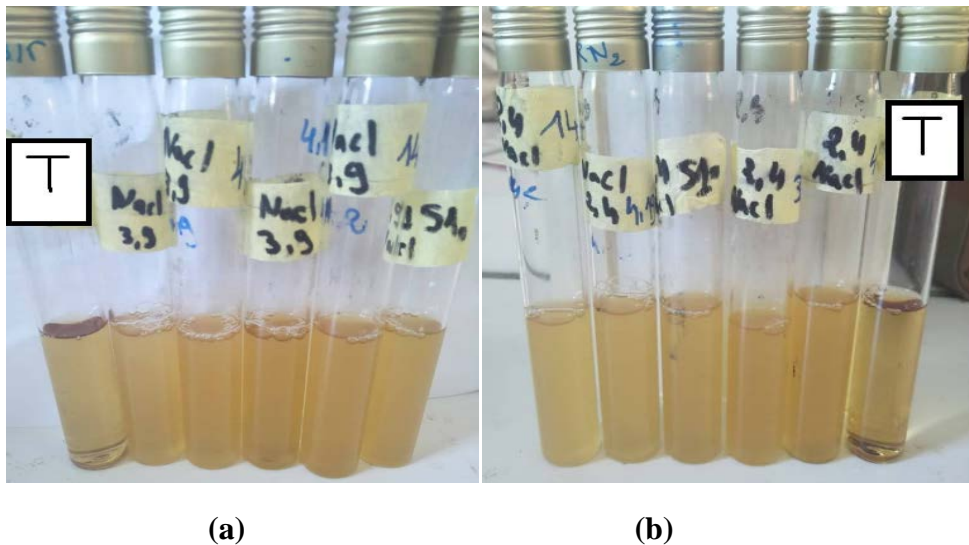


Figure 15 : les bactéries lactiques poussent dans le bouillon MRS avec des concentrations 4% (a), et 6.5% (b) de NaCl

➤ Croissance à différentes températures :

Toutes les bactéries poussent dans les températures : 4°C (après 06 jours), 30°C et 37°C (après 24h), 45 °C (après 48h) Ce qui confirme qu'on a des souches Thermophiles (tableau 12)

➤ Test de Thermorésistante :

Toutes Les souches lactiques, poussent dans bouillon MRS après une traitement thermique pendant 30 min à 60°C . Ce qui confirme que ces souches sont thermophiles.(tableau 12)

Tableaux 12: représente les résultats des tests de catalase, Croissance à différentes températures, Thermorésistante, Croissance en milieu hyper salé.

Souches	Cluture à 30°C	Cluture à 37°C	Cluture à 45°C		Thermorésistante 60°C
Ent.JQ806726 10	+	+	+	Thermophile	+
Ent.KF303433 14.2	+	+	+	Thermophile	+
Ent.KT124593 35	+	+	+	Thermophile	+
Ent. CP013994 4.19	+	+	+	Thermophile	+
Lac.KP178099 4.18	+	+	+	Thermophile	+

➤ **Type fermentaire**

Ce test nous a permis de différencier entre les souches homofermentaires et les souches. Hétérofermentaires en utilisant un milieu MRS stérile qui contient une cloche de Durham, (**Badis et al, 2005**),Aucune production du gaz (CO₂) (**Figure 15**) à partir du glucose n'a été observée chez les cinq isolats, ainsi elles sont considérées comme homofermentaires (**Tableau 13**)

D'après l'explication de (**Atlan et al, 2008**) que les bactéries lactiques selon leurs genres ou espèces utilisent l'une des deux voies du métabolisme des sucres (**Figure 15**), soit la voies homofermentaire (Embden- Meyerhof-Parnas, EMP) ou hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate).

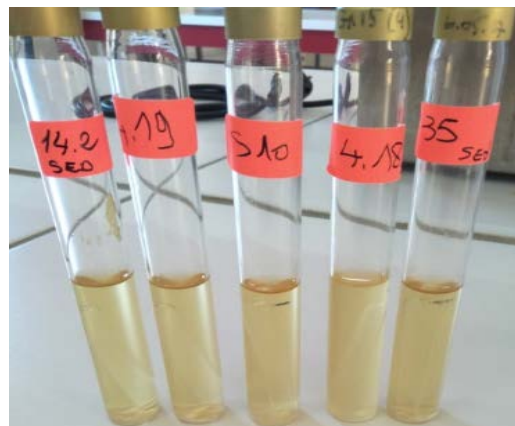


Figure 16 : le test du type fermentaire des différentes souches lactiques

Tableau 13 : représente les résultats du test du type fermentaire sur MRS liquide

Souches	Homofermentaires	Hétérofermentaires
Ent.JQ806726 10	+	-
Ent.KF303433 14.2	+	-
Ent.KT124593 35	+	-
Ent. CP013994 4.19	+	-
Lac.KP178099 4.18	+	-

➤ **La croissance sur le lait «bleu de Sherman»**

Toutes les souches possèdent résultat négative pour la croissance dans 0.3 % pour lait de Sherman, même aussi dans 0.1 % ne représentent aucune croissance dans de lait de Sherman (**Figure16**), donc elles sont sensibles de croitre en présence de BM. (**Guiraud 1998**)



Figure 17 : le test croissance sur le lait «bleu de Sherman»

➤ **Test de l'ADH :**

L'activité de l'arginine déshydrogénase effectuée sur les cinq souches lactiques, sur milieu M16 BCP à révélé que toutes les souches ont la capacité d'hydrolyser l'arginine, car elles possèdent ADH (ADH déshydrogénase), donc on dit elles ADH positive. (**Figure 17**). La couleur jaune indique la dégradation de lactose et NH₃ responsable de la réalcalinisation du milieu et l'apparition de la couleur violet et absent (**Zarour K. 2010**).

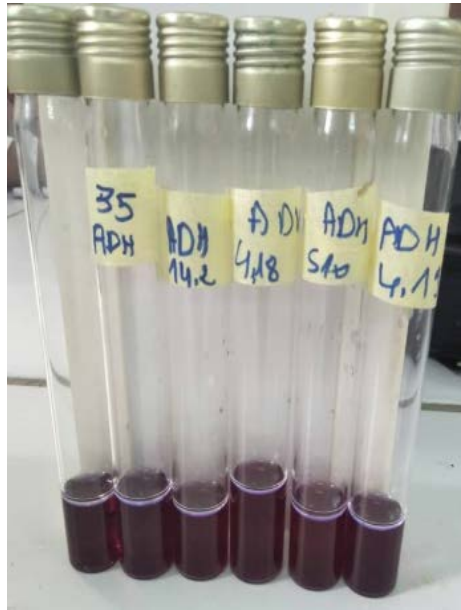


Figure 18 : Résultats du test de l'arginine (ADH) arginine déshydrogénase

Tableau 14 : représente les résultats du test de l'arginine (ADH) des isolats retenus.

Souches	ADH
Ent.JQ806726 10	+
Ent.KF303433 14.2	+
Ent.KT124593 35	+
Ent. CP013994 4.19	+
Lac.KP178099 4.18	+

➤ **Etude du profil fermentaire**

La détermination des genres et des espèces bactériennes, réside essentiellement dans leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique et autres acides organiques. L'analyse des profils fermentaires (**tableau 15**) révèle une diversité métabolique des carbohydrates chez les isolats retenus. (**Figure 18**)

Tableau 15 : profils fermentaire des sucres par les souches étudiées.

Souches / Sucres	Lac.KP178099 4.18	Ent. CP013994 4.19	Ent.KT124593 35	Ent.KF303433 14.2	Ent.JQ806726 10
Galactose	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	+	-
Leuvilose	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+
Cellulbiose	+	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-

D'après les résultats de **tableau 15** et la **figure 18**, nous distinguons le virage de milieu du violet au jaune et cela indique que la souche lactique a pu utiliser cette source de carbone lors de sa croissance (**Bauer et al, 2009**).

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

Les souches qui fermentent le mannitol, et le raffinose, sont identifiées comme *Lb. plantarum* (**Schillinger et Lücke, 1987**), *Enterococcus faecium* est différencié des autres espèces d'entérocoques, par ses plus grandes capacités cataboliques de sucre, donc Les souches d'entérocoques qui fermentent arabinose ou mannitol, , sont identifiées comme *Enterococcus faecium* (**B C Weimer.,2007**).

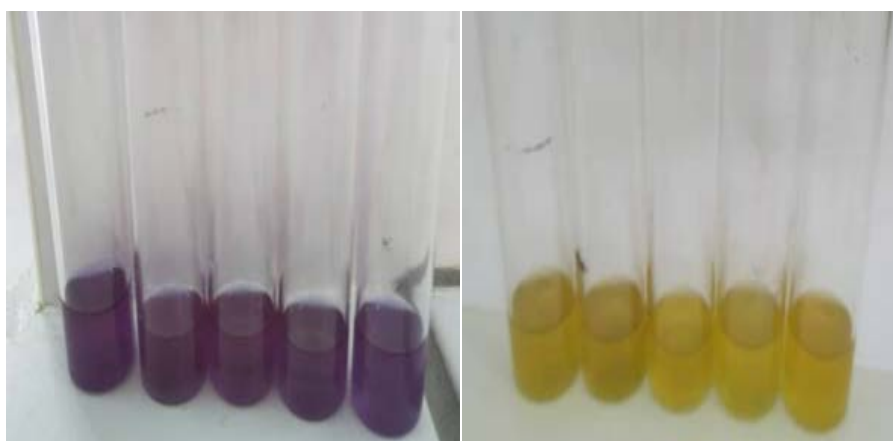


Figure 19 : résultats de test de profil fermentaire des souches étudiées

Violet : absence de dégradation- | jaune: dégradation des sucres +

➤ **Production de dextrane :**

L'activité des dextrane-sucrases des souches lactiques a pour résultat la formation de dextrans et d'oligosaccharides (**Robyt et Walseth, 1978**).

Tous Les souches lactiquesensemencées sur le milieu MSE ne sont pas productrices de dextrane cela indique qu'elles ne possèdent pas l'enzyme responsable à la synthèse des exopolysaccharide.

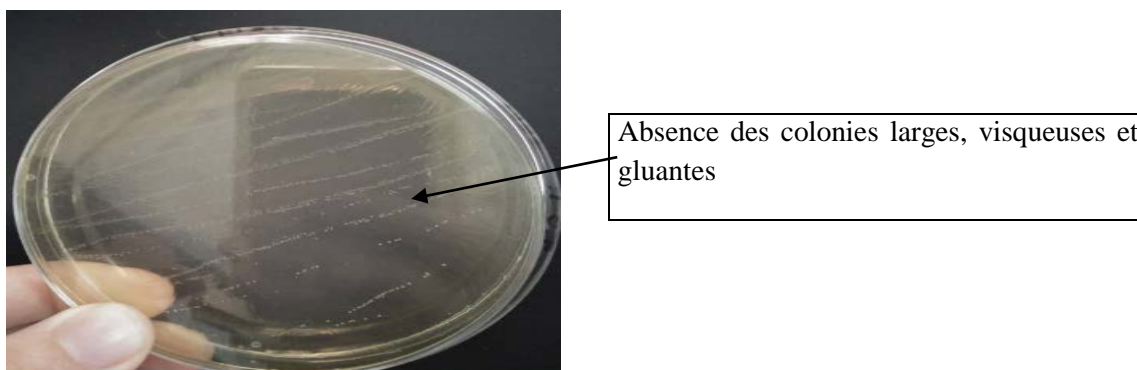


Figure 20 : résultat de test de production du dextrane

Tableau 16 : représente résultat de test de production du dextrane

Souches	Dextrane
Lac.KP178099 4.18	-
Ent. CP013994 4.19	-
Ent.KT124593 35	-
Ent.KF303433 14.2	-
Ent.JQ806726 10	-

➤ **Utilisation du citrate :**

Toutes Les souches lactiques ont révélé un résultat positif pour la production de citrate

, Selon **Kihel et al, (1996)**; la présence de citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion de fer et ferricyanure de potassium. Les colonies qui ferment le citrate lancent la réaction entre ces ions (il en résulte des colonies bleues avec un centre bleu foncé).

La première enzyme induite dans le métabolisme du citrate est le citrate perméase (**Harvey et Collins, 1962**).

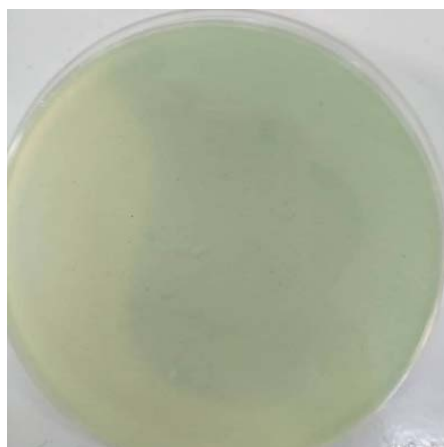


Figure 21 : test de citrate sur le milieu KMK (kempler et Mc kay)

Citrate +

Tableau 17 : représente résultats de test de production de citrate

Souches	Citrate
Lac.KP178099 4.18	+
Ent. CP013994 4.19	+
Ent.KT124593 35	+
Ent.KF303433 14.2	+
Ent.JQ806726 10	+

➤ **Production d'Acétoine :**

La production d'acétoine se traduit par l'apparition d'un complexe rose (Bourel, et al, 2001), Toutes Les souches lactiques ont révélé un résultat négatif. (tableau 18), donc y'a de production d'acétoine .

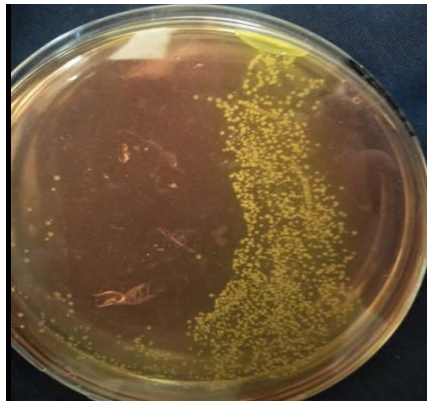
Tableau 18 : représente le résultat de test de production d'acétoine

Souches	Acétoine
Lac.KP178099 4.18	-
Ent. CP013994 4.19	-
Ent.KT124593 35	-
Ent.KF303433 14.2	-
Ent.JQ806726 10	-



Figure 22 : résultat de test de production d'acétoine

➤ **Aspects macroscopiques des souches pathogènes :**



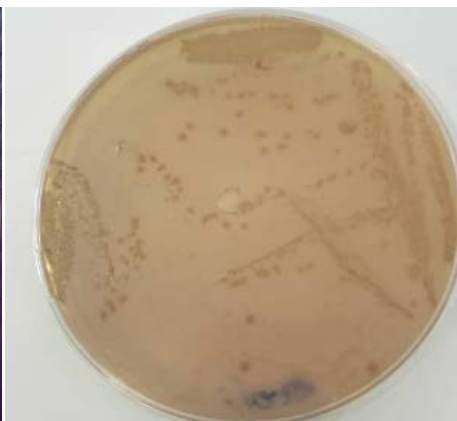
Staphylococcus aureus



Pseudomonas aeruginosa



Candida albicans



E. coli

Figure 23 : aspects macroscopiques des souches pathogènes utilisées

III. Etude de l'activité antimicrobienne des souches lactiques :

III.1. Essai de l'activité de bactériocine dans le milieu liquide « Méthodes des puits » :

Le principe était de chercher l'effet inhibiteur des souches productrices dans leur surnageant de culture. Nous avons remarqué que cette activité inhibitrice est présente dans le surnageant (figure 23).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques ont une activité inhibitrice dirigée seulement contre *Staphylococcus aureus*, mais dans certains cas, cette activité est nulle. (Tableau 19) L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1 mm (Schillinger et Lucke, 1989)

Tableaux 19 : représente Le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes « méthode des puits »

Souches pathogènes / Type de surnageant	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Ecoli</i> ATCC 25922	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Lac.KP178099 4.18	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Ent. CP013994 4.19	12 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Ent.KT124593 35	11 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Ent.KF303433 14.2	12 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Ent.JQ806726 10	10 mm	0 mm	0 mm	0 mm

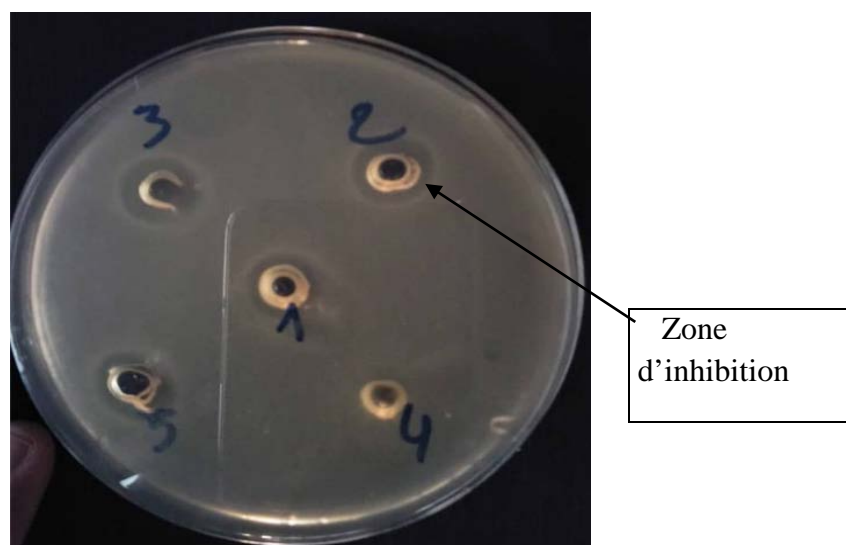


Figure 24: résultats de l'activité de bactériocine dans le milieu liquide « Méthodes des puits » contre souche pathogène *Staphylococcus aureus*

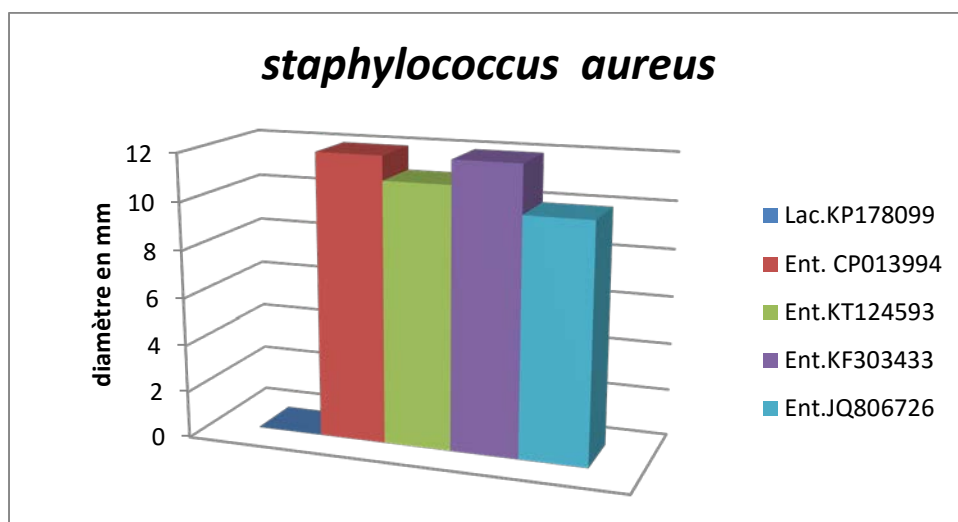


Figure 25 : histogramme représente résultats de l'activité de bactériocine dans le milieu liquide « Méthodes des puits » contre souche pathogène *staphylococcus aureus*

III.2.Essai de l'activité de bactériocine dans le milieu solide « méthode de double couche » :

La méthode par diffusion sur milieu solide (**Fleming et al, 1975**) est utilisée pour la détection des inhibitions; elle se traduit par la formation d'un halo autour des les souches lactiques ensemencées, les résultats obtenus ont révélé la présence de zone d'inhibition, elles sont claires avec des bordures bien distinctes, avec des plages d'inhibition variables (entre 12 et 20mm) (**tableau 20**) donc ont une activité inhibitrice vis-à-vis des souches pathogènes sauf *candida albicans* elles ne ont pas un effet inhibitrice sur elle, ces résultats confirme que ces souches lactiques ont la capacité de produire substance antibactérienne (acide organique, peroxyde d'hydrogène) inhibiteurs de micro-organismes indésirables. Les zones d'inhibition sont grandes (**figure 25**) comparativement aux zones d'inhibitions observées dans la méthode des puits.

Tableau 20 : représente Le diamètre des zones d'inhibition des souches pathogènes « méthode de double couche »

Souches pathogènes / Type de surnageant	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Ecoli</i> ATCC 25922	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Lac.KP178099 4.18	13 mm	17 mm	0 mm	18 mm
Ent. CP013994 4.19	12 mm	15 mm	0 mm	15 mm
Ent.KT124593 35	12 mm	20 mm	0 mm	20 mm
Ent.KF303433 14.2	15 mm	18 mm	0 mm	18 mm
Ent.JQ806726 10	19 mm	17 mm	0 mm	16 mm

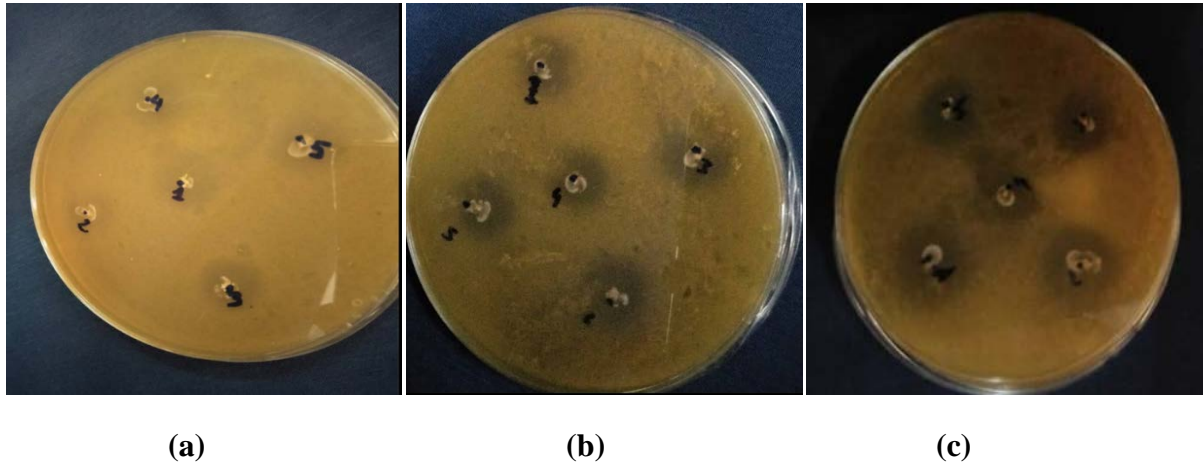


Figure 26 : résultats de la méthode de double couche

a : *staphylococcus aureus*, **b** : *Ecoli*, **c** : *Pseudomonas aeruginosa*

III.3.Caractérisation de la nature de l'agent inhibiteur

III.3.1.Résultat d'effet des enzymes protéolytiques :

La confirmation de la nature peptidique d'une substance produite par une souche lactique est réalisée en utilisant la pepsine et la trypsine (Chen et Hoover, 2003 ; Makhloufi et al, 2011).

Pour les cinq souches lactiques, on a remarqué que l'activité antibactérienne des surnageants vis-à-vis des souches pathogènes a disparu après l'action des enzymes protéolytiques en comparaison avec le surnageant non traité.. **trypsine** altère complètement l'activité antagoniste des substances inhibitrices contenues dans les surnageants, **pepsine** affecte l'activité inhibitrice de toutes les cultures lactiques testées . **lysozyme** altère l'activité antagoniste des substances inhibitrices contenues dans les surnageants des 3 souches lactiques (**figure 26**).

Selon (Callewaert et de Vuyst, 2000 et Aslim et al, 2005) le halo d'inhibition disparaît en présence de l'action d'une enzyme protéolytique, l'agent inhibiteur est de nature protéique, Mais s'il persiste après l'action des enzymes utilisées, il y a une forte probabilité pour que l'agent ne soit pas de nature protéique c'est-à-dire une bactériocine. Donc La perte de l'activité antimicrobienne après traitement avec des enzymes indique la sensibilité des composés actifs sécrétés par les souches mises en culture.

Tableau 21 : représente révélé l'action d'enzyme protéolytique « **lysozyme** » sur l'activité antimicrobienne des extraits bruts sur la croissance des souches pathogènes

Souches pathogènes / Type de surnageant	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Ecoli</i> ATCC 25922	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Lac.KP178099 4.18	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Ent. CP013994 4.19	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Ent.KT124593 35	11 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Ent.KF303433 14.2	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Ent.JQ806726 10	10 mm	0 mm	0 mm	0 mm

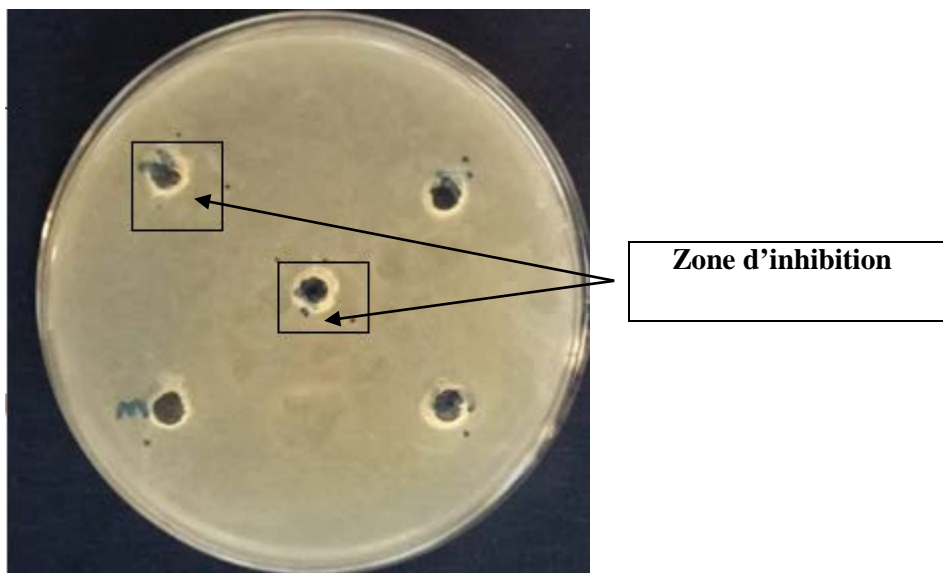


Figure 27: l'action d'enzyme protéolytique « **lysozyme** » sur l'activité antimicrobienne des extraits bruts sur la croissance de *staphylococcus aureus*

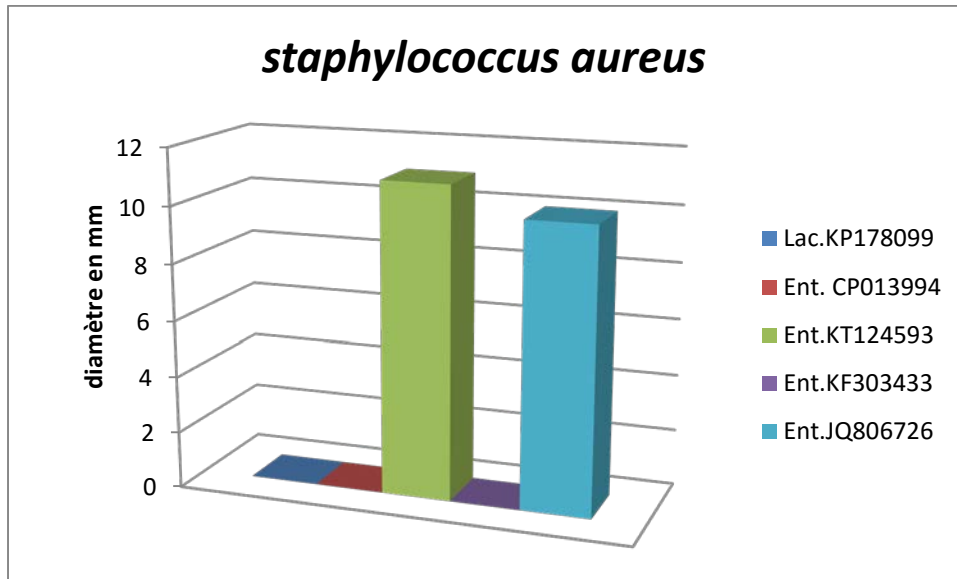


Figure 28 : histogramme représente l'action d'enzyme protéolytique « **lysozyme**» sur l'activité antimicrobienne des extraits bruts sur la croissance de souches pathogène *staphylococcus aureus*

III.3.2.Effet de la température :

Après avoir exposé les extraits des bactéries lactiques à un traitement thermique de 100 °C pendant 15 min, 20 min, 30 min remarquant une stabilité de l'activité du composé inhibiteur, souche *enterococcus faecium* **CP013994**, *enterococcus faecium* **KT124593**, *enterococcus faecium* **KF303433**, *enterococcus faecium* **Ent.JQ806726** ont une zone d'inhibition importante vis-à-vis de souches *staphylococcus aureus*.(**figure 28**) Ce qui conduit que les molécules inhibitrices sont thermostables. Ces spécifications font penser qu'on a affaire à des bactériocines thermorésistantes qui sont de la classe I ou II (**Dortu et Thonart, 2009 ; Parente et al, 1996**)

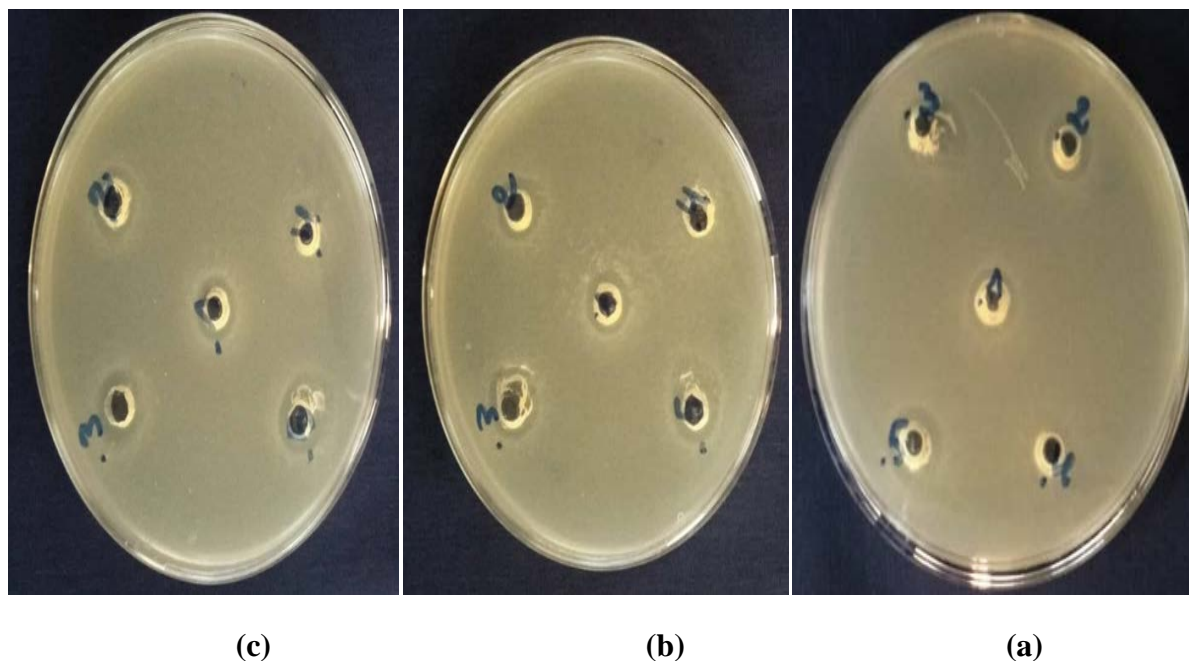


Figure 29 : résultats d'effet de la température sur les extraits des bactéries lactiques vis-à-vis de souches *staphylococcus aureus*

(a) : 15 min, (b) : 20 min, (c) : 30 min

Tableau 22 : résultats d'Effet de la température sur les extraits des bactéries lactiques vis-à-vis de souches *staphylococcus aureus*.

Souches pathogènes	Temps de traitement thermique			
	Type de surnageant	15 min à 100 °C	20 min à 100 °C	30 min à 100 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Lac.KP178099 4.18	0 mm	0 mm	0 mm
	Ent. CP013994 4.19	10 mm	11 mm	10 mm
	Ent.KT124593 35	11 mm	10 mm	11 mm
	Ent.KF303433 14.2	12 mm	11 mm	11 mm
	Ent.JQ806726 10	12 mm	10 mm	9 mm

Résultats d'effet de la température sur les extraits des bactéries lactiques vis-à-vis des souches pathogènes *Ecoli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 : **Pas des zones d'inhibitions**

II.3.3.Effets du ph :

Nous avons constaté une meilleure croissance et production des bactériocines à ph 7, ce qui est en accord avec **Blom *et al.* (1999)** qui ont remarqué l'apparition des grandes zones d'inhibition à ph 7 en comparaison avec ph 2.4 et 4.6 et 9. (**Figure 29**) (**figure 30**)

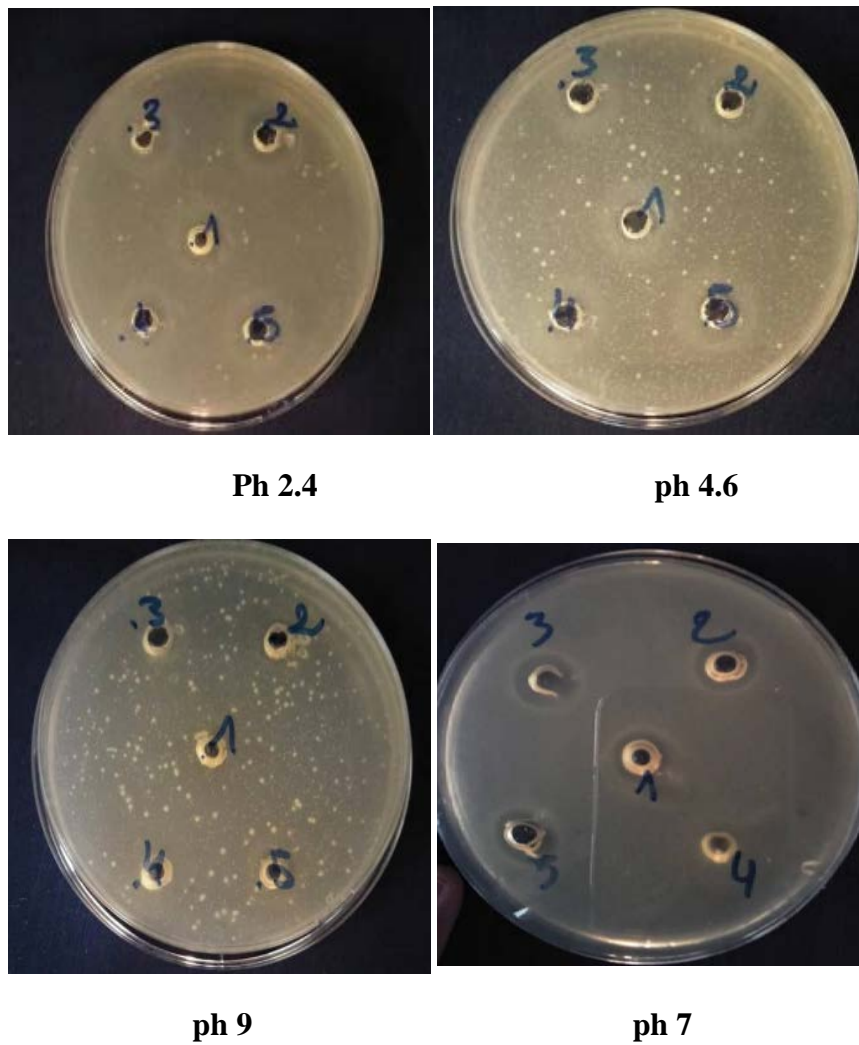


Figure 30: Résultats d'effets du ph sur les extraits des bactéries lactiques vis-à-vis de souches *staphylococcus aureus*

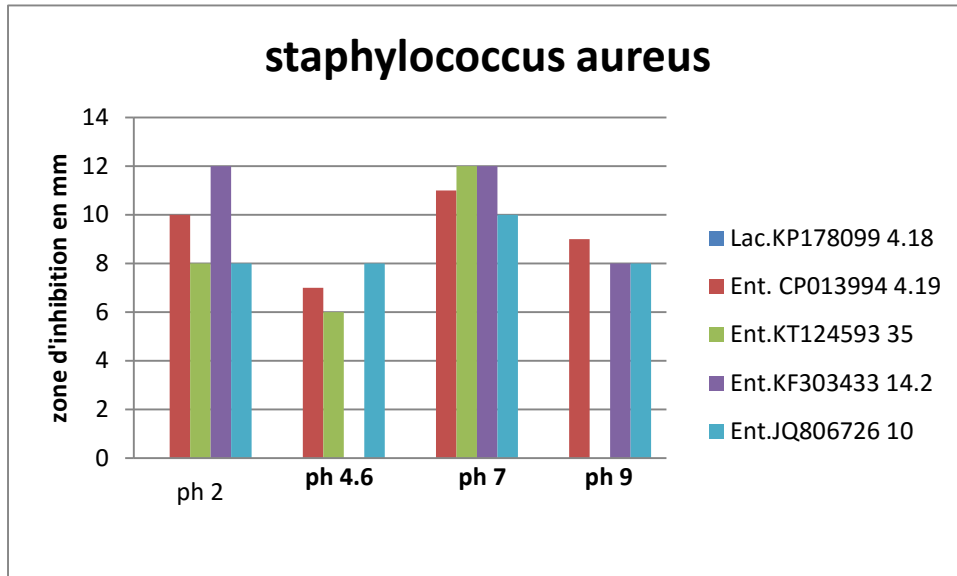


Figure 31 : histogramme représente Résultats d'effets du pH sur les extraits des bactéries lactiques vis-à-vis de souches *staphylococcus aureus*

CONCLUSION

Conclusion

L'objectif de ce travail était de connaître l'effet des bactériocines produites par les bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes

On a procédé à une confirmation des souches lactiques par différents examens et tests physiologiques, les résultats obtenus indiquent que toutes les souches testées sont des Gram positifs, homofermentaire, catalase (-), acétoine (-), citrate (+), dextrane (-), ADH (+)

La mise en évidence de l'activité antagoniste des souches lactiques était l'objectif de cette étude. D'après la méthode des puits, Quatre souches lactiques présentent un effet bactéricide seulement contre *staphylococcus aureus*, très apparent traduit par l'apparition des halos clairs autour des puits., Nous avons essayé de montrer que les 05 bactéries lactiques qui sont utilisées , elles Produisent une activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes, selon « Méthodes de double couche » on a obtenu des bonnes résultats para rapport les résultats de méthodes des puits, donc nos souches lactiques présentent un effet antibactérienne très apparent traduit par l'apparition des halos clairs autour des bactéries lactiques ensemencée dans le milieu MRS.

D'après les résultats de détermination de la nature de l'agent antibactérien on a constaté que l'agent inhibiteur est de nature protéique, et aussi d'après les résultats de traité le surnageants à température 100 °C pendant 30 min on a obtenu des zones d'inhibition donc ces qui conduit que les molécules inhibitrices sont thermostables.ph optimale pour la production des bactériocines et ph 7.

Ce qui est à promouvoir dans les études ultérieures :

C'est de mener une étude similaire et complémentaire pour la confirmation de ces résultats comme il serait intéressant de voir l'effet antagonisme vis-à-vis d'autres germes pathogènes

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

Références bibliographiques

- Aasen I. et al., 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *L. sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 159-166.
- Achemchem-F, 2014, Bactériocines de bactéries lactiques de lait et de fromage de chèvre Edition Paf ,p 27-28
- Albano H., Todorov S.D., Van Reenen C.A., Hogg T., Dicks L.M.T., Teixeira P. 2007. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. Elsevier. *International Journal of Food Microbiology*. 116: 239-247.
- ALEXANDRE H, GRANVALET C, GUILLOUX-BENATIER M, REMIZE-BARNAVON F, TOURDOT-MARÉCHAL R, (2008). Les bactéries lactiques en œnologie, 1^{ère} édition, **LAVOISIER paris. France, Editions TECHNIQUE & DOCUMENTATION, p187**
- Allison G.E., Fremaux C., Klaenhammer T.R. 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 176: 2235- 2241
- 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*, 6: 454-46. I
- Ana Belen F., López-Díaz M.C, Álvarez-Martin P. et Mayo B. 2006. Microbienne caractérisation de la traditionnelle espagnole à pâte persillée fromage de Cabrales: identification des dominantes des bactéries lactiques. *Eur. Res. Technol. Aliment.* 223, 503- 508.
- Anastasiadou S., Papagianni M., Ambrosiadis I. & Koidis P., 2008. Rapid quantifiable assessment of nutritional parameters influencing pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627. *Bioresour Technol.*, **99**(14), 6646-6650.
- Anderssen E.L. Diep D.B., Nes LF. Eijsink V.G.H., Nissen-Mayer J 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: Two new two-peptide bacteriocins, plantaricin EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol* 64: 2269-2272
- Aslim B., Yuksekdog Z.N., Sarikaya E., 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.
- Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Coccagn- Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet
- Aymerich T. Garriga M. Ylla J. Vallier J. Mon- fort JM. Hugas M (2000). Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J Food prot*, 63: 721-726

B

- B C Weimer, 2007, Improving the Flavour of Cheese, Edition Woodhead publishing Limited, England, p420
- Badis A., Guetarni D., Moussa B., Henni D.E., Tornadijo E., Kihal M., 2004. Caractéristiques des bactéries d'acide lactique cultivable, isolés à partir de lait cru de chèvre algérienne et l'évaluation de leurs propriétés technologiques. *Food Microbiol.* 21 (3): 343-349
- Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005).
- Björkroth J., Holzapfel W., 2006. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*.
- Blom, H., Katla, T., Holck, A., Sletten, K., Axelsson, L et Holo, H. (1999). Characterization, Production, and Purification of Leucocin H, a Two-Peptide Bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. *springer-verlag. Current Microbiology.* 39: 43-48.
- BOUREL G., HENNI S., KRANTAR K., ORABY M., DIVIES C., GARMYN D. 2001 Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. *Le lait* 81, 75-82
- BOURICHA M. (2011). La sélection des souches de *Leuconostoc mesenteroides* productrices de substances antimicrobiennes. Mémoire de magister en Microbiologie fondamentale et appliquée. Université D'Oran Es-Senia.

C

- Callewaert R., De Vuyst L. Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed- batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66 (2), 606-613.
- Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*, 23:30-37.
- Carr F.J., Chill D., Maida N., 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in microbiology*, 28(4):281-370.
- Chen H., Hoover D.G. 2003. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety.* 2: 82-100
- Chen Y.S., Srionnual S., Onda T. & Yanagida F., 2007. Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, **45**, 190-193.
- Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F. et Chikindas M.L., (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology.* TU. 1-20.
- Corr S. C., Li Y., Riedel C. U., O'Toole P. W., Hill C., Gahan C. G. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 7617-7621
- Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 777-788
- Cutter CN. Siragusa GR (1998). Incorporation of nisin into a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. *Lett Appl Microbiol*, 27: 19-23.

D

- Daeschel M.A. 1993. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. p. 63-91. In: Hoover D.G Steenson LR. (ed) Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press, New York, États-Unis.
- De Man, J.C., M. Rogosa, M.E. Sharpe, 1960. A medium for cultivation of Lactobacilli. J.Appl. Bacteriol. 23:130,
- De Roissart, H. et Luquet, F.M. (1994). Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1. pp. 1-286
- DELARRAS C,2014. Pratique en microbiologie de laboratoire : Recherche de bactéries et de levures-moisissures. 1^{ère} édition. LAVOISIER paris. France. Editions. LAVOISIER p23-28
- Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. et Janssens, C. 1994. Bactéries lactiques aspects fondamentaux et technologiques, 1 : 25-114.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. &Hugenholtz, J.(1996). Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie Leeuwenhoek69, 193+202.
- Denis-F. Les bactéries, 2002,champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant,Édition John Libbey Eurotext,p496
- Devoyod J.J. et Poullain F., 1988. Les LeuconostocsPropriétés: leur rôle en technologie laitière, *Le Lait*, 68 (3) : 249-280
- Diep, D. B., and Nes, I. F. (2002) Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr Drug Targets*.3: 107-122
- Dobson A., Cotter P. D., Ross R. P., Hill C. (2012). Bacteriocinproduction:aprobiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1–6
- Dortu C., Thonart P. 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 13: 143-154
- Doumandji A., Hellal A., Saidi N., 2010. Purification de la bactériocine a partir de *Lactobacillus acidophilus* 11, *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 4: 25-47

E

- Elmer H. Marth, and James Steele,2001,Applied Dairy Microbiology,Second Edition, Marcel Dekker. Inc., new york.p736

F

- Facklam R., Elliot J.A., 1995. Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci *ClinicalMicrobiol. Reviews.*, 8: 479-495
- FAO, T. W. H. O. (2001) .Probiotic definition
- Flandrois,1997, Bactériologie médicale,preses Universitaires De Lyon.p309
- Fleming H.P., Etchells J.L., Costilow R.N. 1975. Microbiological inhibition of isolate of *Pediococcus* from cucumber brine. *Appl. Environ. Microbiol.* 30: 1040-1042

- François - P. 2003. Maladies infectieuses : Toutes les pathologies des programmes officiels études médicales ou paramédicales. Editions heure de France .paris.p64
- Franz C.M., Worobo R.W., Quadri L.E., Schillinger U., Holzapel W.H Vederas J.C., Stiles M.E. 1999. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2170-8.

G

- Garvie, E.I. 1986. Genus *Leuconotoc* van Tieghem 1878, 198^{AL} emended Mut. Char. Hucker and Pederson 1930, 66^{AI} In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol 2, Eds P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, pp. 1071-1075.
- Georges Corrieu. François-Marie Luquet, 2008, Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Editions TEC et DOC. LAVOISIER ,.849P
- Ghrairi T., Chaftar N., Hani K. (2012). Bacteriocins: recent advances and opportunities in *Progress in Food Preservation*, Chapter 23. eds Bhat R., Karim Alias A., Paliyath G., editors. (Oxford: Wiley-Blackwell;), 485–511
- Gonzalez, B., P. Arca, B. Mayo et J. E. Suarez. (1994). Détection, purification and partial Characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* Strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2158-2163
- Gonzalez, B., P. Arca, B. Mayo et J. E. Suarez. (1994). Détection, purification and partial Characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* Strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2158-2163
- 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.
- Goubau P. et Pellegrims E. 2000. Repères en microbiologie, Édition Garant. p:391
- Gratia A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre souches de colibacille. *C.R. Soc. Biol.* 93: 1040-1041
- Guerra NP, Macías CL, Agrasar AT, Castro LP. Development of a bioactive packaging cellophane using nisaplin as biopreservative agent. *Lett Appl Microbiol.* 2005;40:106–110.
- Guessas B. 2007. Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran. 148 pp
- Guessas B., Kihal M. 2004. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African J. Biotechnol.* 3(6): 339-342.
- Guiraud J (2003): *Micribiologie alimentaire, Techniques d'analyse microbiologiques* Ed, Dunod, paris, 2003, 651p
- GUIRAUD J.P., 2004. *Microbiologie Alimentaire*. Tee& Doc, Dunod. Paris. 90-29
- Guiraud, J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie*. Série Agroalimentaire, Eds. Dunod Paris, 652 p.

H

- Hammami R, Fernandez B, Lacroix C, Fliss I. Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70:2947–2967
- Hammes W.P., Hertel C., 2006. The Genera *Lactobacillus* and, *Carnobacterium*. *Prokaryotes.*, 4: 320-403

- Harrigan W.F., McCance M.E., 1976. Eds, Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology Academic Press, Orlando
- HARVEY R.J., COLLINS E.B., 1962. Citrate transport system of *Streptococcus diacetilactis*. J. Bacteriol., 83, 1005-1009
- HARVEY R.J., COLLINS E.B., 1962. Citrate transport system of *Streptococcus diacetilactis*. J. Bacteriol., 83, 1005-1009
- Hassan A.N., Frank J.F. 2001. Starter Cultures and their use. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205
- Hirsch P.R. 1979, Plasmid-determined Bacteriocin Production by *Rhizobium leguminosarum* Journal of General Microbiology, 113, 219-228
- Holzapfel, 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.
- Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S, Tani A, Maneerat S, 2011 Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. Food Control, 22: 401-407

I

- Isaac Budjulobo., 2009 Analyse bactériologie des saucissons vendus dans les alimentations de la ville de Kisangani.

J

- Jack R.W., Tagg J.R., Ray B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiological Reviews. 59, 2, 171-200.
- Jack RW, Wan J, Gordon J. Harmark K. David son BE, Hillier AJ, Wettenhall RE, Hickey MW. Coventry MJ (1996). Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. Appl Environ Microbiol, 62: 2897-2903.
- Jacobsen T. Budde BB, Koch AG (2003). Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. J Appl Microbiol, 95: 242-249
- Jacxsens. L.2011. Restaurants d'entreprise et cuisines de collectivités. edition wolters Kluwer Belgium.p 15-16
- Jacxsens. L.2015. Restaurants d'entreprise et cuisines de collectivités. edition wolters Kluwer Belgium.p 28-29
- Jay.J. M., 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. Applied and Environmental Microbiology, 44: JAY, 525-532
- Jeffrey C.Pommerville, 2017, Fundamentals of Microbiology ,Eleventh Edition ,world Headquarters Usa,p95
- Jimenez-Diaz R, Rios-Sanchez RM, Desma-eaud M. Ruiz-Barba JL, Piard JC (1993). Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. Appl Environ Microbiol, 59 1416-1424.

- Joffin J.N. et Leyral 1996. Microbiologie technique. Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine Bordeaux, France, pp. 219-223
- JomaaAlomar 2007, Etude propriétés physiologique de lactococcus lactis et lactococcus garvieae pour la maîtrise de staphylococcus aureus en technologie fromagerie. Les microorganismes pathogènes du lait et de fromage. thèse Doc. Toulouse
- Joseph- Pierre Guiraud, 2003. microorganisme intervenant dans l'industrie alimentaire, microbiologie alimentaires application à l'étude des principaux groupes microbiens. 1 Fds 91-294.

K

- Kandler et N. Weis ; (1986): Regular-non spring-Gram positive rods-in : bergey's manual of systematic bacteriology 2 : 1208-1260
- Kempler, G.M. et Mc Kay, L.L., (1980), —Improved medium for detection of citrate-fermenting Streptococcus lactis subsp diacetylactis”, J. Appl. Environ. Microbiol. 39pp. 956- 927
- KIHAL M., PREVOST H., LHOTTE M.E., HUANG D.Q. et DIVIES C. 1996. Instability of plasmid-encoded citrate permease in leuconostoc .J.Appl.Microbiol,22,219-223
- Klaenhammer T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12(1-3): 39-85.
- Klaenhammer, T. R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev.12: 39-85.
- Klein G. 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. Int. J Food Microbiol 88 123-131.
- Kommineni S, Bretl DJ, Lam V, Chakraborty R, Hayward M, Simpson P, Cao Y, Bousounis P, Kristich CJ, Salzman NH. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. Nature. 2015;526:719–722.

L

- Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M., Ouhssine M., 2005. Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 144: 237-250
- Lancaster L. E., Wintermeyer W., Rodnina M. V. (2007). Colicins and their potential in cancer treatment. Blood Cells Mol. Dis. 38, 15–18
- Larpent J-P., 1996a. Les bactéries lactiques In Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires. Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 4-33.
- Laurent, S. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Poly technica Paris. 307 pages
- Leal-Sanchez M.V. et al., 2002. Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *L. plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4465-4471.
- Leisner JJ, Greer GG. Stiles ME (1996). Control of beef spoilage by a sulfide-producing *Lactobacillus sake* strain with bacteriocinogenic *Leuconostoc gelidium*

UAL187 during anaerobic storage at 2 degrees C. Appl Environ Microbiol, 62 2610-2614.

- Leveau J-Y., BouixMrielle, De Roissart H., 1991. La flore lactique **In** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Bourgeois C.M., Leveau J- Y. *Tec & Doc*, Lavoisier, pp: 152-186
- Levine, W.C, Buehler, J.W., Bean, N.H. et Tauxe, R.V. 1991. Epidemiology of non-typhoidal salmonella bacteremia during the human immunodeficiency virus epidemic. *Journal of Infectious Diseases*, 164: 81-87
- Leyral G et Vierling É. 2007. Microbiologie et toxicologie des aliments: Hygiène et sécurité alimentaires. Wolters Kluwer France. p. 287.
- LONVAUD-F, RENAUF-V, STREHAIANO-P, 2010, Microbiologie du vin : bases fondamentales et applications, 1^{ère} édition, France, p138

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)
- Makhloufi M., Rebuffat S., Drider D. 2011. Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du Boza. Thèse Doctorat. Université Pierre et Marie CURIE UPMC. Paris. France.
- Mataragas M., Drosinos E.H., Tsakalidou E. & Metaxopoulos J., 2004. Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *L. curvatus* L442. *Antonie van Leeuwenhoek*, **85**, 191-198.
- Mathara J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K., Holzapfel W.H. 2004. Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kulenaoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 3, 269- 278.
- Mayeux, J.V., Sandine, W.E., Elliker, P.R. 1962. A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Science*, 45: 655-656
- McAuliffe O., Ros R.P., Hill C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 285-308
- Moll. G. N; Konings. W. N; Driessen. J. M. (1999) .Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation .*Antonie Van Leeuwenhoek* 76: p 182
- MOZZI F., RAYA R. R., VIGNOLO G.M. (2010). Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Blackwell publishing. Singapore. p 3-73

N

- Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., and Holo, H. (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*.70: 113-128.
- Nissen-Mayer J., Holo H., Håvarstein L.S., Sletten K., Nes LF. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174: 5686-5692

O

- Orla. Jensen.S ; (1919): In, The lactic acid bacteria copenhagan; commission HOSEJNAR MUNKS GOAND.

P

- Parente E., Moles M., Ricciardi A. 1996. Leucocin F10, a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*. *International Journal of Food Microbiology*. 33, 2-3, 231-43.
- Parente E. & Ricciardi A., 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 628-638.
- Penaud S. (2006). Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* ATTC11842. Thèse de doctorat d'état. Institut National Agronomique De-Paris-Grignon. pp267
- Penner (2005). Probiotics and nutraceuticals: no medicinal treatments of gastrointestinal diseases. In Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat 2012
- Piard, J. C, P. M. Muriana, M. J. Desmazeaud et T. R. Klaenhammer. (1992), Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.* 5 279-284.
- Pot B, Devriese LA, Ursi D, Vandamme P, Haesebrouck F. Kersters K (1996). Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Syst. Appl. Microbiol.*, 19: 213-222.
- Prescott C.E., Hope G.D. et Blevins L.L. 2003. Identification of newly isolated lactobacilli from stomach mucus of lamb. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*. 55: 64-72

R

- Radomir L ,2009, Food Quality And Standards - Volume III, Eolss publishers united kingdom p72-73
- RENOUF V ,(2013), La fermentation malolactique dans les vins : Mécanismes et applications pratiques, 1^{ère} édition ,Editions TEC et DOC lavoisier France.paris,p234
- Ried (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.
- ROBYT J.F., WALSETH T.F., 1978. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F dextransucrase. *Carbohydr. Res.*, 61, 433-445.
- Ross R.P, Morgan S., Hill C. 2002. Preservation and fermentation: past present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 3-16.
- Ryan M.P., Jack R.W., Josten M., Sahl H.G, Jung G., Ross R.P.HC 1999. Extensive-translational modification, including a serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lacticin 3147. *J Biol. Chem.* 247: 37544-37550

S

- Sahl H.-G., Bierbaum G. 1998. Lantibiotics : biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 41-79
- Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E., Prevost H. et Kihal M. 2002. Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait de chèvre des régions arides. *JAlg Reg. Arides.* 1: 1-1
- SALMINEN S., WRIGHT A. V., OUWEHAND A. (2004). Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.
- Sampo L, Arthur C. Ouwehand, Seppo S, Atte von W,(2012), Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition,usa,p123
- Savijoki K., Ingmer H. & Varmanen P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 394-406.
- Schillinger U. et Lücke F.K. 1987. Identification of Lactobacilli from meat and meat products *J. Food Microbiol.* 4: 199-208
- Schillinger U., Lücke K. 1989. Antimicrobial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.
- Schillinger U., Geisen R. Holzappel W.H. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 158-164.
- Schleifer KH. Stackebrandt E (1983). Molecular systematics of prokaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37: 143-187
- Siegumfeldt H., Rechinger K.B. et 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
- Sodini I. Remeuf F. Haddad S. Corrieu G (2004). The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 113-137
- Sperber, SJ. et Schlepner, CJ. 1987. Salmonellosis during infection with human immunodeficiency virus. *Review of Infectious Diseases*, 9: 925-934.
- Stiles M.E. & Holzappel W., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, **36**(1), 1-29

T

- Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W., 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria, *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756
- Tagg JR, Mc Given AR (1971) Assay system for bacteriocins. *Journal of Applied Microbiology* 21: 943
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., and Wannamaker, L. W. (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev.* 40: 722-756.
- TAILLIEZ P.(2001). Le lait ,81 : 1-11 Parada, V., G. J. Herndl, and M. G. Weinbauer. (2007). Viral burst size of heterotrophic 8 prokaryotes in aquatic systems. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 86:613-621.
- TANNOCK, G.W., 2004. A special fondness for lactobacilli. *Applied Environ. Microbiol.* 70: 3189-3194
- Teuber Michael, Geis Arnold, 2006. The Genus *Lactococcus*. *Prokaryotes* 4: 205-228

- Thomas D. 1973. Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the other bacteria. *N. Z. J. Dairy. Sci. Technol.* 8: 70-71
- Todorov S.D. & Dicks L.M., 2004. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *J. Basic Microbiol.*, **44**, 305-316.

V

- V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M., (2008). Métabolisme et ingénierie métabolique. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 271-447
- Van Belkum MJ., Stiles M.E. 2000. Nonantibiotic antibacterial peptide from lactic acid bacteria. *Nat Prod Rep* 4: 323-335
- van Heel A. J., Montalban-Lopez M., Kuipers O. P. (2011). Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7, 675–680
- Vazquez-Boland, C., Meyrand, A., Mazuy, C., Delignette-Muller, M.L., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C. And richard, Y. (1998). Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats' milk lacticcheeses. *Journal of DairyResearch* 65, 273-281
- Verluyten J., Leroy F. & De Vuyst L., 2004. Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5081-5088.

W

- Williams&Wilkins, Baltimore. Johansson, P, L. Paulin, E. Vihavainen, N. Salovuori, A. Edward, K. J. Björkroth and P. Auvinen. 2011. Genome sequence of a food spoilage lactic acid bacterium *Leuconostocgasicomiatum* LMG 18811 in association with specific spoilage reactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 4344-4351

Y

- Yang E., Fan L., Jiang Y., Doucette C., Fillmore S. (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Exp.* 2, 48

Z

- Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J. et De Vuyst, L., (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: p 487–495.
- ZarourK.(2010). Contribution à l'étude microbiologique et technologiques des espèces *Leuconostocmesenteroides* isolées de différents écosystèmes. Mémoire pour l'obtention de Magister. Université d'Oran. Algérie. Page56
- zourari A., Roger S., Chabanet C., Desmazeaud M, 1991. Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. Souches de *Streptococcus salivariussubsp. thermophilus*. *Lait*, 71:445-461

ANNEXES

Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure.....	5g
Glucose	20g
Tween 80.....	1 ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate de sodium	2g
Sulfate de magnésium	0.2g
Sulfate de manganèse	0.05g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 6.5.	
Autoclavage 120°C, 20 min	

Milieu MRS-BCP Sans Extrait De Viande et Glucose

Extrait de levure.....	5 g
Extrait de viande	10 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium.....	5 g
Citrate de sodium	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,25 g
MnSO ₄	0,05 g
Pourpre de bromocrésol.....	0,025 mg
Eau distillée	1000 ml
pH =6,8	
Autoclavage 120°C, 20 min	

Milieu M16 BCP (Thomas, 1973)

Extrait de levure	2,5 g
Extrait de viande.....	5 g
Lactose	2 g
Biopolytone.....	5 g
Peptone papaïnique de soja	5 g
Acide ascorbique	0,5 g
Acétate de sodium	1,8 g
L-Arginine	4 g
Pourpre de bromocrésol	0,05 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH.....	
Autoclavage 120°C, 20 min	

Milieu chapman

Peptone	10g
Extrait de viande	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g
Rouge de phenol	0.025g
Agar	15g
pH	7.4
Autoclave 120° C, 20min	

Bouillon nutritif :

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

Milieu Mueller-Hinton (Mueller et Hinton, 1941)

Infusion de viande de bœuf	3000 cm ³
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar-agar	17 g
pH=7.4	
Autoclavage 120°C, 20 min	

Milieu King A :

Peptone dite « A »	20 g
Glycerol.....	10 g
Sulfate de potassium anhydre	10 g
Chlorure de magnésium anhydre.....	1,4g
Agar	15 g
Eau distillée (qsp)1000 mL	
Ph = 7.4	

Milieu BCP :

Peptone	5 g
Extrait de viande.....	3g
Lactose.....	10g
Agar.....	15g
Pourpre de bromocrésol.....	0.025g
Eau disstillée(qsp) 1000m L	
pH=7	

Gélose de Sabouraud

Peptone.....	10g
Glucose	20g
Agar.....	15g
Eau disstillée(qsp) 1000m L	
pH=7	

Milieu MSE

Tryptone	10,0g
Gélatine	2,5g.
Extrait autolytique de levure.....	5,0g
Saccharose.....	100,0g.
Glucose	5,0g
Sodium citrate	1,0g.
Azide de sodium	0,075g.
Agar agar	15,0g.
Eau disstillée(qsp) 1000m L	
pH=6.9	

Bouillon Clark et Lubs

peptone	5g
glucose.....	5g
hydrogénophosphate	5g
eau distillé 1000mL	
ph=7.5	

Eau physiologique

Chlorure de sodium	8,5 g
PEPTONE	0,5 g
EAU DISTILLEE 1000 ml	
pH =7	
AUTOCLAVAGE : 120° C PENDANT 20 MINUTE	

Lait de Sherman au bleu de méthylène :**Lait de Sherman à 0,1% :**

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

Lait de Sherman à 0,3% :

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

Bleu de méthylène :

Peptone	10 g
Lactose	10 g
Éosine	0,4 g
Bleu de méthylène	0,0625g
Hydrogénophosphate de potassium	2 g
pH = 6,8	