



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MASTÈRE

Spécialité: EXPLOITATION DES ÉCOSYSTÈMES MICROBIENS LAITIERS

THÈME

Interactions des bactéries lactiques vis-à-vis à des bactéries pathogènes

.Belaidouni Nouria Wahida

Soutenu le **04/07/2017**

DEVANT LE JURY

Président	MELLE. DALACHE FATIHA	Professeur de l'université de Mostaganem
Examineur	MME.BEN MEHDI FAIZA	Maitre de conférence à l'université de Mostaganem
Encadreur	MME .TAHLAITI HAFIDA	Maitre Assistante A à l'université de Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire des Sciences Techniques de Production Animale

Année universitaire :2016-2017

Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant, le Miséricordieux, de m'avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance.

Je remercie ma promotrice Madame TahlaitiHafida ,Maître assistante classe A à l'université IBEN BADIS « ITA » Mostaganem , pour l'honneur qu'elle m' a fait en dirigeant ce travail, pour ses aides, ses conseils, tout au long de l'élaboration de ce modeste travail

A Mme Dalache Fatiha professeur à l'université de Mostaganem, je m' adresse mes remerciements les plus sincères pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce jury.

A M. benmehdiFaiza,maitre de conférenceà l'université de Mostaganem Qui m'a fait l'honneur et un grand plaisir de bien vouloir accepter de juger ce travail.

*Au personnel delaboratoire pédagogique « LSTPA », surtout
Dr.Nemiche.*

Enfin, je remercie, tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace :

Je dédie ce travail à :

En hommage de mes très chers grands parents **Boumediene** et **Saadia** *vous étiez un pilier solide et incontournable pour moi durant mon parcours, ma chandelle de la nuit et le soleil de mon jour que Dieu vous accueille dans son vaste paradis que vous reposiez en paix .*

*Ma mère **Fatima** et mon père **Sid Ahmed** Que ce travail soit pour vous le témoignage de mon infinie reconnaissance pour votre aide précieuse dans toutes ces années de compréhension*

*A mon beau père **Ben Abedllah** et ma belle mère **Fatiha** je vous remercie pour votre aide et votre encouragement*

*Mon cher mari **Ould Si Bouziane Oussama** Pour tes sacrifices et ton soutien moral et ta compréhension tu es mon épaule solide et la source de mon bonheur que dieu te garde pour moi .*

- ❖ *A mes très chères tantes et oncles,*
- ❖ *A Mes frères, et mes très chers beaux frères*
 - ❖ *A mes cousines et cousins.*
- ❖ *A tous les collègues de ma promotion.*

"C'est dans l'effort que l'on trouve la satisfaction et non dans la réussite. Un plein effort est une pleine victoire."

Résumé

Les bactéries lactiques font naturellement partie de notre environnement et de notre alimentation. On reconnaît depuis longtemps, que les bactéries lactiques ont la propriété de produire des substances antimicrobiennes et sont utilisées dans la fermentation et la bio-préservation des aliments.

La recherche de souches bactériennes lactiques productrices des substances antimicrobiennes a été entreprise à partir du blé fermenté « Hamoum ».

Nos souches BL₈ et M₆ ont été testé pour leur effet antibactérien à l'encontre de trois bactéries pathogènes : *staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa* et *E.coli*.

L'effet inhibiteur est mis en évidence par la méthode directe appelée méthode de Fleming (1975) qui permet de détecter tous les types d'interactions, et qui a permis d'observer les taux d'inhibition ainsi que la détermination de la nature de l'agent inhibiteur.

La méthode de Fleming et al (1975) a permis de déduire que les deux souches sont productrices des bactériocines.

La résistance aux antibiotiques et le pouvoir acidifiant ont donné des résultats qui ont permis de classer nos deux souches dans la catégorie des bactéries moyennement acidifiante ainsi la sensibilité au /à quelque antibiotique.

Mot clés : bactéries lactiques, bactéries pathogènes, interactions, *Pseudomonas aeruginosa* , *Staphylococcus aureus*, *E.coli*.

Sommaire

Résumé

Summary

Nomenclature des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Première Partie : synthèse bibliographique

Chapitre I : les bactéries lactiques

I.1-présentation des bactéries lactiques	1
I.2. Habitat et origine des bactéries lactique	1
I.3. Taxonomie des bactéries lactiques	1
I.4.classification des bactéries lactiques	1
I.5.Voies métaboliques	2
I.6.Intérêt des bactéries lactiques	2
I.6.1.Dans l'industrie alimentaire	3
I.6.2.Dans le domaine thérapeutique :	3
I.7.Les facteurs antimicrobiens des bactéries lactiques	3
I.7.1.Les acides organiques	4
I.7.2.Acides gras	4
I.7.3.Peroxyde d'hydrogène	4
I.7.4. Le diacétyl	4
I.7.5.La production d'antibiotique	5
I.7.6.Le dioxyde de carbone	5
I.7.7.Phages lactiques	5
I.7.8.Bactériocines	5
I.7.8.1.Définition des bactériocines	5

I.7.8.2. Caractérisations des bactériocines	6
I.7.8.3. Classification	6
I.7.8.4. Mode d'action	7
I.7.8.5. Production et le conditionnement des bactériocines	8
I.7.8.6. Applications des bactériocines	8
Dans l'industrie alimentaire	
Domaines de la médecine humaine	
I.8. propriétés technologiques des bactéries lactiques	9
I.8.1. aptitude acidifiante	9
I.8.2. Aptitude protéolytique	10
I.8.3. Aptitude lipolytique	10
I.8.4. Aptitude aromatisante	10
I.8.5. Aptitude texturante	10
I.8.6. Activité antimicrobienne	10
Chapitre II : les interactions	
II.1-Interactions entre micro-organismes	13
Interactions positives	
Interactions négatives	
II.2.L'effet des bactéries lactiques sur la flore d'altération des aliments	13
Chapitre III : les bactéries pathogènes	
III. Bactéries pathogènes	16
III.1 - <i>Escherichia coli</i>	16
III.2- <i>Staphylococcus aureus</i>	17
III.3- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
Deuxième Parties : Etude expérimentale	
Chapitre I: matériel et méthodes	
I.1.les souches utilisées :	20

I.1.1.souches lactiques	20
I.1.1.Souches pathogènes	20
I.2.Méthodologie	20
I.2.1.Purification et conservation des souches	20
I.3.Identification des isolats	21
I.3.1.Critères morphologiques	21
I.3.1.1.Caractérisation macroscopique	21
I.3.1.2. Caractérisation microscopique	21
I.4.Critère biochimiques	21
I.4.1. Test de catalase	21
I.5.Conservation des souches	21
I.6.étude de l'activité antimicrobienne des souches	22
I.6.1.La méthode de Fleming et al (1975)	22
I.7.Détermination du facteur d'inhibition	23
I.7.1.Inhibition due à la présence de substance protéique	23
I.7.1.1.Effet des enzymes	23
I.7.1.2.Stabilité thermiques	25
I.7.2.Inhibition due à la présence de phage lysogène	26
I.8. Aptitude technologiques des bactéries lactique	26
I.8.1.Pouvoir acidifiant	26
I.9.Résistance aux antibiotiques des bactéries lactiques	27

Chapitre II : Résultat et discussion

II.1.vérification de la pureté des souches	29
II.1.1.L'observation macroscopique	29
II.2.Activité antibactérienne des souches	30
II.2.1.la méthodes de Fleming et al (1975)	30

II.3. Identification de la nature de l'agent antibactérien	33
II.3.1. Effet des enzymes protéolytiques	33
II.3.2. L'inhibition due au traitement thermique	34
II.3.3. L'inhibition due au bactériophage	34
II.4. Pouvoir acidifiant	35
II.5. AntibioGramme des bactéries lactique	37
Conclusion et perspectives	40
Annexe	
Références bibliographique	

Nomenclature des abréviations

BP : Bactéries Pathogènes

°C : Degrés Celsius

°D : Degrés Dornic

DO : Densité Optique

Min : Minute

MRS: Man, Rogosa et Sharpe.

MRS_b: Man,Rogosa et Sharpe bouillon

MRS_t:Man,Rogosa et Sharpe tampon

NaCl : Chlorure De Sodium

pH : Potentiel D'hydrogène

S : Souches

VRBL : VIOLET RED BILE LACTOSE

μL : Microlitre.

Liste des tableaux :

Tableau01: Les souches lactiques utilisées

Tableau02: Les souches pathogènes utilisées

Tableau03 : Critères morphologiques, la coloration Gram et le test de la catalase des deux souches

Tableau 04: Critères morphologiques, la coloration Gram et le test de la catalase des souches pathogènes

Tableau 05: Résultats obtenu par la méthode de fleming et al (1975)

Tableau 06: Activité antagoniste des enzymes des bactéries lactiques sur les bactéries pathogènes

Tableau 07 : Evolution de l'acidité et du pH en fonction du temps

Tableau 08: Antibiogramme des souches lactiques.

Liste des figures

Figure 1: Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques (Cotter et al., 2005).

Figure 2: *E. coli* observés au microscope électronique (Ducluzeau, 2006)

Figure 3 : Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique. (<http://www.museevirtuel.ca>)

Figure 4: *P. aeruginosa* en microscopie électronique (<http://www-dsv.cea.fr/dsv/la-dsv/toute-l-actualite/en-direct-des-labos/une-nouvelle-ciblepour-les-antibiotiques>)

Figure 5: Protocole d'action protéase

Figure 6 : Observation microscopique des souches lactiques après la coloration de Gram (Gx100)

Figure 6 : Observation microscopique des souches lactiques après la coloration de Gram (Gx100)

Figure 8: Effet d'activité antagoniste des bactéries lactique contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Figure 9: Effet d'activité antagoniste des bactéries lactique contre *E.coli*.

Figure 10: Effet d'activité antagoniste des bactéries lactique contre *Staphylococcus aureus*.

Figure 11: Effet des enzymes sur les bactéries lactique vis-à-vis aux bactéries pathogènes

Figure12: Test de phage est négative (absence de phage)

Figure13 : Evolution d'acidité des souches BL₈ et M₆ en fonction du temps.

Figure14 : Evolution du pH des souches M₆ et BL₈ en fonction du temps.

Introduction général

Introduction Générale

Depuis des millénaires, les aliments fermentés font partie du menu des hommes, qui apprécient leurs propriétés gustatives et sanitaires et leur longue durée de conservation.

Les bactéries lactiques sont des microorganismes très répandues dans la nature, on les trouve dans le sol, sur les végétaux. Ils sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire, en tant que starters dans les procédés de fermentations afin de répondre aux exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités et exempts de conservateurs chimiques. Leur apports bénéfiques consistent à l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans altérer le goût ni l'odeur, et en augmentant leur durée de conservation. Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reuterine, le diacétyl et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009; Moraes et al., 2010).

L'intérêt des bactériocines des bactéries lactiques réside d'une part dans leur effet antimicrobien à spectre large ou étroit et d'autre part dans leur sûreté pour la santé humaine, vue leur sensibilité aux protéases digestives, et leur non toxicité pour les cellules eucaryotes.

Ces substances antimicrobiennes ont la capacité de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou altérantes.

Les bactéries pathogènes sont à l'origine de diverses pathologies et intoxication alimentaire, c'est pourquoi les antibiotiques ont été utilisés pour les éliminer. Ceci a conduit à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance menaçant la santé publique. Pour faire face à ce problème les études sont actuellement orientées vers la recherche de substances naturelles entre autres les bactériocines des bactéries lactiques.

Dans ce contexte ce travail consiste à rechercher l'activité antagoniste des souches BL₈ et M₆ appartenant au genre *Lactobacillus* vis à vis des bactéries pathogènes en suivant les étapes suivantes :

- ✓ Recherche de l'effet antagoniste des souches BL₈ et M₆ vis-à-vis aux trois bactéries pathogènes.
- ✓ Détermination de la nature du facteur inhibiteur : acide ou bactériocines ou bien du au phage.
- ✓ Etude des aptitudes technologiques (pouvoir acidifiant et le pH) des souches BL₈ et M₆, et leurs résistances aux antibiotiques.

Première partie : synthèse bibliographique

Chapitre I :

les bactéries lactiques

Chapitre I : les bactéries lactiques

I.1-présentation des bactéries lactiques :

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres. La fermentation est dite : homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO₂ ...etc.) (Leveau et Bouix, 1993 ; Pilet et al., 2005).

Elles sont à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négatives, oxydase négatives généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et al., 1994 ; Hogg, 2005).

I.2. Habitat et origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux ou des alimentsensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Leveau et Bouix, 1993 ; Hassan et Frank, 2001).

I.3. Taxonomie des bactéries lactiques :

Depuis la description du *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot, 2008).

I.4.classification des bactéries lactiques :

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique /biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes.

Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétoïne et synthétiser certaines enzymes.

La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent

Chapitre I : les bactéries lactiques

être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (Vandamme, 1996 ; Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho et al., 2007).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classifier les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins et al., 1993 ; Ho et al., 2007).

I.5. Voies métaboliques :

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

I.6. Intérêt des bactéries lactiques

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

Chapitre I : les bactéries lactiques

I.6.1. Dans l'industrie alimentaire :

- rôle sur la structure et la texture :

Se sont les laits fermentés, l'acidification provoque la formation d'un caillé +ou- ferme selon les bactéries lactiques présentes. Selon les produits, la texture recherchées est ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé ; kéfir). Pour obtenir une consistance déterminée ; l'utilisation des souches plus ou moins acidifiantes peut être couplée à celle des souches productrices de polysaccharides. (Satura et Federighi., 1998).

- rôle dans la conservation :

*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.

- rôle sur les caractéristiques organoleptiques :

par production en dehors de l'acide lactique, d'autres produits tels que le diacétyl et l'acétaldéhyde, qui responsable des saveurs caractéristiques. (Boudjema., 2008) .

I.6.2. Dans le domaine thérapeutique :

Différents bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem *et al.*, 2008).

Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (Mkrtchyan *et al.*, 2010).

D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish *et al.*, 2011).

Certains souche comme les *Lactobacillus crispatus* ont démontré la capacité et utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie (Uehara *et al.*, 2006).

I.7. Les facteurs antimicrobiens des bactéries lactiques :

On reconnait depuis longtemps, aux bactéries lactiques, la propriété de produire des substances antibactériennes leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due aux métabolites excrétés : l'acide lactique et autre acides organiques, peroxyde d'hydrogène, Le dioxyde de carbone, Le diacétyl, La reutéline et les bactériocines (Leveau *Et Al.* 1991 ; De Vuyst Et Leroy, 2007).

I.7.1. Les acides organiques

Il est excrété par les bactéries lactiques assurant deux importantes fonctions antimicrobiennes. Sous leur forme indissociée, ils traversent passivement la membrane cytoplasmique et pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel que les

Chapitre I : les bactéries lactiques

fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire annulé (Kaset, 1987 ; Klaenhammer Et Al, 1994).

La fermentation par les BL est caractérisée par l'accumulation d'acides organiques qui s'accompagne d'une réduction du pH (Gould, 1991 Et Podolak Et Al., 1996).

Les niveaux et les types d'acides organiques produits pendant les fermentations dépendent de l'espèce, de la composition du milieu et des conditions de croissance (Lindgren Et Dobrogosz, 1990).

Le pH bas externe cause l'acidification du cytoplasme des cellules, alors que l'acide non dissocié étant lipophile, peut se répandre passivement à travers la membrane (Kashke, 1987).

L'acide non dissocié agit en effondrant le gradient électrochimique de proton, ou en changeant la perméabilité de la membrane des cellules (Smulders Et Al., 1986 Et Earnshaw, 1992).

I.7.2.Acides gras :

Dans certaines conditions, quelques lactobacilles et lactocoques possédant des activités lipolytiques peuvent produire des quantités significatives d'acides gras, par exemple dans la fermentation du lait fermenté (Rao Et Al., 1984) et des saucisses sèches (Sanz et al., 1988).

L'activité antimicrobienne des acides gras a été identifiée pendant plusieurs années. Les acides gras insaturés présentent une activité contre les bactéries à Gram+, et l'activité antifongique des acides gras dépend de la composition, de la concentration, et du pH du milieu (Gould, 1991).

I.7.3.Peroxyde d'hydrogène :

Les bactéries lactiques sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène (Van de Guchte et al, 2001).

Cette molécule neutre diffuse librement à travers la membrane cellulaire; elle est peu réactive vis-à-vis des composants cellulaires. Ces deux produits sont des molécules très délétères pour la cellule réagissant sur de nombreux composants cellulaires essentiels tels que l'ADN, les protéines et les lipides ce qui entraîne la mort de la cellule. Le peroxyde d'hydrogène possède donc un effet inhibiteur sur la croissance de micro-organismes ne possédant aucun système de défense adéquat comme les catalases (Touati, 2000).

I.7.4. Le diacétyl :

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus sp.* et *Pediococcus sp.* Le diacétyl (C₄H₆O₂) est un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont

Chapitre I : les bactéries lactiques

dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif non lactiques, ces dernières y sont néanmoins moins sensibles (El Ziney et *al*, 1998).

I.7.5. La production d'antibiotique :

La reutéine (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium* (El-Ziney et *al*, 1998).

La fermentation du glycérol se déroule en deux étapes. Le glycérol sera tout d'abord déshydraté par une « glycérol deshydratase » pour former de la reutéine qui sera ensuite réduite en 1,3-propanediol par une oxydoréductase. Cette deuxième étape est inhibée en l'absence de glucose. La reutéine s'accumule alors dans le microorganisme producteur.

A haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* y sont plus résistantes (Vollenweider, 2004).

I.7.6. Le dioxyde de carbone :

Intermédiaire de fermentation de certains substrats par les bactéries lactiques hétérofermentaires, le CO₂ crée des conditions anaérobies dans le milieu, pouvant conduire à l'élimination de bactéries aérobies strictes. Ceci peut en revanche aussi favoriser dans le même temps le développement de flores anaérobies qui peuvent être parfois néfastes (Papa Abdoulaye, 2011).

I.7.7. Phages lactiques :

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

I.7.8. Bactériocines

I.7.8.1. Définition des bactériocines

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle de Klaenhammer (1988) qui définit les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de

Chapitre I : les bactéries lactiques

leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988).

Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram+. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram- n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram- ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Smulders *Et Al.*, 1986 Et Earnshaw, 1992).

I.7.8.2. Caractérisations des bactériocines

Dans leur grande majorité, les bactériocines peptidiques de bactéries lactiques sont

- Thermorésistantes (120°C pendant 10 minutes),
- Stables dans des zones de pH de 3 à 8
- Sensibles à l'action d'enzymes protéolytiques (présentes dans le tractus intestinal).
- Elles ont des sites de liaisons spécifiques dans la membrane des bactéries cibles.
- Leur synthèse est associée à la synthèse d'une protéine d'immunité qui évite de provoquer la mort de la cellule excrétrice.
- Elles ont un spectre d'activité étroit. (Drider, 2006)
- Ne présentent pas de nocivité apparente pour l'homme et les animaux domestiques, ce qui implique une utilisation potentielle dans les domaines agroalimentaire et thérapeutique (Morisset, 2003)
- N'ont pas d'effet négatif sur la qualité organoleptique du produit.
- Représentent un intérêt dans la conservation des denrées alimentaires par leur capacité à réguler la microflore existant dans les produits fermentés et inhibent la croissance des germes pathogènes (Dortu et Thonart, 2009).

I.7.8.3. Classification:

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993). Selon leur structure primaire, poids moléculaire, stabilité à la chaleur. Ces quatre classes sont:

* Classe 1: Les lantibiotiques

Se sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traditionnellement, comme la lanthionine, la f3-méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine.

Les lantibiotiques peuvent être divisés en deux types:

-la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés

-la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (Twomey *et al.*, 2002).

*Classe II: Bactériocines peptidiques:

Se sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas

Chapitre I : les bactéries lactiques

d'acides aminés modifiés. Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10. Cette dernière est subdivisée en trois sous-classes.

- *La sous-classe IIa*. Ces bactériocines contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Richard *et al.*, 2006). Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*.

-*La sous-classe IIb*. Elle comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe lib peuvent être distingués:

- le type E (*Enhancing*) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre.
- le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires.

La sous-classe IIc. Toutes les autres bactériocines de classe II ne pouvant pas être classées dans les sous-classes a et b. (Carne et Thonart, 2009)

***Classe III: Bactériocines protéiques**

Se sont des protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques (Nigutova *et al.* 2007).

***Classe IV: Bactériocines complexes**

Se sont des peptides requérant une partie carbo-hydratée ou lipidique pour avoir une activité. (Carne et Thonart, 2009). Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite.

I.7.8.4.Mode d'action

Bien que toutes les bactériocines partagent le même site d'action qui est la membrane cytoplasmique, leur mode d'action semble être différent (Dortu et Thonart, 2009):

Les lantibiotiques tel que la nisine, portant une structure cationique et amphiphile allongée, interagissent avec la membrane des cellules cibles soit en se liant au lipide II (un précurseur de peptidoglycanes) empêchant ainsi la synthèse de la paroi cellulaire conduisant à la mort de la cellule, soit en utilisant ce lipide comme une molécule d'appui pour s'insérer dans la membrane et y former des pores causant la destruction de la cellule suite à la dissipation du potentiel membranaire et l'efflux des petites molécules (ions, ATP, acides aminés, etc). La mersacidine tue la cellule en interférant avec ses réactions enzymatiques comme la synthèse de la paroi (Gillor *et al.*, 2008 ; Dortu et Thonart, 2009).

L'insertion des bactériocines de la classe II dans la membrane est conférée par la structure α -hélice amphiphile, cette insertion induit la perméabilisation de la membrane et par conséquent la mort cellulaire suite à l'écoulement des molécules à faible poids moléculaire.

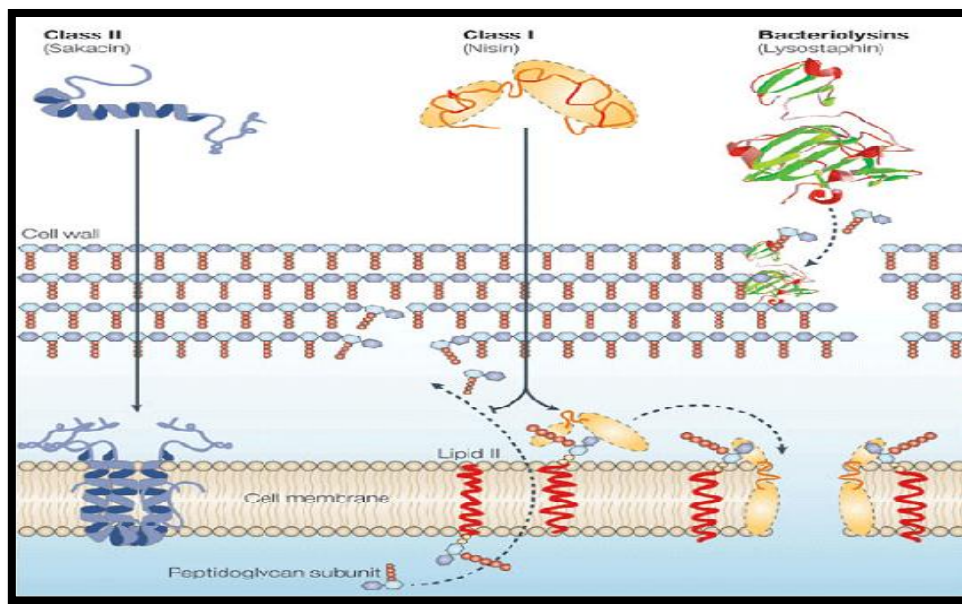


Figure 01: Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques (Cotter et al., 2005).

I.7.8.5. Production et le conditionnement des bactériocines

Les bactériocines sont généralement 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)

Les conditions de culture influencent fortement la production de bactériocines. En effet, l'optimisation de la croissance ne résulte pas nécessairement en l'optimisation de la production de bactériocines. Il a même été suggéré que des conditions de croissance défavorables permettent de stimuler leur production.

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. La purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en oeuvre de nombreuses techniques, à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle.

I.7.8.6. Applications des bactériocines :

❖ dans l'industrie alimentaire :

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (Wijaya Et Al., 2006).

Chapitre I : les bactéries lactiques

Du fait qu'elles sont des substances naturelles, l'emploi des bactériocines permettait d'avoir des produits plus sains et réduirait l'utilisation des agents chimiques de conservation (Galvarez *Et Al.*, 2007).

Ces dernières années, l'application des bactériocines dans la technologie a gagné une grande attention. En effet, plusieurs bactériocines montrent des effets synergiques ou additionnels lorsqu'elles sont utilisées en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens, incluant des conservateurs chimiques, des composés phénoliques naturels (Grande *Et Ai.*, 2007).

❖ Domaines de la médecine humaine:

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

Les bactériocines ont été énormément appréciées comme étant des agents de thérapie naturelle, alternative aux antibiotiques, puisque l'effet inhibiteur des bactériocines pourrait réduire les effets nocifs engendrés par l'antibiothérapie.

Un lantibiotique est utilisé dans la thérapie pour remplacer l'usage habituel de l'érythromycine et de la vitamine A. Cette application montre plusieurs avantages tels que l'absence de résistance aux lantibiotiques. (Smaoui, 2010)

Trois bactériocines produites par *Laciobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei* et *Laaohacillus amylovorus* montrent une activité inhibitrice contre l'agent pathogène gastrique humain *Helicohaclerpylori* qui cause des ulcères gastriques. (Monts et De Vuyst, 2001).

I.8. propriétés technologiques des bactéries lactiques :

I.8.1. aptitude acidifiante :

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (Mäyrä- Mäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet et al., 2008).

Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi par (Béal et al., 2008) :

- Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés ;
- Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires ;
- Limitation des risques de développement des flores pathogène et d'altération dans les produits finaux ;
- Déstabilisation des micelles de caséines, coagulation des laits et participation à la synérèse.

Pour un ferment donné, il s'agit de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Le niveau d'acidité dépend des spécifications du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches (Monnet et al., 2008).

I.8.2. Aptitude protéolytique :

La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous

Chapitre I : les bactéries lactiques

les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines. Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (Donkor et al., 2007 ; Monnet et al., 2008 ; Roudj et al., 2009).

I.8.3. Aptitude lipolytique :

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Béal et al., 2008). D'une manière générale on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C8), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (Béal et al., 2008 ; Serhan et al., 2009).

I.8.4. Aptitude aromatisante :

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'a-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyle, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (Bourgeois et Larpent, 1996 ; Gerrit et al., 2005 ; Cholet, 2006).

I.8.5. Aptitude texturante :

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. Les *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis. L'utilisation des EPS produits par les souches *Lc. lactis* ssp. *cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho et al., 2007).

I.8.6. Activité antimicrobienne :

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la bioconservation des aliments (Labioui et al., 2005). Les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries.

Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes. Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire. Son

Chapitre I : les bactéries lactiques

accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui s'avère toxique pour certains microorganismes aérobies présents dans l'aliment.

Le diacétyl peut inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, des levures et moisissures (Alakomi et al., 2000 ; Ammor et al., 2006).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice et leur spectre d'action est généralement étroit. Les plus connues sont : la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane (Ogunbanwo et al., 2003 ; Dortu et Thonart, 2009).

La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (De Vuyst et Leroy, 2007 ; Kumari et al., 2009).

Chapitre II :

Les interactions

Chapitre II: Les interactions

II.1-Interactions entre micro-organismes

Les interactions constituent un ensemble complexe de phénomènes biologiques hétérogènes dont la classification s'avère nécessaire. Leurs effets ont été observés bien avant que leur mécanismes aient pu être expliqués

Dans la pratique industrielle, les bactéries lactiques sont très souvent associées, soit entre elles, soit avec d'autres microorganismes (bactéries non lactiques, levures ou moisissures) formant des cultures mixtes où différents types d'interactions peuvent se produire. L'ensemble de ces interactions gouverne la structure des communautés microbiennes et leurs activités. On les classe en deux catégories : les interactions positives qui se caractérisent par la stimulation d'un ou de plusieurs micro-organismes et les interactions négatives qui correspondent à une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique (Cholet, 2006 ; Monnet *et al.* 2008).

1. Interactions positives

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

2. Interactions négatives

Il existe divers mécanismes d'inhibition des micro-organismes entre eux. Si l'inhibition intervient par la production de substances inhibitrices et si un seul des deux micro-organismes est inhibé par l'autre, il convient de parler d'amensalisme. En revanche, si les mécanismes d'inhibition sont réciproques, il s'agit alors d'un phénomène de compétition. Cette compétition peut s'exercer vis-à-vis de l'espace disponible (inhibition de contact) et/ou de la disponibilité en substrats. L'antagonisme désigne une lutte réciproque des deux populations par la production de molécules inhibitrice, généralement spécifiques (Cholet, 2006 ; Monnet *Et Al.*, 2008).

II.2.L'effet des bactéries lactiques sur la flore d'altération des aliments

Le lait obtenu par la traite aseptique n'est pas stérile .après la traite, il contient 10^3 à 5.10^3 microorganismes par millilitre, essentiellement des lactobacilles et des streptocoque lactique commensaux du pis et des canaux galactophore (flore original du lait) .le lait peut être contaminé par divers microorganismes de l'environnement : Entérobactéries, Pseudomonas , Flavobacterium ,et ceci par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage, par sol l'herber ou laitière. Des contaminations d'origine fécale peuvent entraîner la présence de Clostridium , d'Entérobactérie pathogènes : Salmonella , Yersinia , Compylobacter . Enfin les lait des animaux malades peuvent contenir des germes pathogènes pour l'homme.

Les bactéries de la flore du lait (flore originelle et flore de contamination) sont susceptibles d'altérer ces aliments par trois processus :

1. La fermentation homo- ou hétérolactique du lactose avec acidification du lait (précipitation de la caséine et prise de masse du lait).

Chapitre II: Les interactions

2. La protéolyse (perturbation du caillé et de la maturation du fromage).
3. La lipolyse (oxydation des acides gras insaturés issus de la lipolyse altèrent l'aspect de l'odeur par rancissement) (Baliarda A., 2003).

Chapitre III :

Les bactéries pathogènes

Chapitre III: les bactéries pathogènes

III. Bactéries pathogènes

La principale cause de détérioration des aliments est la prolifération des microorganismes qui les contaminent. Ces microorganismes sont présents partout dans l'environnement sur les plantes, les animaux et les humains eux-mêmes. Certains de ces microorganismes provoquent seulement des altérations des produits alimentaires alors que d'autres, causent des maladies aux consommateurs.

Les bactéries pathogènes sont susceptibles d'entraîner des maladies, des toxi-infections alimentaires ou intoxication causé par la production de toxines des bactéries (Thierry, 2008).

III.1 -*Escherichia coli* :

Théodor Escherichia , médecin Allemand fut en 1885 l'inventeur d'une bactérie particulière *bacterium coli* commune qui sera appelée plus tard *Escherichia coli* (Guiraud, 1998).

Depuis plus d'un siècle, il est connu que *Escherichia coli* est un hôte normal de la flore digestive de l'homme et de nombreuses espèces animale souvent retrouvés en petit nombres dans les urines saines, c'est une bactéries largement répandue dans le milieu extérieur; elle ne semble cependant pas pouvoir y mener une vie saprophyte authentique : sa présence en quantité importante témoigne d'une contamination fécale récente .(Joffin, 2002).

Elle fait partie du groupe des Entérobactéries. Cette bactérie constitue une espèce aérobie quantitativement la plus importante à raison de 10^7 à 10^9 corps bactériens par gramme dans le caecum ou le rumen. (Grimont, 1997 ; Phillipon, 2007).

Elles sont largement utilisées en génie génétique, Des travaux ont permis d'insérer l'ADN d'organismes étrangers dans ses plasmides et ses bactériophages. (Phillipon, 2004).



Figure 2: *E. coli* observés au microscope électronique (Ducluzeau, 2006).

III.2-*Staphylococcus aureus* :

Staphylococcus aureus représente l'espèce la plus largement incriminée dans les toxiinfections alimentaires collectives (TIAC), elle appartient au groupe des staphylocoques à coagulase positive.

C'est une bactérie en forme de coque, immobile sphérique, Gram positif, associée par groupes en amas (grappe de raisin) ou en chaînes. D'environ 1 micromètre de diamètre, aéro-anaérobie facultative, thermosensible, qui requiert des températures de croissance comprises

Chapitre III: les bactéries pathogènes

entre 6 et 46°C (avec optimum à 37°C). C'est une bactérie neutrophile (croissance entre pH 4 et 9,8) qui survit dans les aliments déshydratés et/ou congelés, sa croissance peut être inhibée par la présence de flores de compétition présentes dans les aliments. Son rôle pathogène en toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est lié à entérotoxines staphylococciques (Hennekinne, 2009).

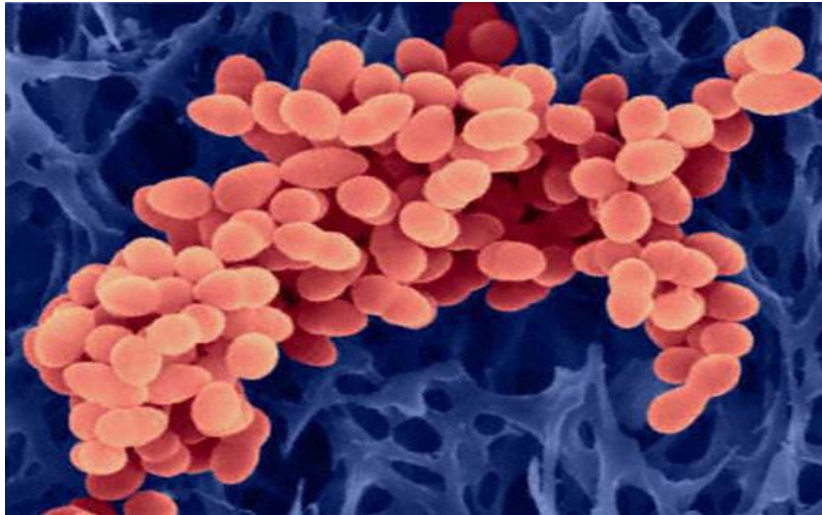


Figure 3 : Aspect de S. aureus en microscopie électronique.
(<http://www.museevirtuel.ca>)

III.3-Pseudomonas aeruginosa:

Les pseudomonas font partie des protéobactéries à Gram négatif du groupe gamma à côté de germes comme *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia cepacia* qui sont aussi des pseudomonas et qui coopèrent aux multi-infections de la mucoviscidose à côté de PA. Le genre pseudomonas, en effet, comprend de multiples espèces. PA fait partie des espèces douées d'un pouvoir pathogène et, parmi elles, des pseudomonas à pigment fluorescent, les *Pseudomonas fluorescens*, qui sont très nombreux et très répandus dans l'environnement et, notamment, les milieux aquatiques à l'exception des eaux souterraines bien protégées. Pour bien différencier le pyocyanique des autres pseudomonas à pigment fluorescent, l'identification se fait en recherchant le pigment pyocyanine soluble dans le chloroforme et la capacité du germe à se développer à 41°, ces deux tests suffisant à faire le diagnostic de PA. Quant aux autres très nombreuses espèces de *P. fluorescens* il est impossible d'en faire l'identification autrement qu'en recourant aux techniques d'hybridation des ADN pour voir si les séquences d'ADN d'une souche sont faciles à hybrider avec des espèces connues.

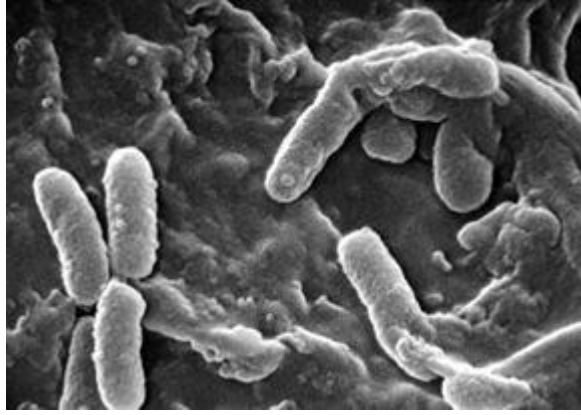


Figure 4: *P. aeruginosa* en microscopie électronique

(<http://www-dsv.cea.fr/dsv/la-dsv/toute-l-actualite/en-direct-des-labos/une-nouvelle-cible-pour-les-antibiotiques>)

Deuxième partie :
Etude expérimentale

Chapitre I :

Matériel et méthodes

I.matériel et méthodes :

L'intégralité de ce travail a été réalisée au Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animal (LSTPA) de l'université Abdlhamid Ibn Badis de Mostaganem, durant la période mars– mai de l'année 2017.

Les objectifs de cette étude s'articulent autour des points suivants :

- Etude de l'activité antagoniste vis à vis des bactéries pathogènes ;
- Détermination de la nature de l'agent inhibiteur ;
- Etude des aptitudes technologiques de ces bactéries lactiques.

I.1.les souches utilisées :

I.1.1.souches lactiques :

Tableau01: les souches lactiques utilisées

Code	Identité	Origine
BL8	<i>Lactobacillus</i>	Blé fermenté (hamoum)
M6	<i>Lactobacillus</i>	Blé fermenté (hamoum)

I.1.2.souches pathogènes :

Les souches pathogènes ont été fournis par l'institu Pasteur Alger.

Tableau02: les souches pathogènes utilisées

Souche pathogènes	Provenance	Milieu d'isolement
<i>Pseudomonas sp.</i>	Institut Pasteur (Alger)	King A
<i>Staphylococcus aureus</i>	Institut Pasteur (Alger)	Chapman
<i>Escherichia coli.</i>	Institut Pasteur (Alger)	VRBL

I.2-Méthodes :

I.2.1-Purification et conservation des souches :

Vérification de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique.

La purification des souches a été effectuée par ensemencement en stries sur milieu MRS solide pour les bactéries lactiques et sur les milieux sélectifs pour chacune des souches pathogènes .

Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h .

La vérification de l'identité des bactéries utilisées dans notre étude a été réalisée par des observations microscopiques, macroscopiques et test de l'activité catalasique.

I.3.Critères morphologiques :

I.3.1.Caractérisation macroscopique :

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation.L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et de la température de l'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées : les colonies sont d'autant plus petites qu'elles sont rapprochées.

I.3.2. Caractérisation microscopique :

L'examen microscopique à été effectuée après la coloration de Gram pour déterminer le type de Gram, leur morphologie .

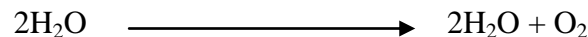
- La méthode de la coloration est représentée en annexe.

I.4. Critère biochimique :

I.4.1. Test de catalase :

Le test de catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'hydrogène.

L'activité catalytique consiste à prélever une colonie sur gélose est dissociée dans une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂) à 10 volume l'apparition des bulles révélant le dégagement d'oxygènes (Ahmed et Irène 2007)



I.5.Conservation des souches :

I.5.1.Conservation à courte durée :

Sur un milieu MRS incliné, les souches sont ensemencées puis incubés à 30°C pendant 24h et conservés au réfrigérateur à 4°C .un repiquage doit être réalisé toutes lesquartessemaines.

I.5.2.Conservation à longue durée :

Le milieu de conservation contient70% de lait écrémé (enrichi par 0.05% d'extrait de levure 0.05% du glucose) et 30% du glycérol.

Les souches sont centrifugés à 4000 tour/ min pendant 10min après le surnagent est éliminée et 5ml du mélange est rajouté au culot, le tout est rempli dans des tubes Eppenderfà température de -20°C. (Badis et al.,2004)

I.6.étude de l'activité antimicrobienne des souches :

Nous avons utilisé la méthode directe : la méthode de Fleming et al (1975).

I.6.1.La méthode de Fleming et al (1975) :

Cette méthode permet de mettre en évidence les inhibitions par contact cellulaire, par compétition vis-à-vis d'un substrat.

Pour réalisée cette méthode on a préparé quatre culture différents :

1. MRS_{bouillon}
2. MRS_{bouillon} + SOL « A »
3. MR_{Stamponné}
4. MRS_{tamponné}+ SOL « A »

SOL « A » : 10 g de poudre de lait dans 100 ml d'eau distillé.

Les souches sont ensemencées dans les quatre culture et incubée à 37°C pendant 24 H .

On a utilisé le milieu MRS tamponné et non tamponné, sans et avec l'adition de 10% de lait écrémé afin d'éliminer l'acidité.

L'adition du lait à un effet dans la production des bactériocines.

A partir d'une culture de 24 h,nous avons ensemencé les souches à tester pour leur activité inhibitrice en touche sur la surface du milieu MRS solide à l'aide d'une pipette pasteur.

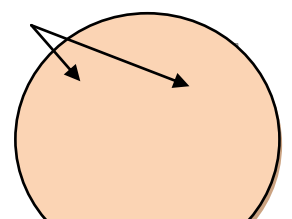
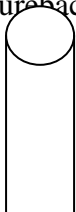
Après 24 h incubation à 37 ° C, la gélose de triptica-soja molle prés-ensemencée parla souche indicatrice est coulée au-dessus de la première couches de gélose.

Puis deuxième incubation à la température optimale de la souche indicatrice pendant 24 h.

Le résultat se traduit par l'apparition des zones d'inhibitions.

Méthode de Fleming (1975) :

Culture bactérienne



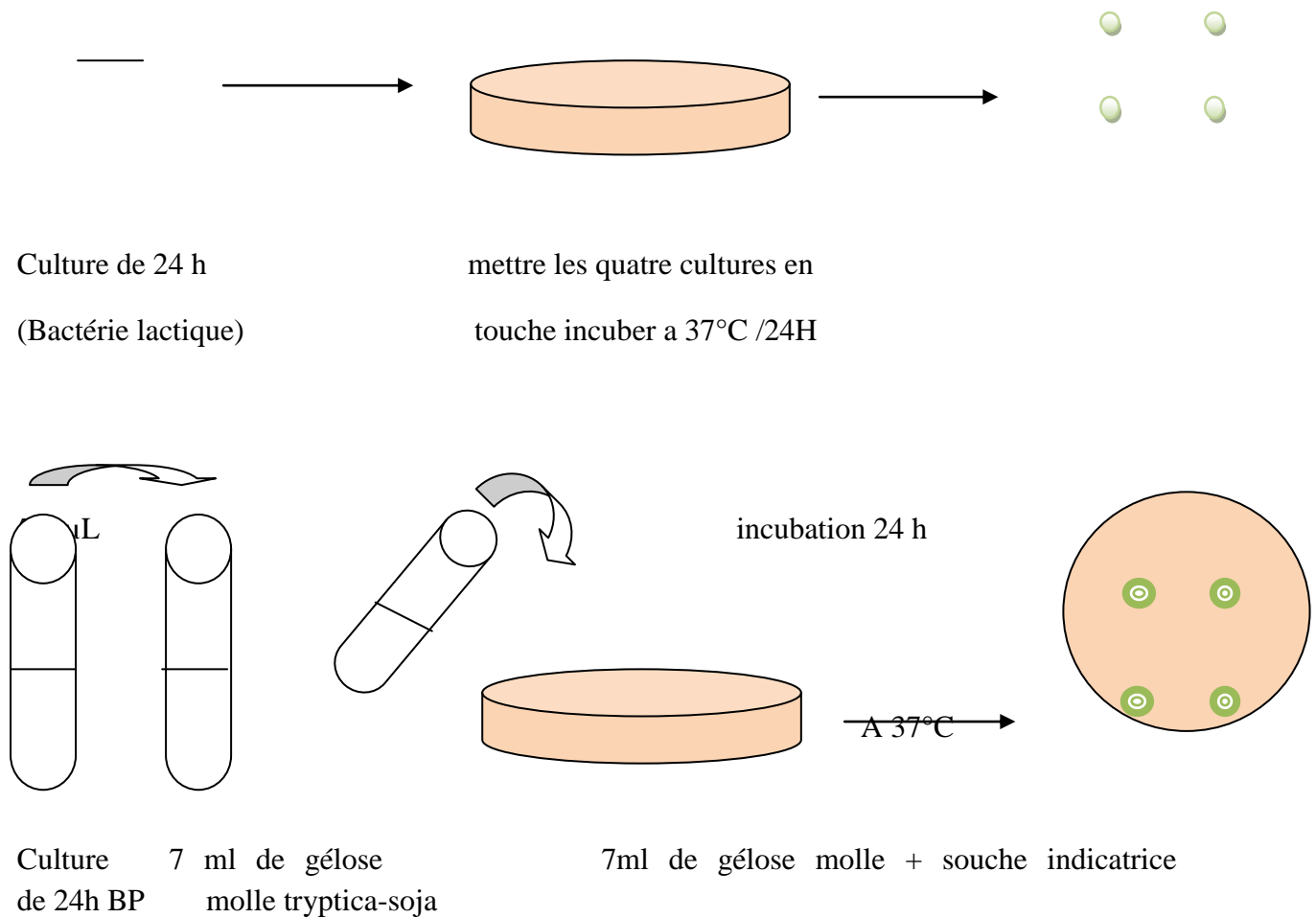


Figure 1 : méthode de Fleming (1975).

I.7.Détermination du facteur d'inhibition :

I.7.1.Inhibition due à la présence de substance protéique :

I.7.1.1.Effet des enzymes :

Les bactériocines sont des substances de nature protéique.

Pour savoir si la souche lactique produit cette substance, trois enzymes de nature protéique est testée en utilisant toujours la méthode de Fleming et *al* ; (1975).

Les enzymes ont été préparés : on a pesé 20 mg d'enzyme dissoudre dans 10 ml de tampon phosphate.

Nous avons préparé une culture lactique de 24h, et on a centrifugée à 4000tr/min pendant 15 minute, le surnageant obtenu est neutralisé pour éliminer l'effet de l'acide puis il est ensemencé en touchesur gélose de MRS.

On a laissé les boites sécher pendant 15 minutes ensuite incubé à 37°C pendant 24 h.

Après incubation à 37°C pendant 24h, le mélange de la gélose semi-solide en surfusion contenant 500 µl de la souche pathogène et 400µl de solution d'enzyme est coulé.

Après solidification les boites sont incubées à 37°C pendant 24h.

Des boites témoins sont utilisées sans enzyme.

Le résultat obtenu consiste à comparer les diamètres d'inhibitions en présence et en absence d'enzyme.

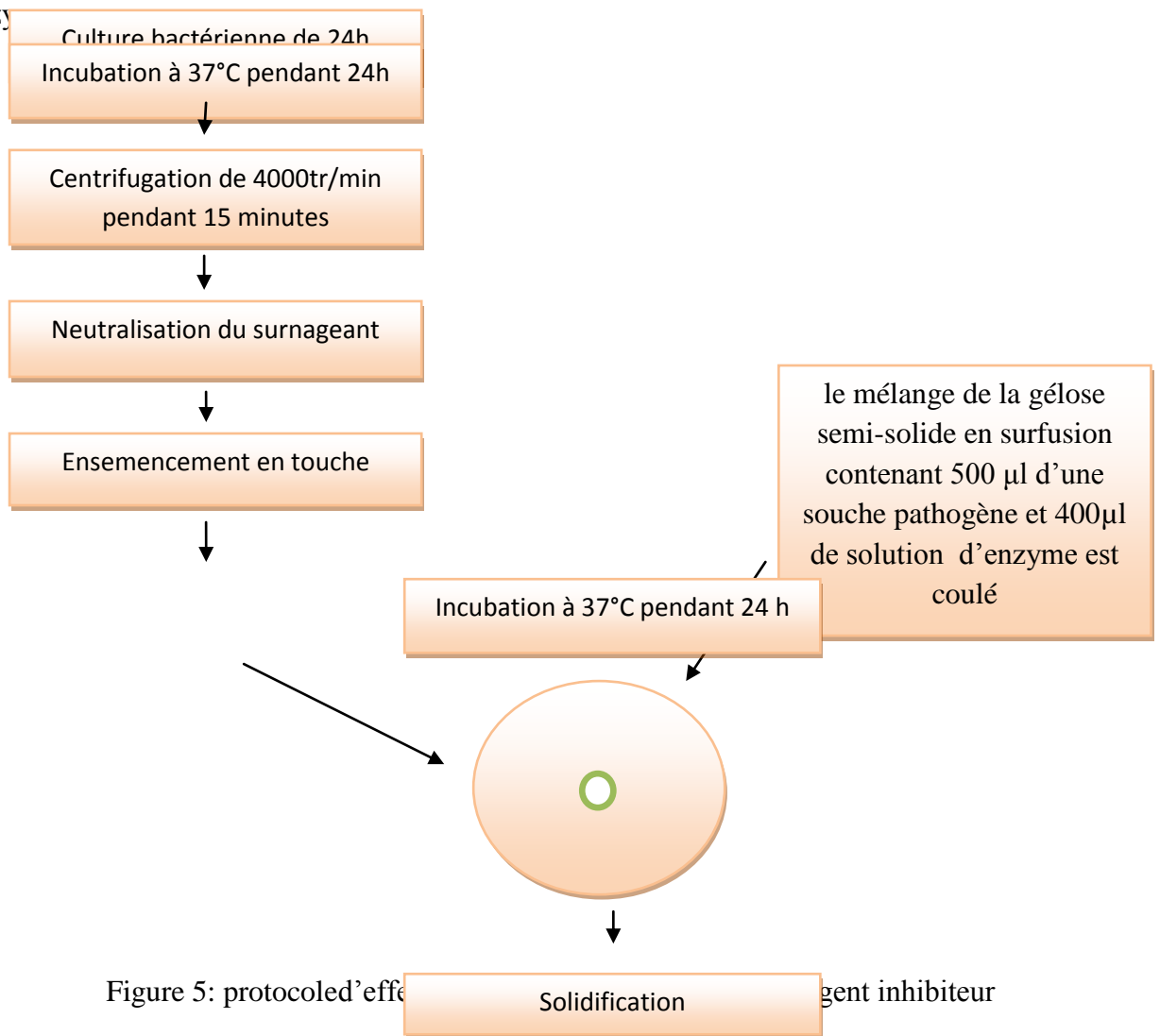


Figure 5: protocole de l'effet d'un agent inhibiteur

I.7.1.2. Stabilité thermique :

L'effet de la température sur l'activité antimicrobienne des surnageants est étudiée après chauffage :

Le résultat obtenu consiste à comparer les diamètres d'inhibitions en présence et en absence d'enzyme

- 100 °C pendant 15 minutes,
- 100°C pendant 30 minutes,
- 80° C pendant 15 minutes et 30 minutes.

L'activité résiduelle est testée par la technique des spots après 24 h incubation.

I.7.2. Inhibition due à la présence de phage lysogène :

Nous avons effectué ce test pour mettre en évidence la supposition d'une inhibition causée par les phages bactériens.

A l'aide d'une pipette pasteur, on découpe un fragment de la zone d'inhibition et on le suspend dans une solution constituée de 1 ml de tampon phosphate stérile à 0.1M et de 50 µl de chloroforme.

Après agitation et décantation, on prélève 300 µl de ce mélange et on l'ajoute à 7.5 ml de gélose molle contenant 100 µl de la souche indicatrice.

Le milieu est coulé dans des boîtes de pétri et incubée à 37 °C pendant 24h à 48h, la présence de plaque de lyse indique la présence de phage (**BeneddineHadjer., DjebritCheuaiba2015**).

I.8. Aptitude technologiques des bactéries lactiques :

I.8.1. Pouvoir acidifiant :

La mesure du pouvoir acidifiant consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité totale par la soude.

Nous avons utilisé le lait écrémé à 0% dans des flacons stériles à un volume de 100 ml. Puis chaque flacon estensemencé par une culture lactique 1ml dans 100ml.

Après incubation à 37°C et à des temps d'incubation différents ($t_0, t_2, t_4, t_6, t_8, t_{24}$), 10 ml de la culture en lait sont prélevés puis titrés par la soude Dornic (N/9) en présence de 3 gouttes de phénolphthaléine, jusqu'au virage de la couleur au rose pâle (Larpent, 1997).

L'acidité titrable du lait a été exprimée en degrés Dornic (°D) selon la formule :



L'acidité est déterminée par la formule :

$$\text{Acidité (}^\circ\text{D)} = V_{\text{NaOH}} * 10$$

La mesure du pH est faite directement par le pH-mètre. Le pH a été déterminé à chaque fois que le dosage de l'acide lactique a été effectué.

I.9.Résistance aux antibiotiques des bactéries lactiques :

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide a été appliquée,

Après une culture de 18 h, on a ensemencé les souches à l'aide d'un écouvillon à la surface de la gélose MRS.

Les boîtes sont séchées à température ambiante. Chaque boîte reçoit des disques d'antibiotiques.

Après incubation à 37°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (Leroy et al., 2007)

II. Résultat et discussion :

II.1.vérification de la pureté des souches :

II.1.1.L'observation macroscopique

L'observation macroscopique des cultures sur milieu MRS montre la présence des colonies présentant les caractéristiques suivantes :

- petites colonies et de couleur blanchâtre ou crème et translucide.

II.1.1.observation microscopique :

L'observation au microscope optique nous a permis de déterminer la forme des cellules, leur disposition ainsi que le type de Gram, des bactéries lactiques et pathogènes.

- Les bactéries lactiques :

Les résultats sont présentés dans le tableau 03:

Tableau03 : Critères morphologiques, la coloration Gram et le test de catalase des deux souches

Code de souche	Forme	Gram	Catalase
BL ₈	Bacille en chaînette	+	-
M ₆	Bacille en grappe	+	-

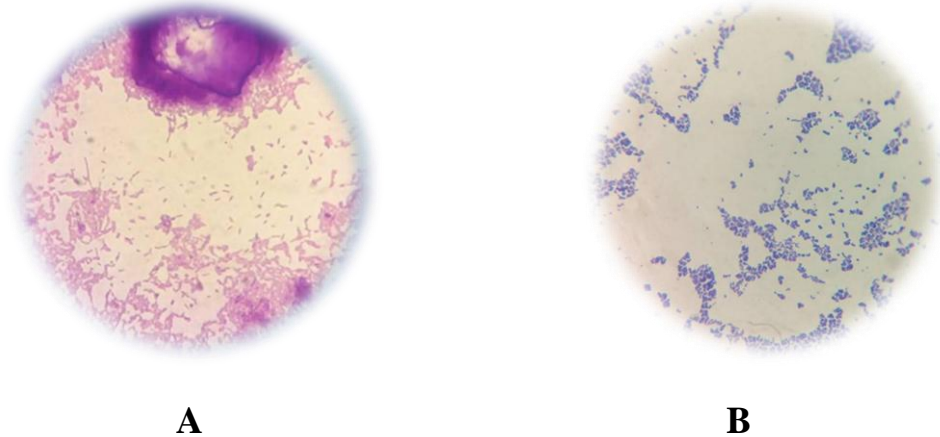


Figure 6 : Observation microscopique des souches lactiques après la coloration de Gram (Gx100)

A :BL₈

B :M₆

- souches pathogènes

Les résultats sont représentés dans le tableau04 :

Tableau 04: Critères morphologiques, la coloration Gram des souches pathogènes

souches	Morphologie	Gram
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilles	-

Chapitre II : Résultat et discussion

<i>Staphylococcus aureus</i>	Coques en amas	+
<i>Escherichia coli</i>	Bacilles	-

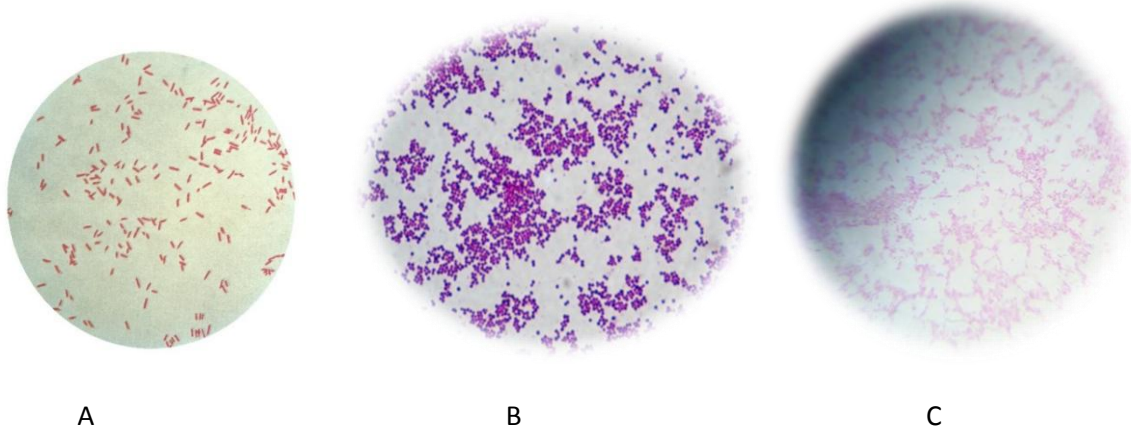


Figure 6 : Observation microscopique des souches pathogènes après la coloration de Gram (Gx100)

A : *Pseudomonas aeruginosa* B : *Staphylococcus aureus* C : *Escherichia coli*

II.2. Activité antibactérienne des souches :

Dans cette partie nous avons testé la capacité d'inhibition des bactéries lactiques vis-à-vis à des bactéries pathogènes par contact direct en utilisant la méthode de Fleming et al (1975).

III.2.1. la méthodes de Fleming et al (1975) :

Cette méthode dite directe permet de mettre en évidence tous types d'inhibition, par production d'agents inhibiteurs et aussi celles qui sont dues à un contact cellulaire ou compétition vis-à-vis à des nutriments.

Les résultats obtenus sont représentés dans tableau 05

Chapitre II : Résultat et discussion

Tableau 05: Résultats obtenu par la méthode de Fleming et al (1975)

Souche lactique	BL ₈			M ₆		
S.indicatrices S.inhibitrices	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphaphylococcus aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphaphylococcus aureus</i>	<i>E.coli</i>
M _b	1,2	0,5	1	1,2	ND	0,8
M _{b+L}	2,3	ND	1,4	2,1	ND	1,9
M _t	1,4	ND	1,1	ND	ND	0,5
M _{t+L}	1,7	ND	ND	0,6	ND	1

Les diamètres des halos d'inhibition sont exprimés en cm

«ND» : non déterminé

S : souches

L'inhibition est notée positive lorsqu'elle est supérieure à 1 cm Schillinger et Lucke(1989).

Les souches lactiques testées ont montrés un effet inhibiteur contre certaines bactéries pathogènes.

L'effet inhibiteur contre *Pseudomonas aeruginosa* est plus important de 2 à 2.3 que contre la souche pathogène *staphylococcus aureus* (absence d'inhibition).

Lors d'un second test, les souches inhibitrices sontensemencées dans le milieu MRS et MRS + 10% de lait écrémé. Nous avons obtenu des inhibitions dans les cas des souches testées, dans ce cas l'inhibition est due principalement à la production d'un agent comme les acides organiques ou le peroxyde d'hydrogène.

Le contact cellulaire peut être aussi responsable de certaines inhibitions

Les bactéries appartenant à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* sont plus sensibles à l'effet inhibiteur des souches lactiques que la bactérie *E.coli*.

Ces résultats correspondent à ceux de Todorov et Dicks (2006) qui dans leur études ont décrit l'effet des bactériocines des bactéries lactiques sur des bactéries pathogènes telles que *E.coli* et *pseudomonas aueruginosa*, ils ont observé que *pseudomonas aeruginosa* s'est montré la plus sensible à l'effet inhibiteur des bactériocines par rapport à *E.coli* et les bactéries de germes Salmonella.

Chapitre II : Résultat et discussion

Nous avons ensemencé les souches inhibitrices dans le MRS tamponné et le MRS tamponné + 10% de lait écrémé.

Les résultats obtenus ont montrés que la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* a été inhibée par la souche BL₈ ce qui indique que l'inhibition n'est pas due à l'acidité ni au peroxyde d'hydrogène car la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est catalase positive.

Dans ce cas nous pouvons dire que l'inhibition est due possible à une bactériocine (Ayed 2011).

Les résultats obtenus pour la souche *E.coli* ont montrés une faible inhibition.

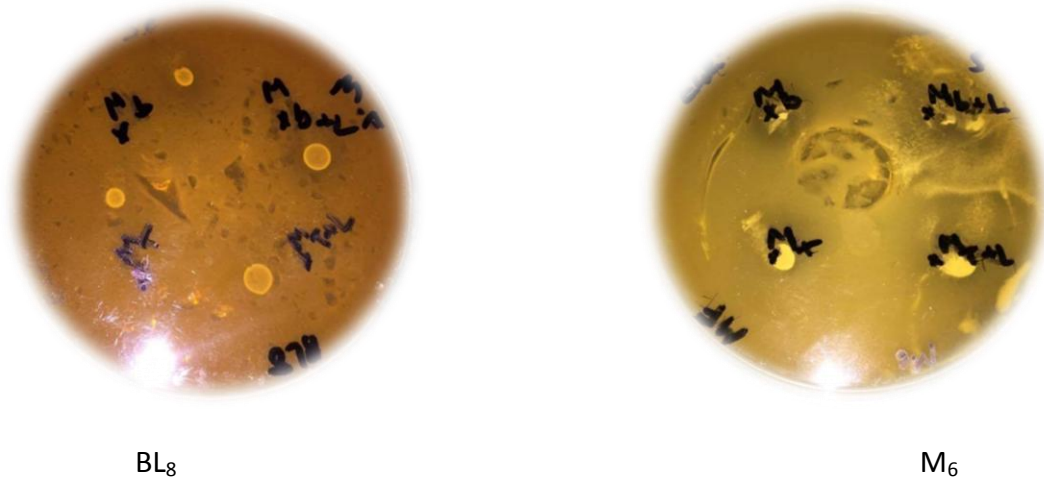


Figure 8: Effet d'activité antagoniste des bactéries lactique contre *Pseudomonas aeruginosa*.

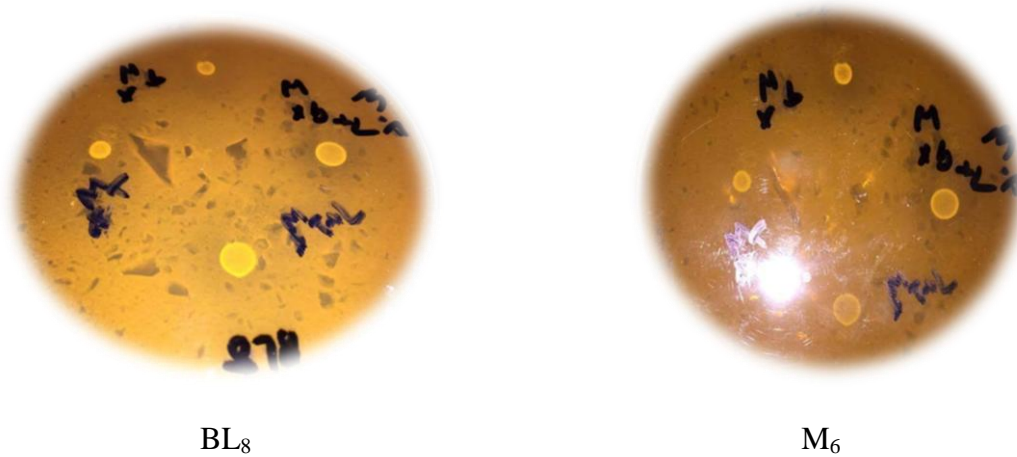


Figure 9: effet d'activité antagoniste des bactéries lactique contre *E.coli*



Figure 10: effet d'activité antagoniste des bactéries lactique contre *Staphylococcus Aureus*

II.3. Identification de la nature de l'agent antibactérien :

L'inhibition des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques peut avoir plusieurs origines parmi lesquelles, nous pouvons mentionner la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène, de phages et/ou de bactériocines (Todorov et DICKS, 2005).

II.3.1. Effet des enzymes protéolytiques

L'effet des enzymes protéolytiques suivantes: Trypsine, α - chymotrypsine et l'enzyme la catalase, a été étudié afin de déterminer la nature de l'agent inhibiteur.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 06:

Tableau06: activité antagoniste des enzymes des bactéries lactiques sur les bactéries pathogènes

s.lactique	BL ₈			M ₆		
s.indicatrice enzymes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E.coli</i>
Catalase	0,5	ND	1,4	1	ND	0,6
α - chymotrypsine	0,7	ND	1,4	1,4.	ND	1
Trypcine	0,8	ND	0,6	1,2	ND	1,5
Témoin	1,4	ND	1	1,1	ND	1

ND: non déterminée

Diamètre en cm

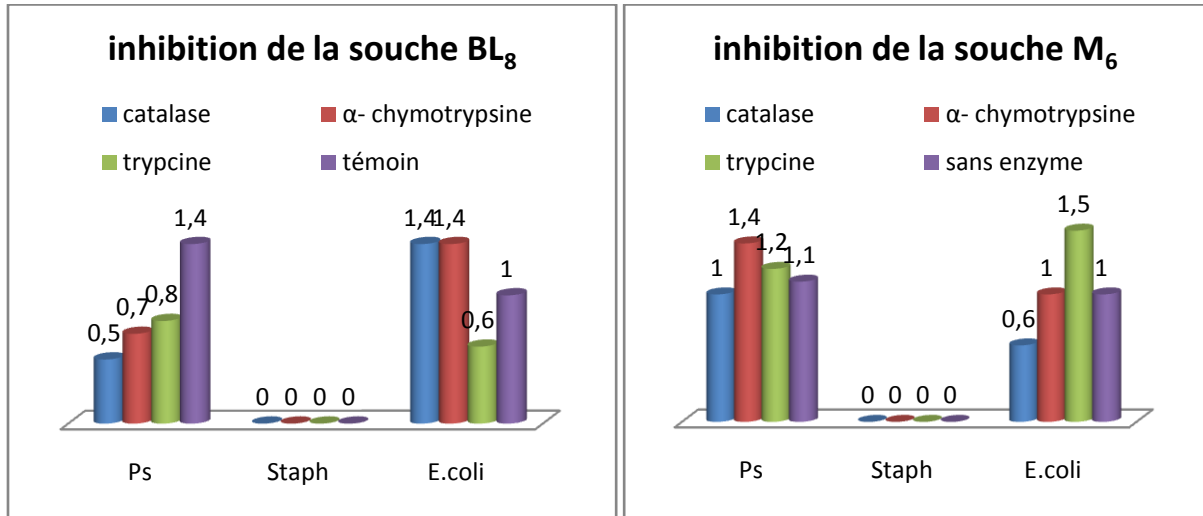


Figure 11: effet des enzymes sur les bactéries lactique vis-à-vis aux bactéries pathogènes

La souche M₆ synthétise une bactériocine sensible à l'action des trois enzymes testé et qui agit fortement sur *Pseudomonas aeruginosa*. Contrairement avec la souche BL₈ agit fortement sur *E.coli*.

Les zones d'inhibitions pour la souche BL₈ ont diminué dans le milieu avec enzyme par rapport au milieu sans enzyme. Probablement il existe une autre bactériocines de nature glycoprotéique ou lipoprotéique qui n'a pas agit sur *lactobacille*. (Karthikeyan et al, 2009)

la souche M₆ secrète des bactériocines qui agissent sur toutes les bactéries pathogènes, l'une de nature protéique sensible à la catalase, la trypcine et la α- chymotrypsine qui a inhibé totalement *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ceci confirme les travaux de Vinod Kumar et al (2006).

II.3.2.l'inhibition due au traitement thermique :

Les deux souches ont perdu leur activité inhibitrice sur les bactéries pathogènes après traitement thermique à différents température et différents temps , alors que le traitement avec les enzymes n'a aucun effet sur la substance produite.

Cette inhibition est peut être due alors à une substance protéique de nature bactériocine insensible au enzyme catalase, la trypcine et la α- chymotrypsine.

II.3.3. L'inhibition due au bactériophage :

Les phages peuvent être l'origine des inhibitions dans la croissance bactérienne (Davies Et Gasson, 1980).

Chapitre II : Résultat et discussion

Le test des phages s'est révélé négatif pour les souches pathogènes utilisées, aucune plage de lyse n'est apparue après incubation. Donc l'inhibition n'est pas due au phage.

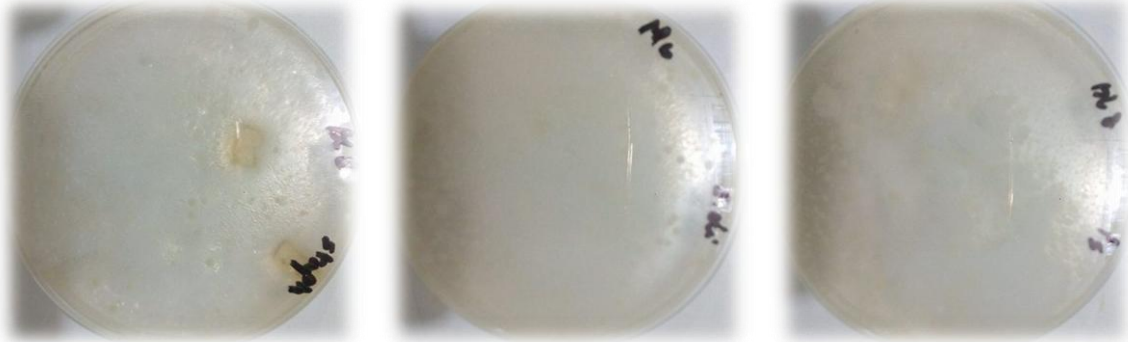


Figure12: test de phage est négative (absence de phage)

II.4.Pouvoir acidifiant :

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques, elle demeure une de leur propriétés métaboliques les plus recherchées vu son intérêt en technologie laitière et à la conservation des aliments.

Le pH a été déterminé en chaque fois qu'on procède au dosage de l'acide lactique.

La comparaison entre les résultats du pH et celui de l'acidité montre que le taux d'acidité augmente avec la diminution du pH.

A partir de t_0 les deux souches lactique secrètent une quantité d'acide estimé entre 13 et 15 °D.

Le meilleur pouvoir acidifiant a été enregistré au bout de 24 h dans les deux souches et surtout avec la souche M_6 qui arrive jusqu'à 74°D.

Donc les résultats obtenus nous ont permis de classer nos deux souches dans la catégorie des bactéries moyennement acidifiante (acidité variés entre 74°D et 61°D) avec une production progressive de l'acide lactique, accompagnée d'un abaissement du pH du milieu.

le résultat obtenu pour la M_6 qui est un *lactobacille* est en accord avec de nombreuses études et rejoignent ceux des auteurs (Idoui *et al.* , 2009) .

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 08 et les graphes 1 et 14 :

Chapitre II : Résultat et discussion

Tableau08 : Evolution de l'acidité et du pH en fonction du temps

Souche	BL ₈		M ₆	
	Acidité	pH	Acidité	pH
0	13	6.79	16	6.73
2	17	6.64	20	6.50
4	23	6.58	29	6.38
6	29	6.46	36	6.20
8	40	6.22	44	6.18
24	61	5.97	74	5.20

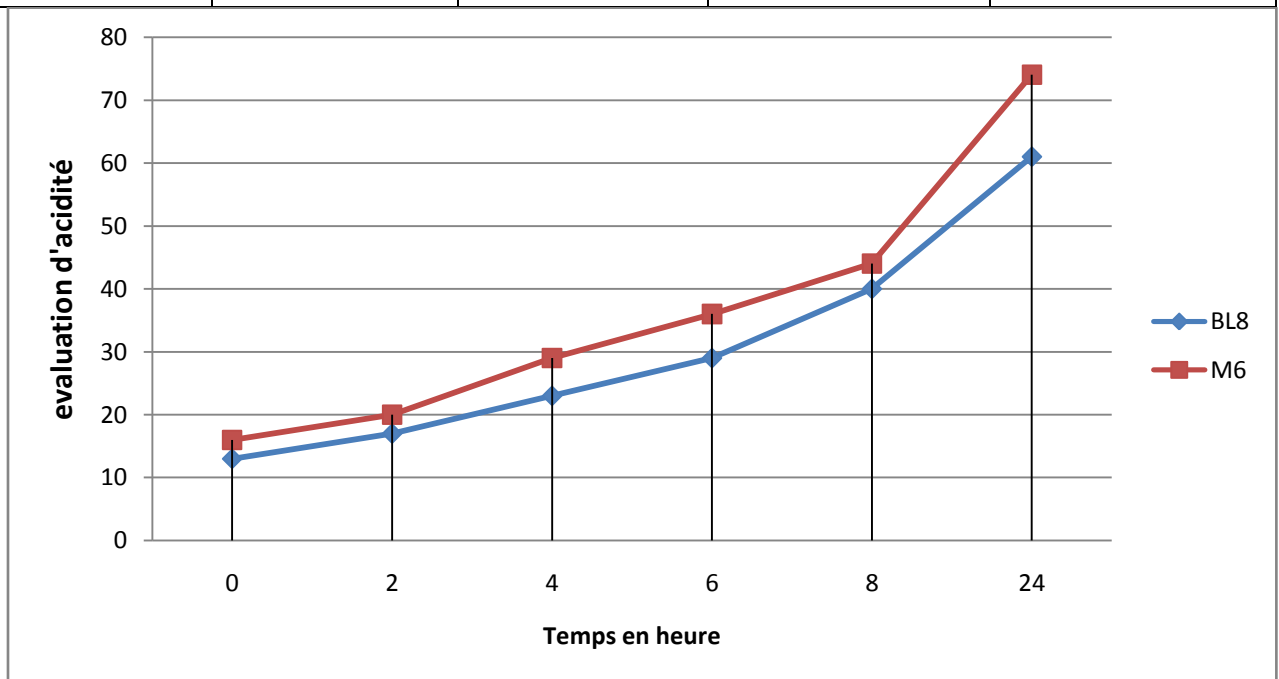


Figure13 : Evolution d'acidité des souches BL₈ et M₆ en fonction du temps.

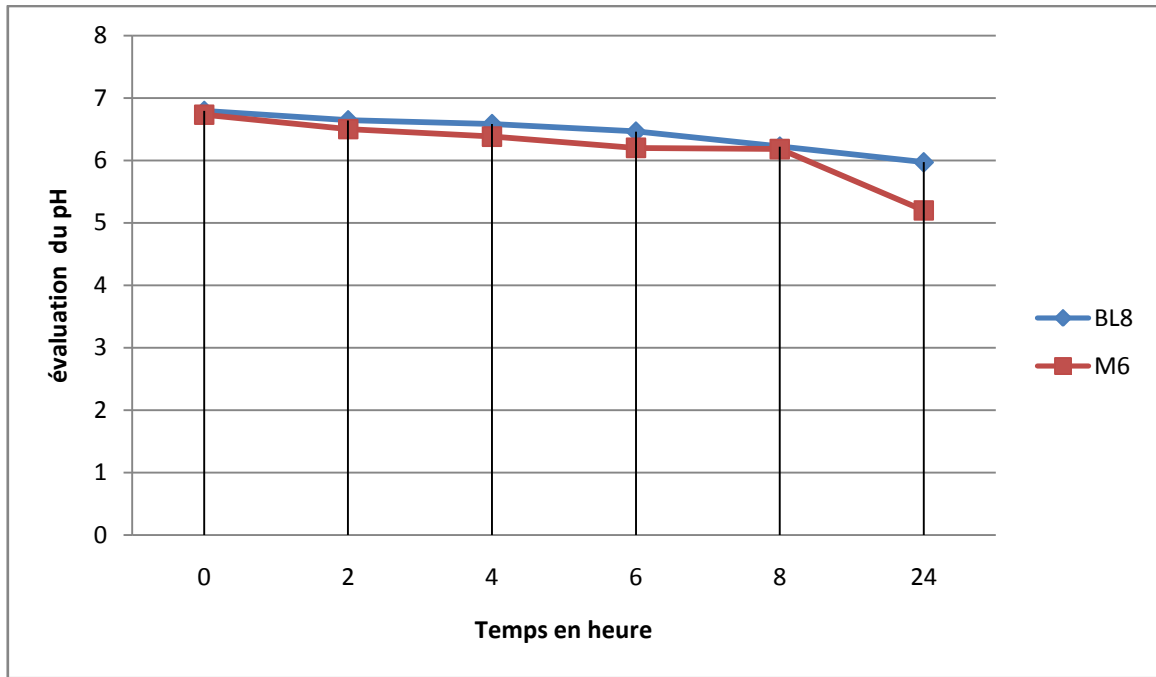


Figure14 : Evolution du pH des souches M₆ et BL₈ en fonction du temps.

II.5. AntibioGramme des bactéries lactique :

L'antibiogramme a été effectué sur les deux souche appartenant à l'espèce des *lactobacille*, on a testé leur résistance vis-à-vis à 7 antibiotiques après une culture de 24 h .on à mesuré les diamètre des zones d'inhibition de croissance de la souche microbienne, les résultats sont présentés dans le tableau 09 et la figure06 :

Tableau 9: antibiogramme des souches lactiques.

Souches \ Antibiotiques	BL ₈	M ₆
Amoxilline	R	R
Carbencilline	R	R
Ampicilline	S	S
Cephalothine	S	R
Nalidixin acid	S	S
Néomycine	R	R
Lavulanic acid	S	R

R : résistant

S : sensible

Les deux souches ont montrés une grande sensibilité vis-à-vis au antibiotique carbencilline ,ainsi ,au Nalidixin acid et Ampicilline.

Les souches ont présentées une résistance aux antibiotiques Amoxilline et Néomycine dont le diamètre est entre 0.6 cm à 1 cm.

D'après les résultats de détermination de la nature de l'agent antibactérien on constaté que :

- Les de deux souches lactiques isolées (*Lactobacillus BL₈*, *Lactobacillus M₆*) sont douées d'une activité antimicrobienne par production d'un agent inhibiteur .
- La nature de l'agent inhibiteur n'est pas du au bactériophage ni au traitement thermique.
- la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* a été inhibée par la souche *BL₈* ce qui que indique que l'inhibition n'est pas due à l'acidité ni au peroxyde d'hydrogène car la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est catalase positive.
- *Staphylococcus aureus* est sensible aux deux bactéries lactiques
- Classification de nos deux souches dans la catégorie des bactéries moyennement acidifiante (acidité variés entre 74°D et 61°D)
- La sensibilité de nos souches.

Conclusion et perspectives

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'étude de la détermination de l'activité antimicrobienne de nos deux souches BL₈ et M₆ vis-à-vis des souches pathogènes à Gram+ (*Staphylococcus aureus*) et à Gram- (*Escherichia coli* et *Pseudomonas sp.*) par la méthode directe de Fleming (1975) qui permet de détecter tous les types d'interactions. À partir de cette technique on a permis d'observer le taux d'inhibition ainsi de déterminer l'agent inhibiteur.

La méthode de Fleming nous a permis d'observer le taux élevé d'inhibition avec un diamètre 2.3 cm.

La souche *Pseudomonas aeruginosa*, s'est révélée la plus sensible à l'effet inhibiteur des bactéries lactiques.

L'étude de la production de l'agent inhibiteur en milieu tamponné à pH 7 et non tamponné a permis d'observer des inhibitions dans les deux cas, donc on peut dire que l'agent inhibiteur n'est pas dû à l'acidité, ni au peroxyde d'hydrogène puisque la bactérie indicatrice possède une activité catalasique.

Nous avons essayé d'étudier l'effet des enzymes protéolytiques et si la température agit sur la zone d'inhibition, et l'étude de la présence des bactériophages.

Après ces études on a permis de suggérer que l'agent inhibiteur s'est les bactériocines

À la fin nous avons essayé d'étudier le pouvoir acidifiant et l'antibiogramme de nos souches BL₈ et M₆.

Il serait intéressant de poursuivre notre étude par :

- Optimisation des souches lactiques isolées
- La détermination des bactériocines produites.
- Il est intéressant de faire une caractérisation plus poussée et une purification des substances inhibitrices pour les deux souches
- Caractérisation physicochimique de la bactériocine.
- Utilisation d'autre souche pathogène afin de déterminer le spectre d'action de la bactériocine

Conclusion et perspectives

Annexes

Milieu Mrs Liquide (Man, Rogosa Et Sharpe,1960)

Polypeptone	10g
Extrait De Viande	10g
Extrait Autolytique De Levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate Dispotassique	2g
Acétate De Sodium	5g
Citrate D'ammonium	2g
Sulfate De Mangésium	0.2g
Sulfate De Manganèse	0.05g
Eau Distillée (Qsq)	1000ml

Stérilisation A 121°C Pendant 15min

pH 6.5

Milieu Solide :

-Mrs Liquide	1000ml
-Agar-Agar	18g

Milieu Chapman :

Peptone	10g
Extrait De Viande De Bœuf	1g
Chlorure De Sodium	75g
Mannitol	10g
Rouge De Phénol	0.025g
Agar-Agar	15g
Eau Distillée (Qsq)	1000ml

Milieu King A :

Polypeptone	20g
Glycérol	10g
Phosphate Bi Potassique Anhydre	1.5g
Sulfate De Magnésium	1.5g
Agar	15g
Eau Distillée (Qsq)	1000ml

Milieu Vrbl :

Peptone	7g
Extrait De Levure	3g
Lactose	10g
Sels Biliaires	1.5g
Chlorure De Sodium	5g
Rouge Neutre	0.03g
Cristal Violet	0.002g
Agar Agar Bactériologique	15g
Eau Distillée (Qsq)	1000ml

pH 7.4+/- 0.2

Milieu Tryptica-Soja Liquide:

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

Ph : 7,3 ± 0,2

Milieu Tryptica-Soja Semi Solide

Tryptica-Soja Liquide	1000ml
-----------------------	--------

Agar-Agar

8.2g

Coloration de Gram :

1-déposer une goutte d'eau de physiologique stérile sur une lame bien propre.

2-prélever un échantillon de colonie et mélangé avec la goutte d'eau. strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.

3-Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincez à l'eau.

4-Mordançage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étalez le lugol et laissez agir le même temps que le violet de gentiane ; rincez à l'eau déminéralisée.

5-Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone)est l'étape la plus importante de la coloration : versez goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveillez la décoloration qui doit être rapide. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincez abondamment avec de l'eau déminéralisée pour stopper la décoloration.

6-Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Mettez de l'eau distillée sur la lame et quelques gouttes de fuchsine. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute. Lavez doucement à l'eau déminéralisée. Séchez la lame sur une platine chauffante à 50°C.

7-Observez avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement $\times 1000$)

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

A

- **Alakomi, H.L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., et Helander, I.M. (2000)** Lactic acid permeabilizes gram-negatif bacteria by distrupting the outer membrane. *App. Env. Microbiol.* 66(5) : 2001-2005.
- **Ammor, M.S., et Mayo, B., (2007)** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science.* 76 : 138-146.
- **Arendt EK, Neve H., Hammes, WP., (1991)** Characterization of phage isolates from aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier. Paris.* 512-592.

B

- **Béal, C., Marin, M., Fontaine, E., Fonseca, F., et Obert., J.P., (2008)** . Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier. Paris.* 661-765.
- **Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D., (2008)** Impact of mixed and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-164.
- **Bourgeois, C.M., et Larpent, J.P., (1996).** *Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires.* *Tec bacteria in food & Doc, Lavoisier. Paris.* 432-704
- *biotechnological production. Appl. Microbiol. Biotech.* 64, 16-27.
- **Boudjemaa, Khaled., (2008).** Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactisérum par streptococcue thermophilus. Mémoire de magister. option biochimie et microbiologie appliquées. Université M'Hmed Bougara –Boumerdés
- **Bassler, BL., Losick, R., (2006)** Bacterially Speaking. *j.cell.:* 04.001. *biotechnological production. Appl. Microbiol. Biotech.* 64, 16-27.

C

- **Carrau, FM., Neirotti, E., Gioia, O., (1993)** Stuck wine fermentation: effect of killer/sensitive yeast interactions. *J. ferment. Bioeng.* 76: 67-69.
- **Cholet, O., (2006).** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16.
- **Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., et Wallbanks, S., (1993).** Taxonomic studies of some Leuconostoc like organisms from fermented sausages, description of a new genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides group of species. *J. Appl.*

Références bibliographiques :

D

- d'applications les bactériocines. Thèse Doc. Institut National Polytechnique de Docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Domaines de Toulouse (INP Toulouse). Sciences Biologiques.
- **Dortu, C., et Thonart, P., (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour
- **De Souza Oliveira, RP., Perego, P., Converti, A., De Oliveira, N., (2009).** **Growth, and**
- **Dellaglio, F., de Roissard, H., Torriani, S., Curk, M.C., et Janssens, D., (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). Lorica, Uriage. 1 : 25-116.
- **Donkor, O.N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., et Shaha, N.P., (2007).** Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. INRA, EDP Sciences. 86 : 21-38.

E

- **El-Ziney, M.G., Uyttendaele, M., Debevere, J., Jakobsen, M. (1998).** Characterization of the locus responsible for the bactériocin production in lactobacillus plantarum C11. *Journal of bacteriology*.178(15).4472-83.
- **VAN DER MAREL G.M., (1986).** Review: Lactic acid: considerations in favor of its evaluating the safety and effectiveness of Lactobacillus vaginal suppositories in patients with recurrent factors by Lactobacillus delbrueckii. *Journal of Applied Microbiology* 91, 147-153.

G

- **Galverz, A., Abriouel, H., Lopez, R. L., and Ben Omar, N.B., (2007)** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int.J. Food Microbiol.*, 120 (1-2).51-70.
- **Gillor, O., Etzion, A., Riley, M. A. (2008).** The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl.* In: *Biotechnology and Food*.
- **Grimont, PAD., (1997).** Systématique et identification .In: *Traité de Microbiologie* growth and metabolite production of Lb. reuteri during glucose/glycerol cofermentation in bacteriology.
- **Guiraud, J.P., (1998).** *Microbiologie alimentaire*. Ed : Dunod, Paris, pp : 88-89.
- **Gerrit, S., Bart, A.S., et Wim, J.M.E., (2005).** Flavour formation by lactic acid bacteria and la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* , 13: 143-154.
- lactic acid bacteria. *Appl.Microbiol. Biotechnol.* 71 : 394-406.

Références bibliographiques :

- **Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Minervini, F., Limitone, A., (2007)** Cell-cell

H

- **Hassan, A.N., et Frank, J.F., (2001).** Starter Cultures and their use. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.
- **Ho, T.N.T., N. Tuan, N., Deschamps, A., et Caubet, R., (2007).** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology. 134-142.
- **Hogg, T.,(2005).** Essential microbiology. John Wiley & Sons, Ltd. 188-190
- **Holm, HE., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, JC., Ameborg, N., (2001)** The effect of oxygen on the survival of non Saccharomyces yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with Saccharomyces cerevisiae. J. of app. Microbiol. 91: 541-547.
- **Hennekinne, Jacques-Antoine., (2009).** Nouvelles approches pour la caracterisation des toxi
- **Henri, Leclert.,(2002) .** BACTERIOLOGIE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA. Service de bactériologie. Centre hospitalier de Lille. Presse therm climat 2002; 139: 9-13

K

- **King, SW., Beelman, RB., (1986)** Metabolic interactions between Saccharomyces cerevisiae and Leuconostoc oenos in a model grape juice/wine system. Am. J. Enol. Vitic. 37: 53-60.
- **KLAENHAMMER, T.R., (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria.Biochimie., 70: 337-349
- **KLAENHAMMER, T.R., (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.FEMS.Microbiol.Rev .12.39-85.

L

- **Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachioui, M., et Ouhssine, M., (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 144 : 237-250.
- **Leveau, J.Y., et Bouix, M., (1993).** Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 85-87.
- **Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., Dessens, C., (1988)** Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. J. Sci. Food. Agric. 44: 183-191.

Références bibliographiques :

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

M

- **Mäyrä-Mäkinen, A., et Bigret, M., (2004).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In : Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 73-102.
- **Monnet, V., Latrille, E., Béal, C., et Corrieu, G.,(2008).** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 512-592.
- **Maqueda, M., Martinez- Canamero, M., and Galvez, A., (2007)** Treatment of Microbiol. Biotechnol ., 81: 591-606.moléculaire.Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES.

N

- **Nehme, N., (2008)** Étude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *OEnococcus oeni*:
- **Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N., (2003).** Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high

P

- **Pilet, M.F., Magras, C., Federighi, M., (2005).** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.
- **Pot, B., (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris.1-106.
- **Papa, Abdoulaye., Fall. (2011).** Études des interactions entre une bactérie bioprotectrice, Paris Tech). phagecarrying culture of *Leuconostoc oenos* 58N. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 220-224.
- **Philippon, A., (2004).** Relation hôte pathogène faculté de médecine Cochin-Port-Royal,
- **Philippon, A., (2007).** Cours de bactériologie médicale. faculté de médecine Cochin-Port-Royal.,150-155.
- **PODOLAK, P.K., ZAYAS, J.F., KASTNER, C.L., ET FUNG, D.Y.C., (1996).** propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques de la génétique pp. 461-483.

R

Références bibliographiques :

- **Roudj, S., Belkheir, K., Zadi-Karam, H., et Karam, N.E., (2009).** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. *European. J. Sci. Res.* 34 (2) : 218-227.
- **Satura, et Federighi, (1998).** In Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum par *Streptococcus thermophilus*. Mémoire de magister. Option biochimie et microbiologie appliquées. Université M'Hmed Bougara –Boumerdés
- **SAVIJOKIE, K., INGMER, H., ET VARMANEN, P., (2006).** Proteolytic systems of strategies for food bioservation. In! .1. *Food Microbiol.* 120 (1-2):5 1-70.
- **Serhan, M., Cailliez-Grimal, C., Borges, F., Revol-Junelles, A.M., Hosri, C., et Fanni, J., (2009).**Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.* 26 : 645-652.

T

- **Taillandier, P., Tataridis, P., Strehaiano, P., (2002)** A quantitative study of antagonism between *Saccharomyces cerevisiae* and *OEnococcus oeni*. Lallemand Technical Meetings Symposium 10, Biarritz. pp 21-26.
- **Tataridis, P. (2001)** Étude des interactions entre micro-organismes du vin : du qualitative au quantitatif. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- **Touati, D. (2000).** Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of Biochemistry and Torulaspora delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-suger fermentation. *Int. Jof Food Microbiol.* 122: 312-320

V

- **Vandamme, P., Pot B., Gillis, M., DeVos, P., Keresters, K., et Swwings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* 60 : 407.
- **Van de Guchte, M., Ehrlich, S. D., et Maguin, E., (2001).** Production of growth-inhibiting vegetable sauces with enterocin AS-48 alone oa a combinaison with phenolic

U

- **Uehara, S., Monden, K., Nomoto, K., Seno, Y., Kariyama, R., Kumon, H. (2006).** A pilot study UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16. Université PARIS V.

Z

- **Zahia Benmouna.2012.**bactériocines des bactéries lactiques études biochimiques et génétiques,thèse de magistère en biotechnologie.