

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université 08 Mai 45 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre
et de l'Univers
Département de Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de MASTER



Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire, Biologie Moléculaire des
Procaryotes

Titre du thème

*Contribution à l'étude de l'antagonisme des
bactéries lactiques vis-à-vis de quelques bactéries
pathogènes*

Présenté par :

- AMRANI Assia
- BEDIAF Houria
- DERBAL Amina

Devant le jury composé de :

Président : KHENAKA K.

(M.A.B Univ.Guelma)

Examineur : GRARA N.

(M.C.A Univ.Guelma)

Promoteur : BENOUARETH. D.E

(Pr. Univ. Guelma)

Membre invité : Moumene M.

(Doctorante L.M.D)

Juin 2013

Remerciements

Avant tout nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous adressons nos plus vifs remerciements au Professeur Mr BENOUARETH Djamel eddine, pour nous avoir proposé ce sujet, pour ses conseils scientifiques judicieux et son suivi durant la période de la réalisation de ce travail malgré ses charges professionnelles.

Nos remercions nos remerciements à Mr Bensouilah Takiyeddine, Doctorant à l'université de Badji Mokhtar « Annaba » et Mlle Moumen Meriem, Doctorante à l'université de Guelma pour leur aide et collaboration, leur compréhension et l'intérêt porté pour notre sujet.

Nous sommes particulièrement reconnaissantes à Mlle, Khenaka K., M.A.B à l'Université de Guelma d'avoir accepté de juger notre travail en tant que présidente ainsi que, Mlle Grara N., M.C.A à l'Université de Guelma, de bien vouloir évaluer et examiner ce mémoire.

Finalement, On remercie tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand Merci.

Dédicace

A mes très chers parents

Mohamed et Nora

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

C'est à travers vos encouragements que j'ai opté pour cette noble profession, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.

Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.

*A ma sœurs **Mina** et son mari **Housseem***

*Mon frère **Mohsen***

*Ma petite sœurlette **Loulou***

*Ma grand-mère **Bariza***

Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous. Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.

Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler.

Merci pour votre précieuse aide à la réalisation de ce travail.

*A mon fiancé **Billel***

*Ma belle mère **Nassima***

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

Aux petits jumeaux

Sami et Yanis

Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec plein de bonheur, de santé et d'amour.

A tous mes ami(e)s

En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie plein de santé et de

bonheur.

A tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer.

A Tous Mes enseignants tout au long de mes études.

ASSIA

Dédicace

A mes très chers parents

Haroun Elrrachid et Habiba

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

C'est à travers vos encouragements que j'ai opté pour cette noble profession, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.

Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.

A mes frères Mohammed et Didou

Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous. Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.

Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler. Merci pour votre précieuse aide à la réalisation de ce travail.

A mes amie : Neilou, Sayssou, Houria, Assia, Doudou, Wardouch, Marwa, Zeineb et Karima

En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie plein de santé et de bonheur.

A tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer.

A Tous Mes enseignants tout au long de mes études.

AMINA

POUKOU

Dédicace

A mes très chers parents

Ali et Meriem

*Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la
profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez
jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.
C'est à travers vos encouragements que j'ai opté pour cette noble profession, et c'est à
travers vos critiques que je me suis réalisée.
J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.
Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que
vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.*

***A mes sœurs Amel et Houda et leurs époux
Mes frères Hamdi et Azeddine et leurs épouses***

*Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers
vous. Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.
Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler.
Merci pour votre précieuse aide à la réalisation de ce travail.*

***Aux petits jumeaux Yassine et Mehdi
A mes petites nièces Cerine, Ranim et Zieneb***

Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec plein de bonheur, de santé et d'amour.

A tous mes ami(e)s

*En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons
passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie plein de santé et de
bonheur.*

A tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer.

A Tous Mes enseignants tout au long de mes études.

HOURIA

| Liste des figures | Pages |
|--|--------------|
| Figure 1 : Fabrication du Yaourt | 10 |
| Figure 2 : Fabrication du fromage | 12 |
| Figure 3 : Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique | 23 |
| Figure 4 : Régulation de la production, modifications post-traductionnelles et auto-immunité de la nisine..... | 30 |
| Figure 5 : Prélèvement du Lactosérum à partir des échantillons..... | 40 |
| Figure 6 : Ensemencement en stries sur milieu gélosé..... | 41 |
| Figure 7 : Préparation des tubes avant conservation | 42 |
| Figure 8 : Remplissage des tubules de l'API 50 CHL..... | 45 |
| Figure 9 : Lactobacilles isolés à partir du yaourt sur milieu M17..... | 49 |
| Figure 10 : Coques lactiques isolés à partir du yaourt sur milieu M17..... | 49 |
| Figure 11 : Résultats d'identification de <i>Sterpococcusthermophilus</i> par l'Api 50..... | 52 |
| Figure 12 : Effet antagoniste des souches <i>S.thermophilus</i> vis-à-vis d' <i>E.feacalis</i> | 54 |
| Figure 13 : Effet antagoniste de la souche <i>L.plantarum</i> vis-à-vis d' <i>S.aureus</i> | 55 |
| Figure 14 : Effet inhibiteur de la souche <i>L.lactis</i> vis-à-vis de <i>S.aureus</i> | 55 |

| Liste des tableaux | Pages |
|---|--------------|
| Tableau I : Composition du lait de vache..... | 7 |
| Tableau II : La classification fonctionnelle des bactéries lactiques..... | 19 |
| Tableau III : Séquence de quelques bactériocine de classe II..... | 24 |
| Tableau IV : Exemple de bactériocines synthétisées par <i>Streptococcus</i> (<i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus thermophilus</i>) et <i>Lactobacillus</i> | 26 |
| Tableau V : Résultats d'isolement des bactéries lactiques à partir du yaourt et du fromage frais..... | 48 |
| Tableau VI : Résultats des tests d'identification des bactéries isolées..... | 50 |
| Tableau VII : Résultats d'identification des souches lactiques par l'Api 50 CHL..... | 52 |
| Tableau VIII : Résultats des tests d'antagonisme de la méthode des puits..... | 53 |

Liste d'abréviation

% ID : Pourcentage d'identification

ABC: ATP Binding Cassette

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adénosine triphosphate

BHIB: Brain Heart Infusion Bouillon

FAO: Food and Agriculture Organization

FNLDV : Phénylalanine-Asparagine-Leucine-Acide aspartique-Valine.

GC% : Taux de GC ou coefficient de Chargaff

MH: Mulher Hintone

MPF: *Membrane Fusion Protein*

MRS: Man Rogosa Sharpe

OMS: Organisation Mondiale de Santé

UA : Unités Arbitraires

Table des matières **Pages**

Introduction 1

Partie théorique

Chapitre I : Les produits laitiers

I.1. Generalites sur les produits laitiers 5

I.2. Le lait 5

 I.2.1. Definition 5

 I.2.2. Composition biochimique 6

 I.2.2.1. la matière grasse 6

 I.2.2.2. la matière non grasse 6

 I.2.2.3. les enzymes 6

I.3. Le yaourt 8

 I.3.1. Définition 8

 I.3.2. Fabrication du yaourt 8

 I.3.3. Importance du yaourt 10

I.4. Le fromage 11

 I.4.1 . Fromage frais 11

Chapitre II : Les bactéries lactiques

II.1. Origine des bactéries lactiques 14

II.2. Définition..... 14

II.3. Habitat 15

 II.3.1. Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement 15

 II.3.2. Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte 16

II.4. Culture des bactéries lactiques 16

II.5. Taxonomie des bactéries lactiques 16

Chapitre III : Les bactériocines

| | |
|---|----|
| III.1. Généralité sur les bactériocines | 21 |
| III.2. Définition | 21 |
| III.3. Classification | 22 |
| III.3.1. Classe I : Les lantibiotiques | 22 |
| III.3.2. Classe II | 23 |
| III.3.3. Classe III | 25 |
| III.3.4. Classe VI | 25 |
| III.4. Quelques exemples de bactériocines de bactéries lactiques | 25 |
| III.5. Biosynthèse des bactériocines | 26 |
| III.5.1. Mécanisme de production des bactériocines et sa régulation | 27 |
| III.5.2. Le transport des bactériocines | 27 |
| III.5.3. Immunité | 28 |
| III.6. Mécanismes d'action des bactériocines | 30 |
| III.6.1. Classe I : (les lantibiotiques) | 31 |
| III.6.2. Classe II : (Peptides non modifiés) | 31 |
| III.6.3. Classe III : (Les protéines) | 32 |
| III.7. Domaines d'applications des bactériocines | 32 |
| III.7.1. Utilisation alimentaire | 32 |
| III.7.2. Utilisation médicale et vétérinaire | 34 |

Partie expérimentale

| | |
|---|----|
| I. Matériel | 38 |
| I.1. Echantillons biologiques | 38 |
| I.2. Les souches indicatrices | 38 |
| I.3. Appareillage | 39 |
| I.4. Produits chimiques et réactifs | 39 |
| I.5. Milieux de culture | 40 |

| | |
|--|----|
| I.5.1. Milieux d'isolement | 40 |
| I.5.2. Milieu pour la conservation | 40 |
| I.5.3. Milieu pour l'étude de l'antagonisme | 40 |
| II. Méthodologie | 40 |
| II.1. Isolement des bactéries lactiques..... | 40 |
| II.2. Purification | 41 |
| II.3. Conservation..... | 42 |
| II.4. Identification des bactéries lactiques | 42 |
| II.4.1. Caractères culturaux et morphologiques | 42 |
| II.4.2. Tests supplémentaires | 43 |
| II.4.3. Identification biochimique..... | 44 |
| II.5. Etude de l'antagonisme bactérien | 45 |
| II.5.1. Mise en évidence de la production de bactériocines | 46 |
| III. Résultats et discussion..... | 48 |
| III.1. Isolement et identification..... | 48 |
| III.1.1. Isolement | 48 |
| III.2.1 Identification biochimique | 50 |
| III.2. Identification par Api50CHL | 51 |
| III.3. Résultats de l'antagonisme | 53 |
| Conclusion | 57 |

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

INTRODUCTION

Les premières preuves de l'existence des produits laitiers fermentés remontent à 6000 ans avant JC dans le croissant fertile au Moyen Orient (plaines du Nil, du Jourdain, de l'Euphrate et du Tigre), époque où les végétaux et les animaux sont domestiqués (Fox, 1993).

Il faudra attendre Pasteur et ses travaux sur la fermentation en 1857 pour établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries. La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par Joseph Lister en 1973. Metchnikoff isole en 1904 le « bacille bulgare » (*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) présent dans le yaourt. Il étudie les propriétés acidifiantes des bactéries du yaourt et il développera l'idée que les bactéries contenues dans les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé.

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques qui ont en commun la capacité de produire de l'acide lactique. Elles sont utilisées depuis des millénaires dans la fabrication d'aliments fermentés, et en particulier dans celle de certains produits laitiers (yaourt, fromage, beurre, etc...) et agissent sur leur texture et leurs saveurs.

D'autre part, il a été démontré que les bactéries lactiques pouvaient accroître la durée de conservation des aliments par la production naturelle de composés antimicrobiens tels que : les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines.

Des moyens aussi multiples que variés sont aujourd'hui à notre disposition pour limiter le risque de développement microbien dans les produits alimentaires (congélation, ionisation, incorporation d'additifs chimiques, etc...).

L'emploi de conservateurs chimiques peut avoir des effets néfastes sur la santé humaine. Pour cela, les chercheurs se retournent vers la recherche de nouveaux bioconservateurs « naturels » tels que les bactériocines.

Les bactériocines sont des peptides à activité antimicrobienne, synthétisées par certains genres bactériens. Cependant celles produites par les bactéries lactiques sont reconnues comme sûres. Elles sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (Wijaya *et al.*, 2006).

La recherche de nouvelles souches de bactéries lactiques productrices de nouvelles bactériocines douées d'un maximum de caractéristiques et d'un spectre d'inhibition très large reste toujours d'actualité et ne cesse de stimuler les chercheurs à travers tout les pays du monde.

C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail de recherche, afin de vérifier la présence de certains ferments lactiques tels *S.thermophilus* et *L.bulgaricus* utilisés comme probiotiques dans les produits laitiers et évaluer leur action contre d'autres bactéries. Nous projetons d'étudier l'antagonisme des bactéries lactiques vis-à-vis de certaines souches estimant que ces ferments seront producteurs de bactériocines qui vont inhiber la croissance de ces dernières.

Ce mémoire est organisé en deux parties principales. La première partie est une revue bibliographique qui fait le point sur les produits laitiers et les bactéries lactiques ainsi que sur les différentes classes de bactériocines et leurs domaines d'application.

La seconde, présente le matériel et les méthodes mis en œuvre pour la réalisation de ce travail suivie par discussion des résultats obtenus.

Partie
Théorique :

CHAPITRE I :

Les produits laitiers

I.1 Généralités sur les produits laitiers

Les premières preuves de l'existence des produits laitiers fermentés remontent à 6000 ans avant JC en Asie centrale. Les premiers laits fermentés résultent probablement d'une fermentation au contact des bactéries résidant à l'intérieur des sacs de peau de chèvre utilisés pour le transport du lait. L'acidification du lait par fermentation est une des plus anciennes méthodes de conservation du lait en lui conférant des qualités organoleptiques.

Différentes méthodes de fermentation dans diverses parties du monde ont donné lieu à toute une gamme de produits de lait fermenté, dont le koumis, le kéfir, le lait acidophile et le yaourt. Les compositions, les saveurs et les textures de ces produits varient considérablement selon le type de lait et la nature des micro-organismes responsables de la fermentation (Ben yahyia, 2012).

I.2. Le lait

I.2.1. Définition

Selon la définition officielle adoptée en 1909 par le congrès international de la répression de la fraude de Paris « Le lait est le produit intégral de la traite totale interrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum.»

Le lait est un aliment complet, très nourrissant, sous forme d'une émulsion naturelle, dont la composition pondérale en glucides, lipides et protides (tableau I) est remarquablement équilibrée avec, en plus un choix intéressant en sels, en vitamines et en enzymes (Ndiaye, 2002).

I.2.2. Composition biochimique

1.2.2.1. La matière grasse

La teneur en matière grasse du lait de vache varie entre environ 3,3 et 4,7%, elle est majoritairement présente sous forme de globules gras de diamètre compris entre 0,2 et 15 μm .

Elle est composée principalement de triglycérides, de phospholipides et d'une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de β carotène.

La matière grasse du lait de vache se caractérise par : une forte proportion en acides gras à courtes chaînes ; une forte proportion d'acides gras saturés ; des acides gras insaturés et des acides gras d'origine bactérienne (Jeantet *et al.*, 2007).

1.2.2.2. La matière non grasse

La phase non grasse de lait de vache est constituée majoritairement d'eau (87% de la composition globale) dans laquelle sont dispersés ou solubilisés les constituants suivants :

- Le lactose (4,8% à 5% de la composition globale)
- Les protéines (3.2% à 3.5% de la composition globale)
- Les minéraux (0,60% à 0,90% de la composition globale)
- Les vitamines

1.2.2.3. Les enzymes

Le lait contient principalement trois groupes d'enzymes ; les hydrolases, les déshydrogénases (ou oxydases) et les oxygénases. Elles peuvent être d'origine naturelle ou microbienne (Jeantet *et al.*, 2007).

Tableau I : Composition du lait de vache (Vignola, 2002).

| Constituants | Composition (g/l) | État physique de composés |
|---|-------------------|--|
| Eau | 905 | Eau libre (solvant) plus eau liée (3,7%) |
| Glucides (lactose) | 49 | Solution |
| Lipides : | 35 | Emulsion des globules gras (3 à 5 µm) |
| ➤ Matière grasse proprement dite | 34 | |
| ➤ Lécithine (phospholipides) | 0,5 | |
| ➤ Insaponifiables (stérois, carotène, tocophérol) | 0,5 | |
| Protides : | 34 | ➤ Suspension micellaire phosphocaseinate de calcium (0,08 à 0,12 µm) |
| ➤ Caséines | 27 | ➤ Solution colloïdale |
| ➤ Protéines solubles (globuline, albumine) | 2,5 | ➤ Solution vraie |
| ➤ Substances azotées non protéiques | 1,5 | |
| Sels minéraux : | 7 | Solution en état colloïdale |
| ➤ Sodium | 0,4 | |
| ➤ Magnésium | 0,1 | |
| ➤ Phosphore | 0,9 | |
| ➤ Chlore | 0,9 | |
| ➤ Potassium | 1,5 | |
| ➤ Calcium | 1,1 | |
| ➤ Fer | 0,0005 | |
| ➤ Cuivre | 0,0001 | |
| ➤ Zinc | 0,004 | |
| ➤ Iode | 0,003 | |
| ➤ Acide citrique | 2 | |
| Constituants divers (vitamines, enzyme, gaz dissous) | | traces |
| Extrait sec total | | 127 |
| Extrait sec non gras | | 92 |

I.3. Le Yaourt

I.3.1. Définition

Selon la FAO (Food and Agriculture Organization) /OMS (Organisation Mondiale de Santé) (1977), le yaourt est un lait coagulé obtenu par la fermentation lactique acide due à *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* du lait pasteurisé ou concentré avec ou sans addition de lait en poudre, les microorganismes du produit final doivent être viables et abondants (Ndiaye, 2002).

La législation de nombreux pays exige que les bactéries du yaourt soient vivantes dans le produit mis en vente. D'autres pays admettent qu'à la suite d'un traitement thermique destiné à améliorer la durée de conservation le produit ne contient plus de bactéries vivantes. Cette pratique n'est pas recommandable car elle modifie la priorité du yaourt (Les colloques, 1996)

I.3.2. Fabrication du yaourt

Elle repose sur la transformation du lait sous l'action de bactéries lactiques thermophiles (organismes qui vivent dans des conditions optimales à des températures élevées, supérieures à 55°C). Selon la méthode utilisée, on obtient différentes textures : ferme, brassée ou liquide (Figure 1).

Entièrement automatisée, la fabrication dans l'industrie laitière évite aujourd'hui les manipulations humaines. Pour schématiser, on peut distinguer 3 grandes étapes :

❖ La préparation du lait

Le lait livré à l'usine est plus ou moins écrémé pour faire, selon les cas, des yaourts maigres, des yaourts au lait entier.

Une fois sa composition harmonisée et sa teneur en matière grasse ajustée dans une écrémeuse, il est dégazé à 60°C pour éliminer les mauvaises odeurs. Puis il est homogénéisé, cette opération qui consiste à fragmenter les globules de crème en minuscules particules améliore la consistance du lait, accroît sa blancheur et rend les lipides plus digestes.

Le lait est ensuite pré-pasteurisé quelques secondes à 75°C avant d'être refroidi à 5°C. A ce stade, on peut le renforcer en poudre de lait (pour augmenter sa consistance), y ajouter des arômes et du sucre. Le mélange est finalement pasteurisé (5min à 93°C) afin de détruire les éventuelles bactéries

❖ L'ensemencement

C'est l'apport des deux catégories suivantes de bactéries lactiques vivantes qui provoquent la fermentation du lait :

- *Lactobacillus bulgaricus* qui apporte au yaourt son acidité
- *Streptococcus thermophilus* qui développe les arômes

Une obligation pour les yaourts : leurs bactéries doivent êtreensemencées simultanément et se trouver vivantes dans le produit fini, à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme de yaourt.

❖ La fermentation

Pour les yaourts fermes, le mélange est versé dans les pots, immédiatement operculés, suremballés, mis en palette et étuvés.

Pour les yaourts brassés ou à boire, le mélange est d'abord étuvé avant d'être conditionné.

Dans les deux cas, le principe est identique : l'étuvage dure 3h à une température de 42°C.

Les bactéries se reproduisent par millions et transforment alors une partie du sucre contenu dans le lait en acide lactique. Cette transformation s'appelle la fermentation lactique. La production d'acide lactique acidifie le lait, ce qui entraîne sa coagulation (le mélange s'épaissit) et le développement des arômes. Au bout des 3h, le yaourt est fait.

Une rapide réfrigération à + 4°C va finalement permettre de bloquer l'acidité et de maintenir la coagulation dans l'état de consistance souhaitée. Il ne reste plus qu'à le stocker en entrepôt frigorifique entre 2° et 4° C (1).

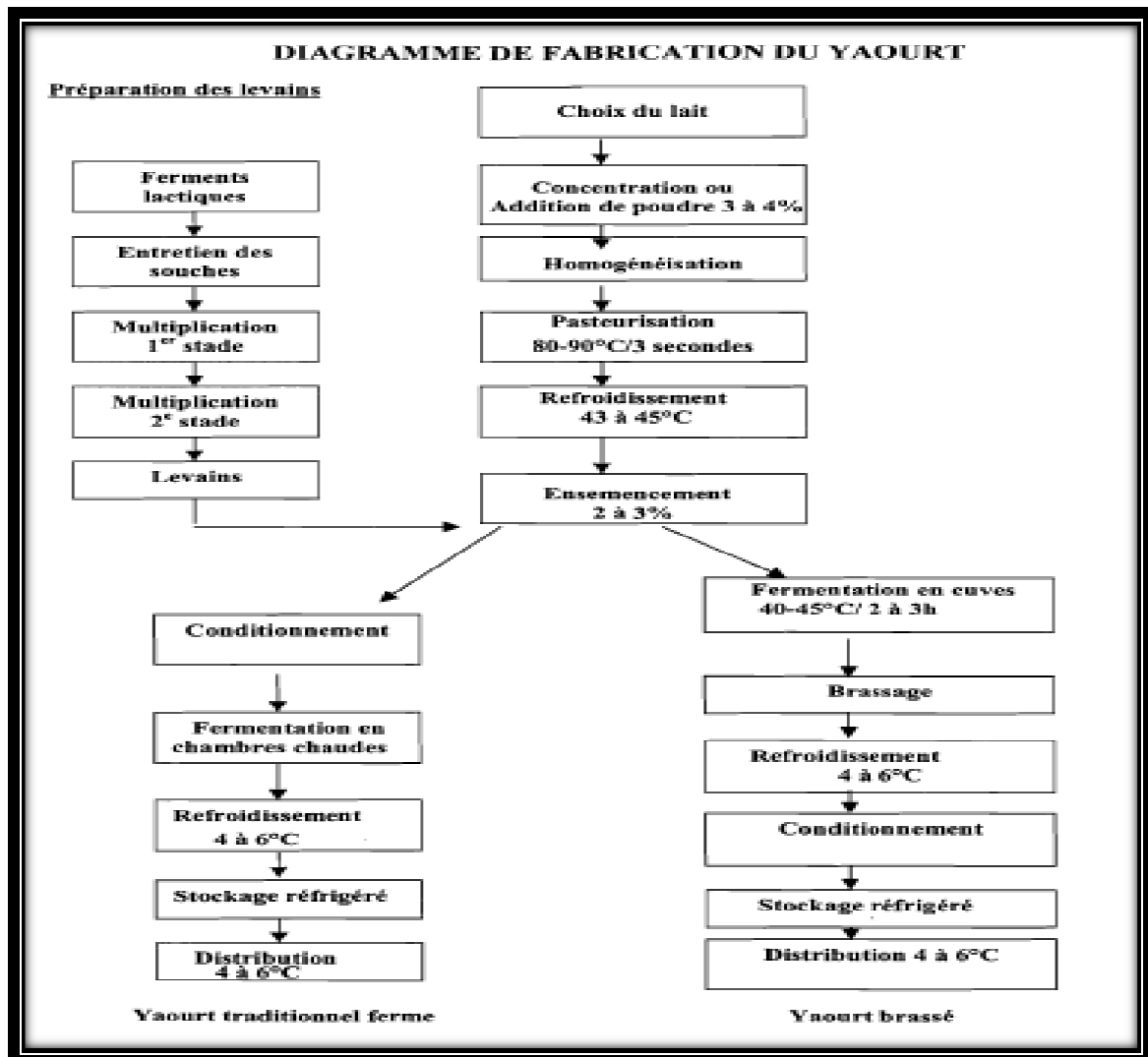


Figure 1 : Fabrication du Yaourt (Ndiaye, 2002).

I.3.3. Importance du Yaourt

La transformation du lait en yaourt répond à plusieurs objectifs :

- assurer la conservation des propriétés nutritionnelles du lait utilisé;
- éliminer les micro-organismes pathogènes et d'altération;
- augmenter la digestibilité du lait et sa valeur biologique.

Les yaourts favorisent un bon équilibre de la flore intestinale chez l'enfant. Ils préviennent l'obésité et l'hyper lipoprotéïnémie, contribuent à la guérison des maladies intestinales et confèrent la longévité à ses consommateurs.

Les ferments lactiques du yaourt se sont montrés capables de dégrader les nitrosomes : substances hautement cancérigènes.

En outre des travaux récents suggèrent que le yaourt serait plus efficace que le lait pour maintenir une cholestérolémie basse et une stimulation plus importante de la fonction immunitaire (Ndiaye, 2002).

I.4. Le fromage

Les fromages résultent de transformations complexes du lait par les micro-organismes. C'est un produit obtenu par la coagulation du lait suivie d'un égouttage du coagulum (figure2). Il est essentiellement constitué d'un gel de caséine retenant les globules gras et une partie plus ou moins importante de la phase aqueuse du lait.

I.4.1. Fromage frais

Le fromage frais « Jben » ne présente pas de caractéristiques définies à cause des méthodes artisanales utilisées pour sa préparation reposant, essentiellement, sur les connaissances acquises à partir d'une longue expérience (Salmeron *et al.*, 2002).

Les arômes, les propriétés organoleptiques et les caractéristiques physico-chimiques du fromage dépendent de celles du lait cru qui à son tour dépend de la race des animaux et leur type d'alimentation.

Généralement, Le pH (<4,2) et l'acidité titrable (> 0,9%) sont les paramètres les moins variables du « Jben ». Cependant, les matières solides totales du « Jben » sont le facteur le plus variable car ce dernier dépend de la durée d'égouttage. Étant donné que les lipides, le lactose et les protéines constituent les principaux composants de l'ensemble des matières solides en « Jben », ils sont directement influencés par les variations des dites matières solides (Benkerroum et Tamime, 2004).

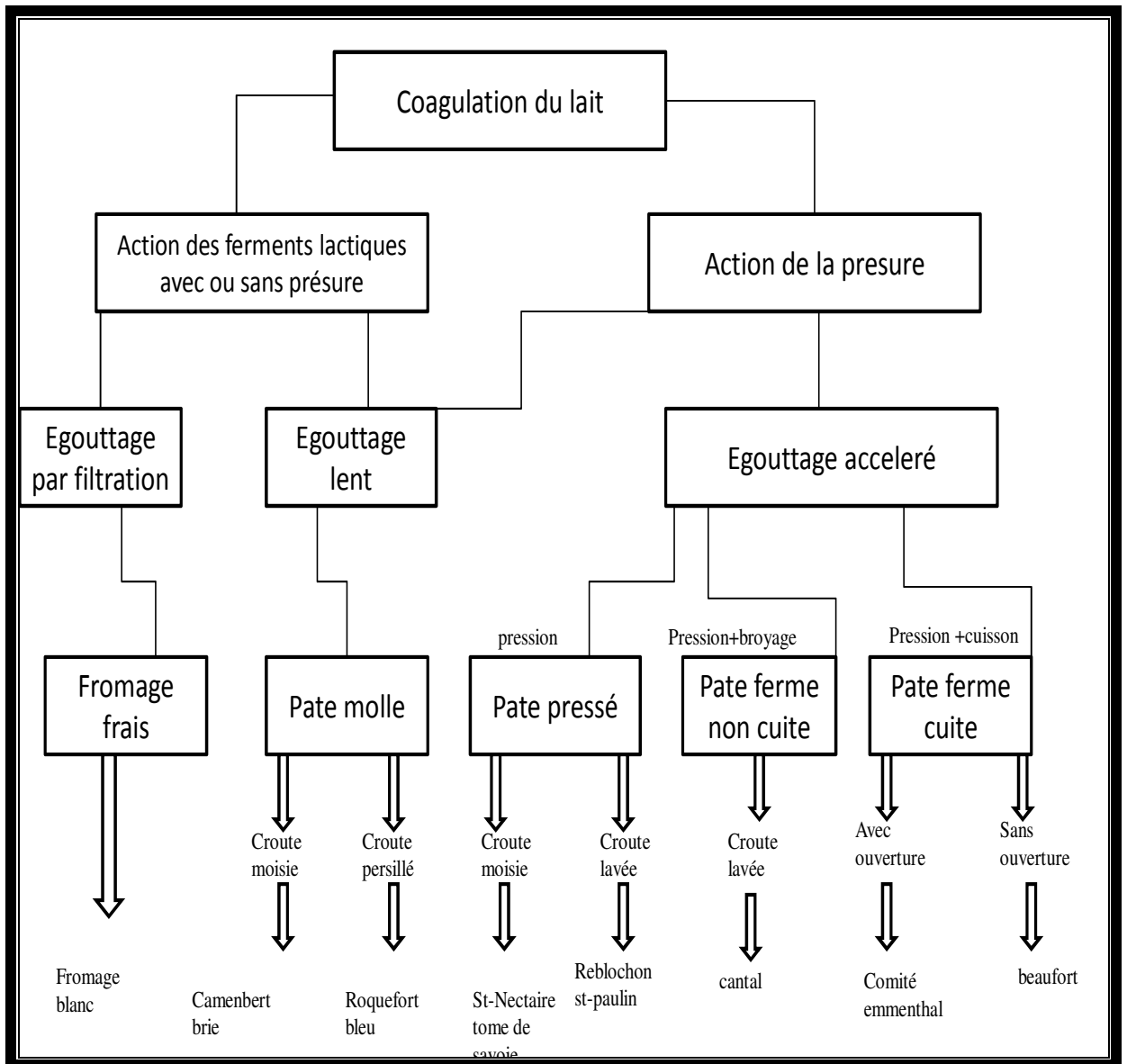


Figure 2 : Fabrication des principaux types de fromage (Leyral et Vierling, 2007).

CHAPITRE II :

Les bactéries lactiques

II.1. Origine des bactéries lactiques

Les bactéries ont été utilisées dans la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans sans autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité.

La première culture pure était des *Bacterium lactis* – probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par Lister en 1873. Historiquement, les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* ont été les premiers à être décrits.

D'un point de vue technologique, les genres cités ci-après sont considérés comme les principaux des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella* (Axelsson, 2004).

II.2. Définition

Le groupe des bactéries lactiques, a été défini pour la première fois par Orlandi (1919), réunit plusieurs genres caractérisés par leurs capacités à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (Novel, 1993).

Les bactéries lactiques sont des coques ou des bâtonnets, Gram positif, immobiles, non sporulées, catalase négative et généralement nitrate réductase négative. Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides.

Lorsque l'acide lactique est le seul produit terminal, il s'agit des bactéries lactiques homofermentaires (Certaines espèces peuvent produire au moins 18 moles d'acide lactique par mole de glucose fermenté). Parfois, en plus de l'acide lactique, d'autres composés constitués principalement d'acide acétique, d'éthanol et de gaz carbonique sont produits : c'est le cas des hétérofermentaires (produisent uniquement 1 mole d'acide lactique par mole de glucose fermenté).

Les bactéries lactiques sont aéro-anaérobies facultatives ou micro-aerophile.

Le manganèse joue un rôle important pour les bactéries lactiques en les protégeant de la toxicité de l'oxygène. Accumulé dans la cellule, cet élément est comparable au superoxyde dismutase qui décompose les superoxydes.

Elles ont des besoins complexes en facteurs de croissance, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques, des vitamines B et des acides gras. C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait (Novel, 1993).

II.3. Habitat

Les bactéries lactiques sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'Homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (Klein *et al.*, 1998).

II.3.1. Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement

Dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages, ect...). Les différentes espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) et/ ou *L. garvieae*, les plus rencontrées dans le lait et le fromage, sont communément utilisées comme ferments (« starter culture ») par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers. Un ferment désigne un microorganisme, bactérie ou champignon, responsable de la fermentation. Aussi, les bactéries lactiques sont à l'origine de la fermentation utilisée pour la préparation de boissons à partir de plantes (boza, cidre, ect...). Parmi elles, on distingue des espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc*.

Acidotolérantes, les bactéries lactiques sont capables de survivre dans des milieux très acides en raison de leur production d'acide lactique. De plus, l'acidification du milieu participe à l'inhibition de la croissance de certains microorganismes pathogènes, tels que *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). Cette espèce bactérienne pathogène présente dans les aliments (lait, fromage, boissons) est responsable d'infections graves comme la listériose chez l'Homme, qui affectent en particulier la femme enceinte (Gálvez *et al.*, 2011).

II.3.2. Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte

Les bactéries lactiques peuvent vivre en symbiose entre elles et avec un hôte. La symbiose est une association intime et durable entre deux organismes hétérospécifiques (espèces différentes), parfois plus.

Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis*, pathogène responsable de la trichomonase vaginale (Ruiz et al., 2009) et/ ou *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite.

II.4. Culture des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques demandent des milieux riches en différents nutriments pour croître (sucres, acides aminés, acides gras, sels, vitamines) et pauvres en oxygène (Hammes et Hertel, 2006).

Elles sont essentiellement cultivées dans le milieu Man Rogosa Sharpe (MRS). Le MRS est un milieu riche qui offre aux bactéries à culture difficile différentes sources de carbone et d'azote, telles que les peptones, le glucose et le Tween 80. Le Tween 80 était initialement utilisé comme émulsifiant dans la préparation des milieux de culture avant d'être considéré comme source de carbone pour les bactéries.

II.5. Taxonomie des bactéries lactiques

La classification des levures, des bactéries, des virus et des protistes est basée sur la taxonomie polyphasique. Ce terme est apparu dans les années 70 défini par Colwell et se réfère à une taxonomie basée sur un large ensemble de critères regroupant les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques (Pot, 2008).

De nombreuses classifications des bactéries lactiques ont été proposées. Parmi elles, figure la classification selon la composition de la paroi cellulaire bactérienne, incluant la nature des acides gras, tels que l'acide lactobacillique (C19:0) et les acides gras insaturés (C14:0, C16:0, C18:0) qui la composent (Tableau II) (Gilarová et al., 1994).

Une autre classification, basée sur les différents modèles de fermentation du glucose définit 3 groupes (McLeod et al., 2008).

- Le groupe I renferme les bactéries réalisant exclusivement l'homofémentation. Ce groupe comporte majoritairement des *Lactobacillus*.
- Le groupe II inclut les bactéries réalisant l'hétérofémentation et regroupe les *Leuconostoc*, les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*.
- Le groupe III regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce groupe présente une position intermédiaire entre le groupe I et II réalisant ainsi l'homofémentation ou l'hétérofémentation selon les conditions environnementales (McLeod et al., 2008).

Il existe aussi l'étude de la composition en base de l'ADN (GC%). Le contenu GC% des bactéries lactiques varie d'une espèce à une autre :

Streptococcus (Str) = GC% = 34-46%

Pediococcus (Pd) = GC% = 34-42%

Leuconostoc (Ln) = GC% = 36-43%

Lactobacillus (Lb) = GC% = 32-53% (Leveau et Bouix, 1993).

Les études d'hybridation ADN / ADN, puis des structures et des séquences d'ARN ribosomiaux sont aussi devenues depuis quelques années des éléments essentiels permettant l'identification et ainsi la classification taxonomique des bactéries lactiques.

L'homologie entre les souches est établit par des techniques d'hybridation c'est le cas des espèces *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* et *Streptococcus diacetylactis*, leur génome s'hybride fortement de 66-100 % selon les souches (Leuveau et Bouix, 1993).

Une étude basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S et/ ou 23S des bactéries lactiques propose une classification en 3 groupes restreinte à certaines bactéries lactiques : groupe des *Leuconostoc*, groupe des *Lactobacillus delbrueckii* (*L. delbrueckii*) et groupe des *L. casei-Pediococcus* (Rodrigues *et al.*, 2006).

Tableau II : La classification fonctionnelle des bactéries lactiques (Orla Jensen, 1919).

| <i>Formes</i> | <i>Hétéro-fermentaire</i> | <i>Homo-fermentaire</i> |
|------------------|---|---|
| <i>Bâtonnets</i> | <p><i>Betabactérium :</i></p> <p><i>Lactobacillus brevis</i></p> <p><i>Lactobacillus kefis</i></p> | <p><i>Streptobactérium :</i></p> <p><i>Lactobacillus casei</i></p> <p><i>Lactobacillus plantarum</i></p> <p><i>Thermobactérium :</i></p> <p><i>Lactobacillus delbrueckii</i></p> <p><i>ssp. Bulgaricus</i></p> <p><i>ssp. Lactis</i></p> <p><i>Lactobacillus helveticus</i></p> <p><i>Lactobacillus acidophilus</i></p> |
| | <p><i>Leuconostoc lactis</i></p> <p><i>Leuconostoc mesenteroides</i></p> <p><i>ssp. Cremoris</i></p> | <p><i>Streptococcus thermophilus</i></p> <p><i>Lactococcus lactis</i></p> <p><i>ssp. Lactis</i></p> <p><i>ssp. Diacétylis</i></p> <p><i>Pediococcus sp.</i></p> |

Thermophiles

CHAPITRE III :

Les bactériocines

III.1. Généralité sur les bactériocines

Au fil de l'évolution, les organismes se sont dotés de systèmes de défense pour lutter contre les infections. Certains de ces systèmes reposent sur la synthèse de peptides antibactériens tels que les défensines chez les mammifères, les magainines chez les amphibiens et les cératoxines chez les insectes.

Le règne bactérien ne fait pas exception et de nombreuses bactéries ont développé ce type de stratégie pour avoir un avantage adaptatif et ainsi coloniser plus facilement leur environnement. Les bactéries lactiques, utilisées dans de nombreux procédés alimentaires, limitent les contaminations des aliments par les germes indésirables. Cette capacité est liée à la synthèse de molécules antibactériennes telles que des acides organiques, notamment l'acide lactique, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines.

L'homme utilise depuis longtemps, consciemment ou non, les propriétés antibactériennes des bactéries lactiques. Ces propriétés se sont avérées être intéressantes pour la conservation des aliments dans lesquels cette flore se développe. Les bactéries lactiques inhibent le développement de certains micro-organismes grâce à la synthèse de molécules antibactériennes parmi lesquelles se trouvent les bactériocines (Jasniewski, 2008)

III.2. Définition

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

Les bactériocines présentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action.

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 (Kleanhammer, 1988).

III.3. Classification

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993). Ces quatre classes sont :

III.3.1. Classe I : Les lantibiotiques : peptides de poids inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils 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).

Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticin 3147 (Figure 3).

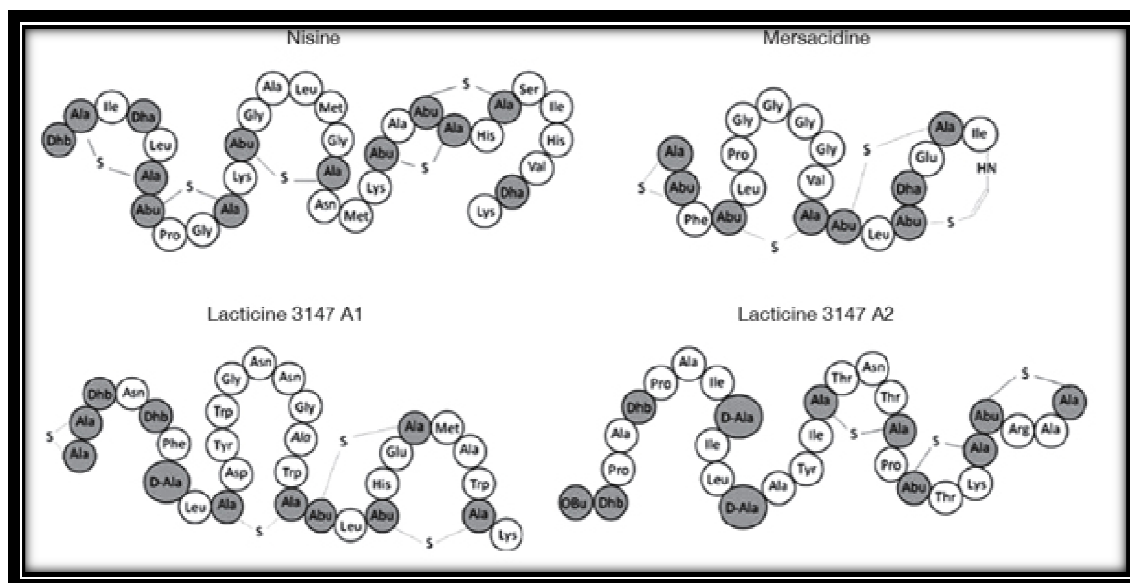


Figure 3 : Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique «two-peptides» (Lacticine 3147 A1 et A2) (Dortu et Thonart, 2009).

III.3.2. Classe II : Peptides de poids inférieur à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10 (Tableau III). Cette classe est divisée en trois sous-classes.

- Les bactériocines de la sous-classe **IIa** 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. Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (Richard *et al.*, 2006).
- La sous-classe **IIb** comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (Enhancing) où la fonction d'un des deux peptides est

- d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (Synergy) où les deux peptides sont complémentaires.
- La sous-classe **IIc** contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes.

Tableau III : Séquence de quelques bactériocine de classe II (Nigutova *et al.*, 2007)

| Classe IIa: « Pediocin-like bacteriocin » | |
|---|---|
| Mésentéricine Y105 | MTNMKSVEAYQQLDNQNLKVVGGKYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAASAGIHRLANGGNGFW |
| Sakacine P | -----MEKFIELSLKEVTAITGGKYYGNGVHCGKHSCTVDWGTAIGNIGNNAAANWATGWNAGG |
| Curvacine A | -----MNNVKELSMTELQTITGGARSYGNVYCNKKCVNVRGEATQSIIGGMISGWASGLAGM |
| Piscicoline 126 | -----MKTVKELSVKEMQLTTGGKYYGNGVSCNKNCTVDWSKAIGIIGNNAAANLTTGGAAGWNKG |
| Carnobactériocine Bml | -----MKSVELNKKEMWINGGAI SYGNVYCNKEKCVNKAENKQAITGIVIGGWASSLAGMGH |
| Pédiocine PA-1 | -----MKKIEKLTEKEMANIIGGKYYGNGVTCGKHSCTVDWGKATTTCIINNAMAWATGGHQGNHKC |
| Entéroccine A | -MKHLKILSIKETWLIYGGTTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGMSIGGLGGAI PGKC |
| Sakacine G | -----MKNTRSLTIQEIKSITGGKYYGNGVSCNSHGCSVNWQAWTCGVNHLANGGHGGVC |
| Classe IIb: « Two-peptides bacteriocin » | |
| ABP-118 | α KRGPNCVGNFLGGLFAGAAAGVPLGPAGIVGGANLGMVGGALTCL |
| | β KNGYGGSGNRWVHCAGIVGGALIGAIGGPWSAVAGGISGGFTSCR |
| Lactocine 705 | α MDNLNKFKKLSDNKLQATIGG |
| | β MESNKLEKFANISNKDLNKITGG |
| Lactococcine MN | M IRGTGKGLAAAMVSGAAMGGAIGAFGGPVGAIMGAWGGAVGGAMKYSI |
| | N GSIWGAIAAGGAVKGAIAASWTGNPVGIGMSALGGAVLGGVTYARPVH |
| Plantaricine EF | E FNRGGYNFGKSVRHVVDAIGSVAGIRGILKSIR |
| | F VFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVRGFING |
| Classe IIc | |
| Plantaricine A | MKIQIKGMKQLSNKEMQKIVGGKSSAYSLQMGATAIKQVKKLFKKWGW |
| Lactococcine A | MKNQLNPNIVSDEELSEANGGKLTFIQSTAAGDLYYNTNTHKYVYQQTQNAFGAAANTIVNGWMMG AAGGFGLHH |
| Lactococcine 972 | MKTKSLVLALSAVTLFSAAGGIVAQAEGTWQHG YGVSSAYSNYHHGSKTHSATVVNNNTGRQGKDTQ RAGVWAKATVGRNLTEKASFYYNFW |

III.3.3. Classe III : Protéines de poids supérieur 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.

Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Nigutova *et al.*, 2007).

III.3.4. Classe IV : Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite.

III.4. Quelques exemples de bactériocines de bactéries lactiques

Chez les bactéries lactiques, tous les genres comportent des souches productrices de bactériocines, dont quelques exemples sont cités dans le tableau IV. Si jusqu'à vers la fin des années 1980, seuls les lactobacilles, les lactocoques et les pédiocoques avaient révélé la présence de bactériocines (Klaenhammer, 1988), ces dernières années ont vu la découverte de nombreuses souches de *Leuconostoc* et de *Carnobacterium* présentant des activités antagonistes.

Tableau IV : Exemple de bactériocines synthétisées par *Streptococcus* (*Lactococcus* et *Streptococcus thermophilus*) et *Lactobacillus* (Nigutova et al., 2007)

| Classe de bactériocine | Bactériocines | Producteur |
|---|------------------|--|
| Classe I : Lantibiotiques | Bactériocine J46 | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i> J46 |
| | Lacticine 3147 | <i>Lactococcus lactis</i> DPC3147 |
| | Lactocine S | <i>Lactobacillus sakei</i> L45 |
| | Nisine A | <i>Lactococcus lactis</i> NIZO5 |
| | Nisine Z | <i>Lactococcus lactis</i> NIZO22186 |
| | Plantaricine C | <i>Lactobacillus plantarum</i> C |
| Classe II : Peptide non modifiés | Acidocine J1132 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132 |
| | Brévicine | <i>Lactobacillus brevis</i> |
| | Diacétine B | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Diacetylactis</i> UL720 |
| | Gasséricine B3 | <i>Lactobacillus gasseri</i> JCM2124 |
| | Lactobine A | <i>Lactobacillus amylovorus</i> LMG P-13139 |
| | Lactocine 705 | <i>Lactobacillus casei</i> CRL 705 |
| | Lactococcine G | <i>Lactococcus lactis</i> LMG2081 |
| | Thermophiline 13 | <i>Streptococcus thermophilus</i> Sfi13 |
| Classe III : protéines | Acidophilucine A | <i>Lactobacillus acidophilus</i> LAPT1060 |
| | Hélvéticine J | <i>Lactobacillus helveticus</i> 481 |
| | Lacticine A et B | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 1 106 et 1 107 |

III.5. Biosynthèse des bactériocines

Plusieurs étapes sont nécessaires à la production d'une bactériocine mature par une bactérie. L'induction de la biosynthèse, la transcription en ARN et la traduction en protéines des différentes composantes du système de biosynthèse, la modification des acides aminés dans le cas des lanthionines, la maturation est finalement le transport de la bactériocine vers l'extérieur de la cellule constituent les différentes étapes de biosynthèse.

Les gènes de biosynthèse des lantibiotiques ont été désignés par le symbole commun (Lan), avec un nom plus spécifique pour chaque lantibiotique (Nis pour nisine) (Dortu et Thonard ,2009).

III.5.1. Mécanisme de production des bactériocines et sa régulation

Les bactériocines sont généralement produites à la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de la croissance. elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice ou être absorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration des bactériocines dans la culture. Les facteurs influençant la production des bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de la fermentation employée.

Différentes protéines sont impliquées dans la production des bactériocines et leur régulation. Les bactériocines des bactéries lactiques sont exprimées sous forme d'un pré-peptide inactif dont l'extension N-terminale ou peptide leader, est clivé pour libérer les bactériocines au cours de la maturation. Cette maturation se déroule pendant ou immédiatement après la sécrétion de la molécule. C'est donc la pré-bactériocine qui est reconnue par la (ou les) molécule(s) qui va transférer le peptide à travers la membrane bactérienne (Dortu et Thonard, 2009).

La production de bactériocines est souvent régulée par un système de (Quorum sensing), un mécanisme permettant à certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité de la population bactérienne (Luquet et Corrieu, 2005).

III.5.2. Le transport des bactériocines

Les deux dernières étapes de la production du lantibiotique, dont l'ordre peut varier, sont le clivage du peptide leader et le transport du peptide (ou du pré-peptide) vers l'extérieur de la cellule. Pour les lantibiotiques à peptide leader FNLDV, la protéine qui s'en charge du clivage du pré-peptide est une sérine protéase de type subtilisine.

Pour la nisine, cette protéase, nis P, possède une séquence signal en position N terminal assurant sa sécrétion par la voie générale sec et une extension d'encrage à la

membrane en position C terminal. Cela suggère que nis P est sécrétée puis fixée à la partie externe de la membrane cellulaire, par son ancre lipidique (Van der meer *et al.*, 1993).

La sécrétion du prépeptide ou du peptide est assurée par une protéine qui appartient à la famille des transporteurs de type ABC. Pour la nisine, c'est la protéine membranaire Nis T qui remplit ce rôle. Elle doit avoir une forme homodimérique pour être fonctionnelle (Siegers *et al.*, 1996).

La fonction du signal (Leader) pourrait être de garder le lantibiotique inactif jusqu'à sa sortie de la cellule. Il pourrait aussi permettre de faciliter les interactions entre le transporteur et /ou les protéines de modification du peptide.

Dans le cas de la cytolysine, les prépeptides subissent deux clivages qui ont lieu, l'un dans la cellule, l'autre après la sécrétion. Le premier clivage est réalisé par le transporteur de type ABC, CylT qui clive le prépeptide après le motif doublet glycine. La deuxième maturation dans la partie N terminal des prépeptides est réalisé par CylP, protéase à serine de type subtilisine. Cette protéase possède une séquence signal reconnue par le système de sécrétion général sec, mais ne présente pas de domaine d'ancrage à la membrane et mature donc les peptides à l'extérieur de la cellule (Booth *et al.*, 1996).

III.5.3. Immunité

Les bactéries productrices pouvant être sensibles à leur propre bactériocine, elles se prémunissent à l'aide d'une protéine qualifiée «d'immunité». Le seul modèle élaboré pour les bactéries lactiques a été proposé par (Venema *et al.*, 1995).

La protéine d'immunité, une protéine possédant un large domaine transmembranaire pourrait interagir avec le récepteur potentiel de la bactériocine et empêcherait ainsi l'insertion de cette dernière dans la membrane. Alternativement ou de façon complémentaire, la protéine d'immunité pourrait également interagir directement avec la bactériocine. Certains faits troublants ont été rapportés à propos de la localisation cellulaire de la protéine d'immunité. Celle-ci a été trouvée de façon largement majoritaire dans le cytoplasme (Quadri *et al.*, 1995), ce qui, non seulement, remet en cause le modèle

évoqué ci-dessus mais ne permet plus de comprendre facilement le rôle exact de cette Protéine.

Dans certains cas, une protéine d'immunité spécifique est seule responsable de la protection de la souche, dans d'autres cas, cette protection est assurée par un transporteur de type ABC, et enfin parfois, les deux systèmes sont présents simultanément.

Pour la nisine, les deux systèmes participent à l'immunité, la protéine d'immunité codée par *nisI* et le transporteur de type ABC codé par *nisFEG*. *NisI* est une lipoprotéine ancrée à la membrane cytoplasmique et orientée vers l'extérieur de la cellule (Morisset *et al.*, 2005).

Le mécanisme d'action de *nisI* reste encore hypothétique. *Nis I* pourrait titrer les molécules de nisine ou pourrait perturber l'association de ces dernières en les empêchant ainsi de former des pores membranaires. Il semble que le transporteur ABC formé par *nisF*, *nisE* et *nisG* réécréterait la nisine localisée dans la membrane, mécanisme qui serait facilité par une interaction entre les molécules de nisine et *nisI* (Figure 4). Pour le système lactocine S, c'est le produit du gène *lasJ* qui serait impliqué dans l'immunité (Morisset *et al.*, 2005).

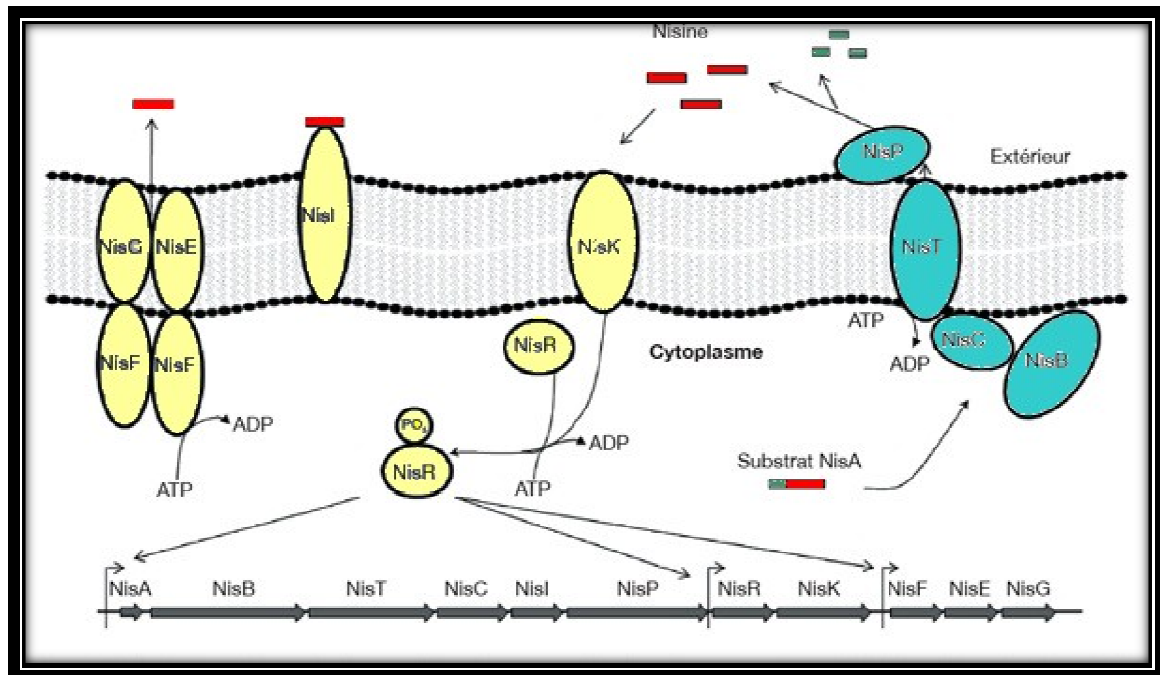


Figure 4 : Régulation de la production, modifications post-traductionnelles et auto-immunité de la nisine : le substrat NisA est le prépeptide non biologiquement actif qui sera déshydraté par NisB et cyclisé par NisC avant sa translocation par l'ABC transporteur NisT et le clivage de la séquence signal par la protéase NisP. Ces modifications conduiront au peptide biologiquement actif. La nisine interagira avec l'histidine kinase NisK, ce qui induira la phosphorylation du régulateur de réponse NisR et l'activation de la transcription des gènes nécessaires à la production de la nisine. La protection de la cellule vis-à-vis de la nisine est réalisée par deux mécanismes : la lipoprotéine d'immunité NisI et l'ABC transporteur formé par NisG, NisE et NisF (Patton *et al.*, 2005).

III.6. Mécanismes d'action des bactériocines

Le mécanisme d'action des bactériocines des bactéries lactiques est étudié depuis une quinzaine d'année. Il se diffère selon les classes.

III.6.1. Classe I : (les lantibiotiques)

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tel que : le lipide II, un précurseur de peptidoglycanes.

Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tel que les ions, les acides aminés, l'ATP ...etc cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la PMF, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. L'interaction avec le lipide II permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de réduire la concentration du lantibiotique nécessaire à la formation des pores, mais peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (Patton *et al.*, 2005).

Les lantibiotiques de type A dissipent la PMF par formation des pores et interfèrent avec la synthèse des peptidoglycanes alors que la plupart des lantibiotiques de type B agissent par inhibition de la synthèse des peptidoglycanes.

III.6.2. Classe II : (Peptides non modifiés)

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de sous classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou le récepteur spécifique, la « mannose perméase » pour former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane et la mort de la cellule. Le mécanisme de formation de pore n'est pas connu même si l'hypothèse la plus courante est l'assemblage de différentes molécules de la bactériocine (Diep *et al.*, 2007).

Les pores formés par les bactériocines de classe IIa causent la perte d'ions potassium ainsi que d'acides aminés et d'autres molécules de faible poids moléculaires, ce qui dissipe les deux composantes de la PMF.

Les bactériocines de sous classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactéries Gram+. Elles forment des pores et rendent la membrane

perméable à différentes petites molécules, des cations monovalents ou des anions, ce qui dissipe une ou les deux composantes de la PMF.

Néanmoins, les mécanismes d'interaction des deux bactériocines entre elles et avec la membrane cellulaire ne sont que très peu connus. Il a été montré qu'il n'y avait pas de liaisons au même récepteur que pour les bactériocines des sous classe IIa (Diep *et al.*, 2007).

III.6.3. Classe III : (Les protéines)

Le mode d'action des bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. En effet, certaines d'autres elles agissent par l'hydrolyse des liens peptidiques des peptidoglycane des cellules sensibles, alors que l'helvéticine J a un mode d'action bactéricide (Nilsen *et al.*, 2003).

III.7. Domaines d'applications des bactériocines

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme sûres, sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes. Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogène ou d'altération sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide (Galvez *et al.*, 2007).

Les bactériocines doivent cependant être considérés comme un moyen de préservation complémentaire à ceux existant.

III.7.1. Utilisation alimentaire

Les bactériocines sont employées dans plusieurs domaines. Leur utilisation dans le domaine alimentaire est devenue très intéressante grâce à leur potentiel d'assurer une sécurité microbienne et une bonne qualité du produit alimentaire (Benech *et al.*, 2002). L'utilisation des bactériocines comme additifs naturels dans les aliments a suscité l'intérêt du consommateur qui cherche à minimiser l'utilisation des additifs chimiques artificiels dans les produits alimentaires.

Plusieurs études ont montré l'efficacité de la nisine en tant qu'agent de conservation dans les aliments comme la truite fumée, les produits à base d'œufs liquides pasteurisés les fromages et d'autres produits laitiers (Delves-Broughton *et al.*, 1996).

En effet, la nisine est la plus étudiée des bactériocines et la seule utilisée commercialement dans les produits alimentaires. Elle a été commercialisée pour la première fois comme conservateur alimentaire en Grande Bretagne il y a plus de 30 ans. Son utilisation a été tout d'abord établie comme préservateur dans les produits de fromage fondus, et depuis de nombreux d'autres applications alimentaires. En Europe, des recherches ont démontré le potentiel de la nisine à contrôler la détérioration de la bière et du vin par les bactéries lactiques.

D'autres études récentes ont exploité les bactériocines des bactéries lactiques comme bio-ingrédients antimicrobiens naturels pour la conservation à long terme de produits marins prêts à consommer. Ces chercheurs ont démontré que l'utilisation de la souche *Carnobacterium divergens* ou de sa bactériocine, la divergicine M35, a permis de contrôler la croissance de *Listeria monocytogenes* et de *Clostridium botulinum* pendant 21 jours d'entreposage à 4°C. De même aucun effet négatif n'a été observé au niveau des caractéristiques organoleptiques et sensorielles du saumon fumé traité (Jedidi, 2007).

D'autres études ont montré l'utilisation des bactériocines comme agent antimicrobien dans l'emballage des produits carnés. Des sacs enduits de pédiocine ont permis d'inhiber complètement la croissance de *Listeria monocytogenes* inoculés dans divers produits carnés conservés pendant douze semaines à 4°C.

Afin de s'assurer de l'efficacité des bactériocines utilisées pour des applications alimentaires en tant que préservateurs, un conservateur alimentaire doit avoir les propriétés suivantes :

- être actif sur les micro-organismes pathogènes aussi bien que sur ceux responsables des altérations des aliments;
- être inoffensif pour les humains ou les animaux;
- être stable et non détruit au contact de l'aliment ou du micro-organisme;
- être rapidement soluble et distribué uniformément dans l'aliment;

- ne pas être inactivé par l'aliment, ni conférer de saveur ou d'arôme à l'aliment;
- être économique;
- ne pas favoriser l'apparition de micro-organismes résistants;
- ne pas diminuer la valeur nutritive de l'aliment.

III.7.2. Utilisation médicale et vétérinaire

Il y a très peu d'études attribuées aux bactériocines dans le domaine médical et vétérinaire.

Dans l'industrie porcine, deux stratégies sont proposées afin de contrer les infections à *Streptococcus suis*, une bactérie pathogène à Gram positif colonisant les voies respiratoires supérieures du porc et pouvant causer des infections chez l'humain, soit la vaccination ou l'utilisation d'antibiotiques.

Ces derniers soulèvent de plus en plus de craintes face à l'apparition de résistances bactériennes pouvant ultérieurement engendrer des conséquences néfastes pour l'humain. À cet effet, des études récentes (Fédération des producteurs de porcs du Québec) visent à utiliser les bactériocines qui pourraient servir d'alternatives aux antibiotiques pour le traitement des maladies infectieuses tant chez l'humain que chez l'animal.

Une étude récente a montré la capacité de quelques souches de bactéries lactiques (*Lactobacillus et Pediococcus*) isolées à partir de l'intestin de porcs de survivre pendant leur passage tout au long du tractus gastro-intestinal et de pouvoir inhiber la croissance de *Salmonella*.

De même, ces auteurs ont suggéré que l'inhibition de souches de *Salmonella* est due à une possible production de bactériocine par la souche *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*.

Récemment, des études ont démontré le potentiel des bactéries productrices de bactériocines pour la prévention de certains types d'infections bactériennes chez l'humain.

Des chercheurs du Canadian Research and Development Center for Probiotics, ont noté une diminution significative du risque d'infections vaginales et intestinales chez les femmes suite à l'implantation de bactéries du genre *Lactobacillus*.

Le mécanisme d'action de ces bactéries serait lié, entre autre, à la production de bactériocines actives contre les pathogènes.

Il faut noter qu'il y a peu d'études rapportées dans la littérature sur la production in vivo des bactériocines et sur leur efficacité au niveau du tractus gastro-intestinal, notamment leur résistance à différents types de stress digestifs tels que l'acidité dans l'estomac et la bile dans l'intestin.

De plus, peu d'études sont disponibles sur l'impact de l'ingestion de souches probiotiques bactériocinogènes sur l'équilibre de la microflore intestinale. En effet, l'addition directe de bactériocines ou l'utilisation de souches productrices de bactériocines permettra de diminuer l'incidence de certaines bactéries indésirables, pathogènes au niveau du tube digestif (Jedidi, 2007).

Partie
Expérimentale:



***MATERIEL ET
METHODES***

Matériel et méthodes

L'intégralité de ce travail a été réalisée dans les laboratoires de microbiologie et de biochimie du département de Science de la Nature et de la Vie à l'Université 8 Mai 1945 à Guelma durant la période Janvier-Avril 2013.

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

- Contribution à l'étude des bactéries lactiques
- Isolement et identification des bactéries lactiques à partir d'un produit de laitier (Yaourt et fromage frais) ;
- Etude de l'effet antagoniste des bactéries isolées vis-à-vis de certaines bactéries pathogènes.

I. Matériel

I.1. Echantillons biologiques Nos essais ont porté sur un échantillon de fromage frais et 4 échantillons du Yaourt :

- fromage frais (soummam)
- Activia (danone),
- Acti + (soummam),
- Nature (ramdy),
- Nature (soummam).

I.2. Les souches indicatrices

Il s'agit de six souches indicatrices représentées par les espèces suivantes :

- *Enterococcus faecalis* ;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ;
- *Klebsiella pneumoniae*;
- *Escherichia coli* ATCC 25921;
- *Escherichia coli* 2 ;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire de Bactériologie de l'hôpital IBN ZOHR de la ville de GUELMA.

I.3.Appareillage

- Agitateur magnétique ;
- Autoclave ;
- Bain-marie ;
- Balance de précision ;
- Bec benzene;
- Centrifugeuse (Sigma 2-16K) ;
- Etuves (30° C., 37° C., 45° C.) ;
- Microscope photonique ;
- pH mètre ;
- Réfrigérateur ;
- Spectrophotomètre (Jenway 6305).

I.4 .Produits chimiques et réactifs

Les produits chimiques et réactifs utilisés au cours de cette étude sont les suivants :

- a) - Les colorants : Violet de Gentiane, fuschine, Bleu de méthylène et Lugol.
- b) Les réactifs :
 - Eau physiologique ;
 - Ethanol 95° ;
 - Huile de paraffine ;
 - Disques d'oxydase ;
 - Eau oxygénée ;
 - Glycérol ;
 - HCl 1 N ;
 - NaOH 1 N ;

I.5. Milieux de culture

Notre travail comporte plusieurs étapes successives où chacune a nécessité son propre matériel et spécialement en milieux de culture. Ces derniers ont été préparés au laboratoire avant leur utilisation. (AnnexeI)

I.5.1. Milieux d'isolement

- **Milieu M17** : Ce milieu convient pour l'isolement des coques lactiques (Patton *et al.*, 2005).
- **Milieu MRS** : Utilisé pour l'isolement des lactobacilles (Patton *et al.*, 2005).

I.5.2. Milieu pour la conservation : bouillon BHIB et glycérol. .

I.5.3. Milieu pour l'étude de l'antagonisme

Gélose Mulher Hintone (MH) et gélose Nutritive.

II. Méthodologie

II.1. Isolement des bactéries lactiques

A partir du Lactosérum de chaque échantillon, 2 gouttes sont prélevées et déposées sur les géloses M17 et MRS préalablement fondues, coulées sur boîtes de Pétri et solidifiées. (Figure 5)



Figure 5 : Prélèvement du Lactosérum à partir d'un échantillon de yaourt.

Par la suite, à l'aide d'une pipette pasteur stérile on a ensemencé les boîtes avec le lactosérum. Ces derniers ont été incubés à 37°C pendant 24 à 48 h. (figure 6)



Figure 6 : Ensemencement en stries sur milieu gélosé

II.2. Purification :

C'est la phase la plus importante car elle permet l'obtention de résultats fiables. Pour cela plusieurs étapes sont nécessaires.

A partir des boîtes retenues, nous procédons directement à la coloration de Gram afin d'identifier les Gram positifs.

La vérification de l'absence de catalase et oxydase est aussi une opération nécessaire.

Les colonies ayant répondu à ces deux critères seront soumises à un repiquage après avoir noté la morphologie. L'ensemencement est réalisé en surface et en stries.

Trois repiquages successifs sont réalisés jusqu'à ce que l'observation microscopique nous révèle l'homogénéité et la conformité des cellules au profil morphologique des bactéries lactiques.

II.3. Conservation :

Vu la non disponibilité des réactifs indispensables à l'identification des souches purifiées, il s'est avéré nécessaire de les conserver. Cette étape est importante pour maintenir leur viabilité (Miteva *et al.*, 1998).

Chaque souche purifiée a été mis dans un eppendorf contenant le bouillon M17/MRS et du glycérol, les tubes sont conservés à -20°C. (Figure 7)



Figure 7 : Préparation des tubes avant conservation.

II.4. Identification des bactéries lactiques

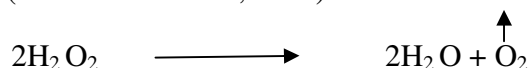
II .4.1.Caractères cultureux et morphologiques

Une observation macroscopique de l'aspect des colonies est effectuée (couleur, taille, forme et contour...) dans le but de différencier les colonies suspectes. Les cellules sont ensuite examinées au microscope optique pour différencier leur morphologie et leur disposition après coloration de Gram.

II.4.2. Tests préliminaires

❖ Test de la catalase

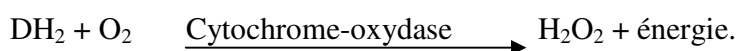
La catalase est une enzyme qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène (Bouix et Leuveau, 1980).



La technique consiste à déposer une colonie de la culture à tester sur une goutte d'eau oxygénée. Si les bactéries examinées possèdent une catalase, on observe un dégagement immédiat de bulles gazeuses (Alomar, 2005).

❖ Recherche d'une cytochrome oxydase

La cytochrome oxydase est le dernier transporteur d'électron dans la chaîne respiratoire. Elle catalyse le transport d'hydrogène sur l'oxygène moléculaire pour produire de l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



La technique consiste à utiliser des disques (OX) commercialisés par l'institut Pasteur, ces disques sont imprégnés de l'oxalate de diméthyle paraphénylène diamine, ce composé est oxydé par le système cytochrome C des bactéries dites oxydase positive en un composé violet.

En pratique, le disque est imbibé avec une ou deux gouttes d'eau distillée stérile et une parcelle de culture prélevée à l'aide d'une anse de platine puis étalée sur le disque. La présence d'oxydase se manifeste alors par le développement d'une **coloration violette** (Alomar, 2005).

❖ Test de mobilité

Il permet de caractériser les bactéries lactiques qui sont généralement immobiles.

- Technique :

Des tubes de milieu gélose mannitol mobilité sontensemencés avec les souches tests par piqûre centrale puis incubés à 30° C pendant 48 h.

- Lecture

Un développement tout au long de la piqûre sans envahissement du milieu témoigne de l'immobilité des souches (Leuveau et Bouix, 1993).

❖ Type fermentaire

Ce test se traduit par un dégagement de CO₂ caractéristique des espèces hétéro fermentaires (Coppola *et al.*, 1997).

- Technique :

Des tubes ont été remplis par 10 ml de bouillon Elliker avec une cloche de Durham et l'ensemble a été stérilisé par autoclavage. Par la suite, les tubes ensemencés ont été incubés à 30°C pendant 24h.

- Lecture

La présence de bulles gazeuses dans la cloche témoigne d'un métabolisme hétéro fermentaire pour les souches ensemencées et le contraire indique un métabolisme homo fermentaire.

❖ Croissance à différentes températures

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles.

- Technique :

Inoculation du bouillon MRS et M17 par les cultures pures, une série de tubes sont ensuite incubés pendant 24h à 48h à 45°C et une autre série à 60°C.

- Lecture

La présence d'un trouble indique une croissance bactérienne.

II.4.3. Identification biochimique

Les bactéries Gram positives, catalase et oxydase négatives ont fait l'objet d'une analyse biochimique par le système API bioMérieux en utilisant la galerie API 50CH avec API 50 CHL medium (bioMérieux, Marcy l'étoile, France). L'ensemencement et la lecture de la galerie ont été réalisés comme suit :

- Cultiver la souche pure sur milieux MRS et M17 gélosés 24h à 30°C,

- Ouvrir une ampoule de Suspension medium (2 ml), prélever toutes les colonies de la culture, à l'aide d'une pipette pasteur stérile, et réaliser une suspension dense dans l'ampoule,

- Ouvrir une ampoule de Suspension medium (5ml) et réaliser une opacité égale à 2 McFarland en transférant un certain nombre de gouttes de la première suspension, noter ce nombre de gouttes (n),
- Ouvrir une ampoule de API 50 CHL Medium et inoculer avec deux fois le nombre de gouttes trouvées (2n), homogénéiser,
- Répartir API 50 CHL ainsi inoculé dans les tubules, et recouvrir avec de l'huile de paraffine stérile, (Figure 8)

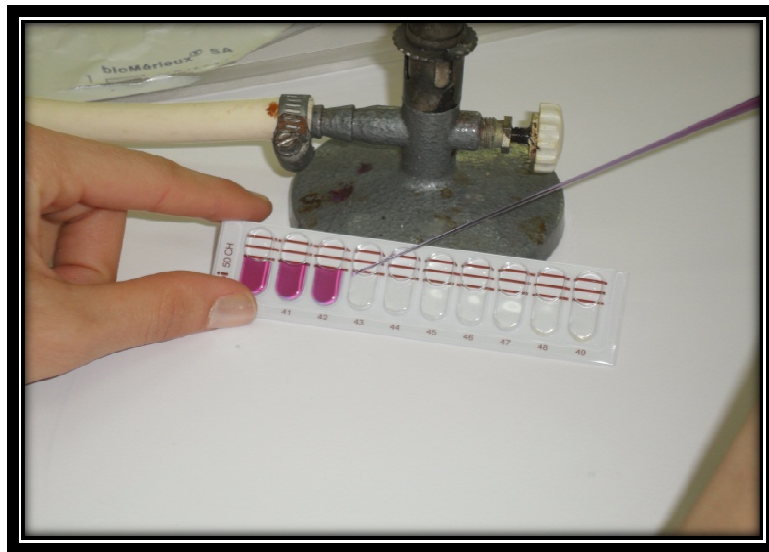


Figure 8 : Remplissage des tubules de l'API 50 CHL.

- Incuber à 30°C en aérobiose pendant 48h.
- Tous les tests sont lus à 24h et 48h (on recherche dans chaque tubule l'acidification produite qui se traduit par le virage au jaune du pourpre bromocrésol contenu dans le milieu. Pour le test esculine, on observe un virage du pourpre au noir),
- Enregistrer les résultats obtenus,
- Le profil biochimique ainsi obtenu peut être lu grâce à un logiciel d'identification APILAB (bioMérieux, Marcy l'étoile, France).

II.5. Etude de l'antagonisme bactérien

Les bactéries lactiques inhibent le développement de certains micro-organismes grâce à la synthèse de molécules antibactériennes parmi lesquelles se trouvent les bactériocines (Jasniewski, 2008).

II.5.1. Mise en évidence de la production de bactériocines

Dans cette étape de la partie expérimentale, nous mettrons en évidence la sensibilité ou la résistance des germes pathogènes tests vis-à-vis des bactériocines éventuellement produites par les bactéries lactiques en utilisant la méthode des puits

Avant de procéder à cette méthode il faut éliminer l'effet du peroxyde d'hydrogène par l'ajout d'une couche d'huile de vaseline (Souded et Teggour, 2004).

Méthode des puits

Technique :

- Des cultures pures des bactéries lactiques sont préalablement réalisées sur des boîtes contenant les géloses M17 et gélose MRS.
- Préparation des suspensions des souches tests de 0,5McFarland.
- Des suspensions des 11 bactéries lactiques de 2 Mcfarland sont aussi préparées.
- Ensuite, inondation des boîtes Pétri contenant du MH avec une épaisseur de 4mm avec les suspensions des souches tests précédentes.
- Elimination l'excès des suspensions à l'aide des écouvillons.
- Réalisation des puits de 6mm de diamètre sur toutes les boîtes.
- Puis, à l'aide d'une pipette Pasteur on a remplis ces puits avec les suspensions des bactéries lactiques supposées contenir des bactériocines.
- Culture : incubation des boîtes à 37°C pendant 24h.

Lecture :

Considéré comme positif, toutes souches présentent un diamètre d'inhibition (Dembelle *et al*, 1998).

*RESULTATS ET
DISCUSSION*

III. Résultats et Discussion

III.1. Isolement et d'identification

III.1.1. Isolement

Après les différentes étapes d'isolement, d'enrichissement et enfin de purification, nous avons obtenu au total 11 souches (Tableau V).

Tableau V: Résultats d'isolement des bactéries lactiques à partir du yaourt et du fromage frais

| Milieu de culture | Echantillons | Aspect macroscopique | Aspect microscopique |
|-------------------|--------------------|---|---|
| M17 | Activia(2) | Très fines colonies arrondies, lisses à contour régulier de couleur blanche crème. | Cocci de couleur violette (Gram+) regroupée en chaînettes en diplocoque. |
| | Fromage frais | Colonies fines arrondies, bombée à contour régulier de couleur jaunâtre. | Petits bâtonnets de couleur violette (Gram+) regroupés en chaînettes. |
| | Acti+ (1) | Petite colonies arrondies, à contour régulier, un peu bombées de couleur blanche crème. | Cocci de couleur violette (Gram+) regroupées en chaînettes en diplocoque. |
| | Nature Soummam(1) | Très fines colonies arrondies, lisses à contour régulier de couleur blanche crème. | Cocci de couleur violette (Gram+) regroupée en chaînettes en diplocoque. |
| | Activia (3) | Petite colonies arrondies, à contour régulier, un peu bombées de couleur blanche crème. | Cocci de couleur violette (Gram+) regroupée en chaînettes en diplocoque. |
| | Activia (1) | Colonies ronde, lenticulaire, lisse à contour régulier de couleur blanche. | Cocci de couleur violette (Gram+) regroupées en amas. |
| | Nature Soummam (2) | Très fines colonies arrondies, lisses à contour régulier de couleur blanche crème. | Cocci de couleur violette (Gram+) regroupée en chaînettes en diplocoque. |

| | | | |
|------------|------------------|--|--|
| | Acti+ (2) | Petites colonies rondes, lisse à contour régulier de couleur jaunâtre. | Petits bâtonnets de couleur violette (Gram+) regroupés en chaînettes. |
| | Ramdy | Très fines colonies arrondies, lisses à contour régulier de couleur blanche crème. | Cocci de couleur violette (Gram+) regroupée en chaînettes en diplocoque. |
| MRS | Fromage frais(1) | Très fines colonies arrondies, lisses à contour régulier de couleur blanche crème. | Cocci de couleur violette (Gram+) regroupée en chaînettes en diplocoque. |
| | Fromage frais(2) | Très fines colonies arrondies, lisses à contour régulier de couleur blanche crème. | Cocci de couleur violette (Gram+) regroupée en chaînettes en diplocoque. |

L'examen microscopique après coloration de Gram nous a permis de différencier l'aspect morphologique des bactéries isolées ainsi que leurs arrangements. On a constaté une prédominance des coques lactiques (fig9) par rapport lactobacilles (fig10) dans les différents échantillons.

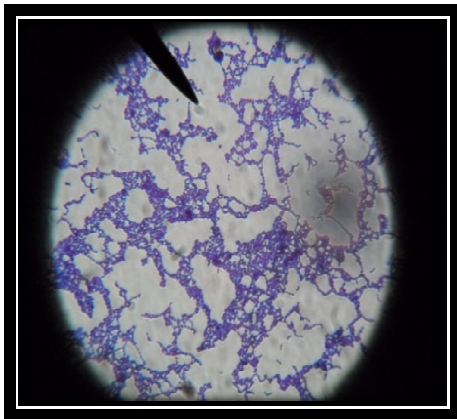


Figure 9 : Coques lactiques isolés à partir du yaourt sur milieu M17.

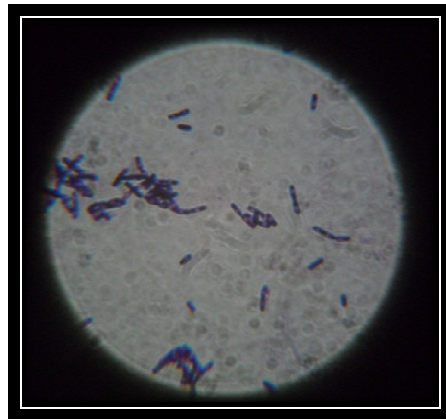


Figure 10 : Lactobacilles isolés à partir du yaourt sur milieu M17.

III.1.2. Identifications biochimiques

❖ Test de la catalase

Pour toutes les colonies testées, le test de la catalase était négatif autrement dit qu'il y a absence de bulles gazeuses en contact avec l'eau oxygénée.

❖ Test de l'oxydase

Le test de l'oxydase était également négatif, les disques d'oxydase sont restés incolores.

❖ Test de la mobilité

Toutes les bactéries testées se sont développées uniquement le long de la piqûre centrale, généralement toutes les bactéries lactiques sont immobiles.

Le reste des tests d'identification des souches lactiques est illustré dans le tableau VI.

Tableau VI: Résultats des tests d'identification des bactéries isolées.

| caractère | Numéro de la souche | | | | | | | | | | |
|---------------------|---------------------|--------|------|------|------|--------|------|--------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Mobilité | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Type fermentaire | Homo | hétéro | Homo | homo | homo | hétéro | Homo | hétéro | homo | homo | homo |
| Culture à 4% NaCl | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| Culture à 6,5% NaCl | + | - | / | / | / | / | - | - | / | + | / |
| Croissance à 45°C | + | - | + | + | + | - | + | - | + | + | + |
| Croissance à 63°C | + | - | + | + | + | - | + | - | + | + | + |
| pH 9,6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Les résultats des tests biochimiques obtenus montrent clairement que les bactéries isolées répondent aux caractéristiques des bactéries lactiques qui sont : immobiles, Gram positif, catalase négatif, oxydase négative.

Ces résultats montrent également que les bactéries B1, B3, B4, B5, B7, B9, B10 et B11 se caractérisent par un métabolisme homofermentaire (qui transforme le glucose en acide lactique) et capable de croître à 45°C et sont thermorésistantes à 63°C pendant 30min, il s'agit donc de bactéries thermophiles qui sont fortement sensibles au NaCl.

Les bactéries B2, B6 et B8 apparaissent sous forme de bacilles, elles possèdent un métabolisme hétérofermentaire (produisent en plus de l'acide lactique d'autres produits de la fermentation et du gaz carbonique), capables de croître aux températures 37 °C mais pas à 45°C, il s'agit donc de bactéries mésophiles.

III.2. Identification par Api 50CHL

Les 11 souches provenant du yaourt ont été identifiées par API 50CHL, les résultats obtenus figurent sur le tableau VII. D'après ces résultats et selon la base de l'indice I.D, on peut classer ses isolats comme suite :

- Les isolats n° 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10 et 11 : *Streptococcus thermophilus*
- L'isolat n°2 : *Lactobacillus plantarum*
- L'isolat n°8 : *Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii*
- L'isolat n°6 : *Lactococcus lactis ssp lactis*

Tableau VII : Résultats d'identification des souches lactiques par l'Api 50 CHL.

| Souches | Identification API 50CHL | % I.D |
|---------|---|-------|
| B 1 | <i>Streptococcus Thermophilus</i> | 99,2 |
| B 2 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 99,9 |
| B 3 | <i>Streptococcus Thermophilus</i> | 75,3 |
| B 4 | <i>Streptococcus Thermophilus</i> | 99,2 |
| B 5 | <i>Streptococcus Thermophilus</i> | 99,2 |
| B 6 | <i>Lactococcus Lactis</i> ssp <i>Lactis</i> | 97,9 |
| B 7 | <i>Streptococcus Thermophilus</i> | 99,2 |
| B 8 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>delbrueckii</i> | 75,3 |
| B 9 | <i>Streptococcus Thermophilus</i> | 99,2 |
| B 10 | <i>Streptococcus Thermophilus</i> | 99,2 |
| B 11 | <i>Streptococcus Thermophilus</i> | 99,2 |

**Figure 11** : Résultats d'identification de *Sterpococcus thermophilus* par l'Api 50 CHL.

III.3. Résultats de l'antagonisme :

Les diamètres d'inhibition figurent dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Résultats d'antagonisme de la méthode des puits.

| Souches | <i>E.coli</i> 2 | <i>E.coli</i> ATCC | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>S.aureus</i> ATCC | <i>Pseudomonas aerogenosa</i> |
|----------------------------|-----------------|--------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| <i>S.thermophilus</i> (1) | 6 | 6 | 6 | 17 | 6 | 6 |
| <i>L.plantarum</i> 1 (2) | 6 | 6 | 6 | 6 | 14 | 6 |
| <i>S.thermophilus</i> (3) | 8 | 9 | 6 | 22 | 6 | 6 |
| <i>S.thermophilus</i> (4) | 6 | 6 | 6 | 20 | 6 | 6 |
| <i>S.thermophilus</i> (5) | 6 | 6 | 6 | 19 | 6 | 6 |
| <i>L.lactis</i> (6) | 6 | 6 | 6 | 6 | 13 | 6 |
| <i>S.thermophilus</i> (7) | 6 | 6 | 6 | 15 | 6 | 6 |
| <i>L.delbrueckii</i> (8) | 6 | 6 | 6 | 10 | 14 | 6 |
| <i>S.thermophilus</i> (9) | 6 | 6 | 6 | 6 | 10 | 6 |
| <i>S.thermophilus</i> (10) | 6 | 6 | 6 | 19 | 6 | 6 |
| <i>S.thermophilus</i> (11) | 6 | 6 | 6 | 21 | 6 | 6 |

Selon Dembelle *et al.* (1998), toute souche présentant un diamètre d'inhibition supérieur à 6 mm est considéré comme positif vis-à-vis de la souche test.

L'estimation de l'activité d'une bactériocine par la méthode de diffusion est relative, car la sensibilité de la bactérie cible, le milieu de croissance utilisé, la concentration d'agar du milieu test, ainsi que la concentration en bactériocine sont tous des facteurs pouvant affecter les résultats, indiquant que l'activité inhibitrice des bactériocines se mesure en Unités Arbitraires (UA) (Meghrou *et al.*, 1999).

Les résultats obtenus montrent que les bactéries lactiques isolées ne présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis les souches tests utilisées. Il a été constaté un effet antagoniste des souches *S.thermophilus* (1, 3, 4, 5, 7,10, 11) envers *Enterococcus faecalis* avec des diamètres d'inhibition (17, 22, 20, 19, 15, 19 et 21mm) respectivement et aussi un effet antagoniste vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ou la plus grande zone est de 10mm de diamètre.

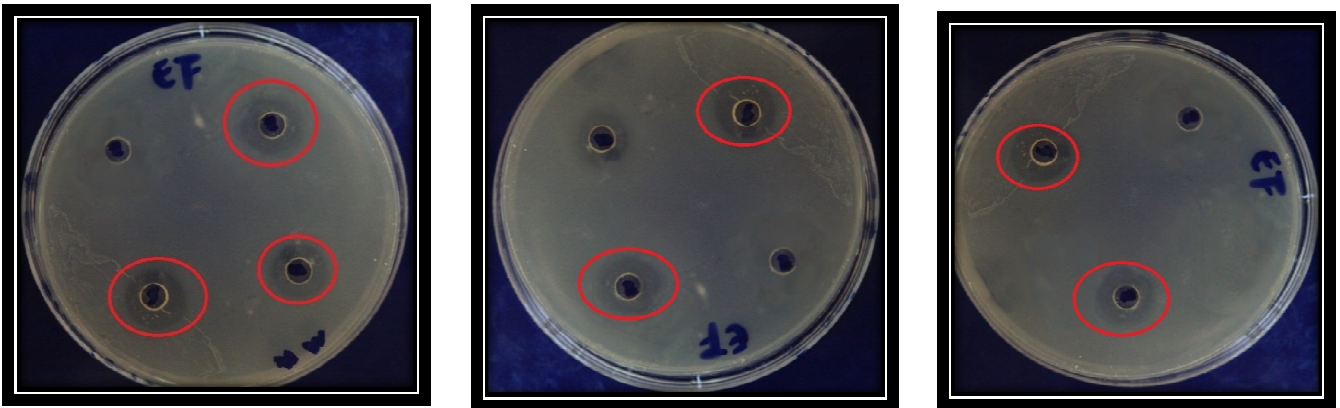


Figure 12: Effet antagoniste des souches *S.thermophilus* vis-à-vis d'*E.feacalis*

Les bactéries à Gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des bactéries lactiques (Onda *et al.*, 2003). En effet, une bactériocine présente généralement un spectre d'action étroit, souvent limité aux espèces proches de l'espèce qui la produit (Atrih, 1994).

La souche *S.thermophilus* (3) isolé a partir du yaourt Acti+ présente un effet inhibiteur vis-à-vis les bactéries *E.coli* 2 et *E.coli* ATCC avec des zones d'inhibition 8 et 9 mm respectivement.

D'après la littérature les bactériocines de la souche *S.thermophilus* n'exercent aucun effet d'inhibition de croissance des bactéries à Gram négatif sauf quelques rares exceptions. (Dortu et Thonart, 2009)

La souche *L.plantarum* 1 présente une inhibition envers *S.aureus* avec un diamètre de 14mm .En effet, elles inhibent certaines bactéries à Gram positives (Atrih, 1994) et manifeste aussi une action inhibitrice contre des bactéries lactiques (Rekhif, 1992).

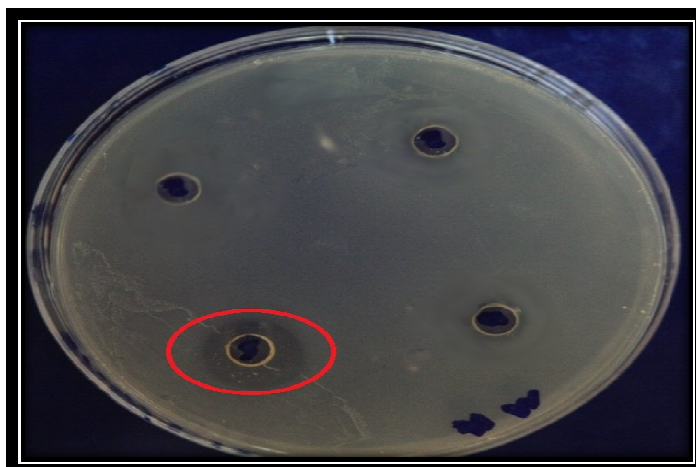


Figure 13 : Effet antagoniste de la souche *L.plantarum* 1 vis-à-vis de *S.aureus*

La souche *L.lactis* présente un effet inhibiteur envers *S.aureus* avec un diamètre de 13 mm.

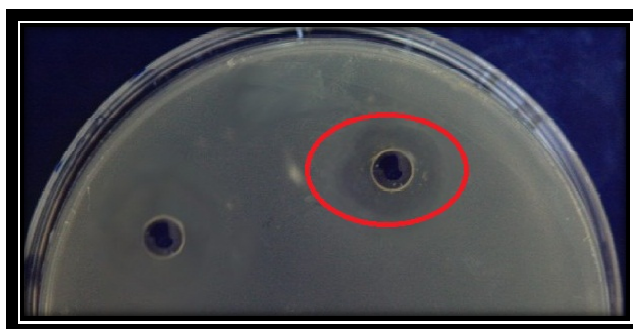


Figure 14 : Effet inhibiteur de la souche *L.lactis* vis-à-vis de *S.aureus*

En effet, *L.lactis* peut produire de nombreux bactériocines actives vis-à-vis de *S.aureus* mais ne présente aucune activité inhibitrice par rapport aux bactéries à Gram négatif telles que *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *P.aeruginosa*, ce qui est tout à fait logique puisque plusieurs études ont montrés l'absence ou bien la faible activité antibactérienne des bactériocines de *L.lactis* contre les bactéries à Gram négatif (Dortu et Thonart, 2009).

La souche *L.delbrueckii* présente une inhibition envers *S.aureus* et *E.feacalis* avec un diamètre de 14 et 10mm respectivement.

Metiva *et al.* (1998) ont montré que *L.delbrueckii* inhibe la croissance de plusieurs bactéries telles que *S.aureus*, *E.feacalis*, *E.coli*.

Les résultats d'Alomar *et al.*, (2007) ont validé l'hypothèse de l'inhibition de *S. aureus* par les souches de *Lactobacillus* par production de peroxyde d'hydrogène. Nos résultats montrent aussi que le peroxyde d'hydrogène n'est pas le seul inhibiteur car les résultats d'inhibition sont obtenus en absence du peroxyde mais celle-ci reste relativement faible parce que le plus grand diamètre est de 14mm avec les souches *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus delbrueckii*.

La faible activité des bactéries lactiques envers les Gram négatif est due à l'incapacité des bactériocines à traverser les membranes plasmiques de ces derniers à cause de leur poids moléculaire élevé ou aux propriétés hydrophobes (Rodrigues *et al.*, 2006).

Dans l'ensemble nos résultats sont proches de ces études réalisées dans ce domaine néanmoins les différences entre les zones d'inhibition pourrait s'expliquer par la quantité de bactériocines produites d'une part et d'autre part par la possible résistance des souches tests, ces constatations ont été rapportés par Richard *et al.*, (2006).

CONCLUSION

Les bactéries lactiques sont la catégorie de microorganismes la plus utilisée dans la production de produits alimentaires contribuant ainsi à la texture et au goût des produits fermentés. Par ailleurs, la production par ces bactéries de métabolites tels que les peptides antimicrobiens et l'acide lactique, permet d'inhiber la prolifération des microorganismes pathogènes et d'assurer ainsi une bonne conservation des aliments.

Cette étude nous a permis au début d'avoir une idée sur la composition de la flore microbiologique en bactéries lactiques de différents échantillons du yaourt. Ces produits montrent une combinaison entre les espèces bactérienne qui se diffère selon la marque de ces derniers.

Au total 11 souches ont été identifiées par galerie classique et API 50CHL. La comparaison des résultats d'identification obtenus dans ce travail avec ceux des travaux sur des produits similaires, permet de conclure que le yaourt contient essentiellement: *streptococcus thermophilus* et *lactobacillus bulgaricus*.

En plus, ce travail nous a permis d'étudier le pouvoir antagoniste de ces souches lactiques vis-a-vis de : *Enterococcus faecalis* ; *Staphylococcus aureus* ATCC ; *Klebsiella pneumoniae* ; *Escherichia coli* ATCC ; *Escherichia 2* ; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC .

Les 11 souches ont montrées une activité inhibitrice entre les souches précédemment citées qui ont données des zones d'inhibition différentes.

Des études complémentaires sont nécessaires pour compléter ce travail. Nous recommandons de procéder à :

- l'étude de la biosynthèse des bactériocines des bactéries lactiques, purification et étude structurale et la caractérisation biochimique de ces molécules;
- Etant donné que les membranes biologiques sont les principales cibles d'action des bactériocines, la caractérisation des différentes interactions entre les bactériocines et ses cibles biologiques demeure nécessaire sur le plan cognitif et appliqué, ceci par la compréhension du mode d'action et la maîtrise du phénomène de résistance qui limite l'application de ces bactériocines dans différents secteurs notamment le secteur agro-alimentaire;

- L'utilisation de ces bactériocines en tant que bio-ingrédient est limitée par l'émergence des populations résistantes à ces peptides. La compréhension du phénomène de résistance chez les souches cibles permettrait une utilisation mieux ciblée de la bactériocine seule ou en combinaison avec d'autres bactériocines;
- Il serait aussi intéressant dans la pratique d'étudier la biosynthèse et le mode d'action des bactériocines *in situ* où plusieurs facteurs peuvent agir sur leurs comportements.

Enfin, nous jugeons important d'effectuer des recherches qui vont s'intéresser à l'utilisation des bactéries lactiques non par en tant que souches naturelles mais modifiées génétiquement dans le but d'obtenir des souches plus résistantes, productrices de bactériocines et de molécules d'intérêt technologique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- . Alomar J. (2007). Etude de propriétés physiologiques de *Lactococcus Lactis* et *Lactococcus Garvieae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Lorraine : Nancy- université. France. P 91.
- . Atrih A. (1994). Study of bacteriocins produced by two strains of *lactobacillus plantarum*: characterization, purification, chemical structure and mode of action. These doctorat. Nancy. France. p 167. In (Alomar J.2007).
- . Axelsson L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A, Ouwehand AC (eds.) Lactic acid bacteria, Microbiological and functional aspects, 3rd ed. Marcel Dekker, New York, p 1–66.
- . Benech R.O., Kheard E.E., Lacroix C. et Fliss I. (2002). Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during cheddar cheese ripening, Appl. Environ. Microbio, 68, p 5607-5619.
- . Benkerroum N. Et Tamim A. (2004). Qualité hygiénique de l'Iben marocain. Microbio. Aliment Nutr.2: p199-206. In (Ouadghiri M.2009).
- . Ben yahya L., (2012). Etude du dialogue hôte /bactéries lactiques du yaourt chez des rats gnotobiotiques. Thèse de doctorat. Institut de sciences et industries du vivant et de l'environnement : Paris –université. France. p 293.
- . Booth M.C., Bogie C.P., Sahl H.G., Siezen R.J., Hatter K.L. et Gilmore M.S. (1996). Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. Mol Microbiol. 21, 1175-1184. In (Arbous L.2011).
- . Coppola S., Mauriello G., Aponte M., Moschetti G. et Villani F. (2000). Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. Meat Science. vol. 56, 321-329. In (Ho Thi Nguyet Thu. 2008).
- . Delves-Broughton J., Blackburn R. J., Evans P. et Hugenholtz J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie Van Leeuwenhoek, 69, p193-202. In (Galves A . 2007).

- . Dembelle T., Obdarzalek V. et Voltava M. (1998). Inhibition of bacterial pathogens by *Lactobacilli*. *Zent. Bl. Bacterial*, 288, p 395-401.

- . Diep D., Salehian Z., Holo H. et Nes I.F.(2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocin. *Proc. Natl Acad. Sci.*,104, p 2384-2389.

- . Dortu C. et Thonart Pr. P.(2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* , 13(1), p143-154. In (Arbous L.2011).

- . Fox P F. (1993). Cheese : an overview. In *cheese : chemistry, physics and microbiology*, pp. 1-36. Edited by P.F.Fox. London: Chapman and Hall. In (Penaud S. 2006).

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

- . Galvez A., Abriouel H., Lopez R.L. et Ben Omar N.(2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation.*Int. J. Food Microbiol.*, 120(1-2), p51-70.

- . Gilarová R.,VoldrichM., Demnerová K., Cerovský M., et Dobiás J. (1994). Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.*24: p315-319. In (Makhloufi K.2011).

- . Hammes W.P. et Hertel C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). *The prokaryotes*, Vol. (4).Springer Science and Business Media. New York, USA. p 320-403.

- . Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. et Brule G. (2007). *Science des Aliments : biochimie, microbiologie, procedes, produits. Technologie des produits alimentaires. Tec et Doc*, 2^{eme} Édition, Lavoisier, Paris, p7-26.

- . Jedidi H. (2007). Effet du stress gastro-intestinal sur la physiologie et le métabolisme des bactéries lactiques et probiotiques. Sciences et Technologie des Aliments. Université Laval Québec. P 30.

- . Jasniewski J. (2008). Etude des mécanismes d'action des bactériocines de la sous- classe IIa. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de LORRAINE : Nancy- université. France p 132.

- . Klaenhammer T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, p337-349.
In (Jasniewski J.2008).

- . Klaenhammer T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12(1-3), 39-85. In (Jasniewski J.2008).

- . Klein G., Pack A., Bonaparte C. et Reuter G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. vol. 41, p103-125.
In(Makhloufi K M.2011).

- . Les colloques, n°81. Quae, Paris. (1996). Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre, p 102.

- . Leuveau J.Y. et Bouix M. (1993). Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel, Lavoisier, p 611. In(Makhloufi K.2011).

- . Leyral G. et Vierling E. (2007). Rueil-malmaison, 4eme édition, Bordeaux. Hygiène et sécurité alimentaire, p 90.

- . Luquet F.M et Corrieu G. (2005). Bactéries lactiques et probiotiques. Edition Tec et Doc, Lavoisier, Paris. p113-174.

- . McLeod A., Nyquist O.L., Snipen L., Naterstad K. et Axelsson L. (2008). Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *SystAppl Microbiol.* 31: p393-403.

- . Meghrou, J., Lacroix, C. et Simard, R.E. (1999). The effects on végétative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 16: 105-114. In(Alomar J.2007).

- . Miteva V., Ivanova I. et Budakov I (1998).Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by a *Lactobacillus delbrueckii* strain 1043.*Journal of Applied Microbiology* 85, 603-615.

- . Morisset D., Berjeaud J.M., Frere J., Hiickson M. et Hechard Y. (2005). Bactériocines de bactéries lactiques, Bactéries lactiques et probiotiques. Ed. Tec-Doc. Lavoisier, Paris. p113-194.

- . Ndiaye M. (2002). Contribution a l'étude de conformité de l'étiquage de la qualité microbiologique de yaourt commercialiséa Dakar. Université Cheikh AntaDiop de Dakar. p2.

- . Nigutova K.,Morovsky M.,Pristas P et Holo H.(2007). Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram⁺cocci.*J. Appl. Microbiol.*, 102(2), p563-569. In (Dortu C.2008).

- . Nilsen T., Nes I.F. et Holo H.(2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol.*,69(5), p2975-2984.

- . Novel, G. (1993). Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. Et Doc. Lavoisier Paris, p 149. In (Bakhouche F.2006).

- . Onda T., Yanagida F., Tsuji M., Shinohara T. et Yokotsuka K. (2003). Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus ssp.* Strain GM005, isolated from Miso-paste. *Int. J. Food Microbiol.*, 87(1-2), 153-159.

- . Orla jensen S. (1919). The lactic acid bacteria in classification and physiology in lactic acid bacteria, (Teuber M.). In (Ayad, 2002).

. Patton G.C. & Van Der Donk W.A. (2005). New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, p543-551.

. Pot, B. (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu, G., and Luquet, F. M. (Eds). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*. Lavoisier. Paris, France p 1-152.

. Quadri L.X., Sailer M., Terebizdk M.R., Roy K.L., Vedem, J.C. et Stiles M.E. (1995). Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BMI. *J. Bacteriol.* 177(5), p1144-1151. In (Arbous L.2011).

.Rekhif N. (1992). Selection de souches de *Lactobacillus plantarum* productrices de bactériocines (plantaricines). Caractérisation, purification et mode d'action des plantaricines. Thèse de doctorat. P 210. In (Richard C .2006).

. Richard C., Canon R., Naghmouchi K., Bertrand D., Prevost H. et Drider D. (2006). Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class II bacteriocins. *Food Microbiol.* 23(2), p175-183.

. Rodrigues-Calleja J M., Otero A. et Garcia-Lopez M L. (2006). Molecular and phenotypic typing of *Staphylococcus aureus* isolats from rabbit meat. *Research in Microbiology* 157,496-502.

. Ruiz, F. O., Gerbaldo, G., Asurmendi, P., Pascual, L. M., Giordano, W. et Barberis, I. L. (2009) Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol.* 59: 497-501. In (Makhloufi K.2011).

. Salmeron, J., de Vega, C., Pérez-Elortondo, F. J., Albisu, M. et Barron, L.J.R. (2002). Effect of pasteurisation and seasonal variations in the microflora of ewe's milk for cheese making. *Food Microbiol.* 19: p167-174.

. Siegers K., Heinzmaan S. et Entian K.D. (1996). Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modification of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. *J Biol Chem.* 271, p12294-12301. In (Jasniewski J.2008).

. Souded S et Teggour L. (2009). Isolement et identification des souches de *Lactococcus* bactériocinogènes à partir du lait cru de vache et étude de leur antagonisme vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes. Thèse magistère. Université Mouloud Mammeri. Tizi-ouzou. P 78.

. Twomey D., Ryan M., Meaney B. et Hill C. (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, p165-185.

. Van Der Meer J.R., Polman J., Beerthuyzen M.M., Siezen R.J., Kuipers O.P. et De Vos W.M. (1993). Characterization of the *Lactococcus lactis* nisinA operon genes nis P, encoding a subtilisin-like serine protease involved precursor processing, and nisR, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J Bacteriol.* 175, p2578-2588. In (Jasniewski J.2008).

. Venema K., Venema G. et KOK J. (1995). Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends Microbio.* 3, 299-304. In (Jasniewski J.2008).

. Vignola L.C. (2002). *Science et Technologie du Lait : transformation du lait*. Presses internationales polytechniques, 1ère Ed. p1-141.

. Wijaya A., Neudeker C., Holzapfel W. et Franz C., 2006. Influence of bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* BFE 1071 on *Lactobacillus* spp. in the rat gastrointestinal tract. In: *Proceedings of Food Micro*, August 2006, University of Bologna, Bologna, Italy, 124.

. http://www.acreims.fr/editice/images/stories/STIBiotechnologie/SEANCE01_DOC_1_La_fabrication_industrielle_du_yaourt.pdf- 18/02/2013. 15h38.

Annexes

Annexe I

1- Milieu Elliker (Elliker, Anderson et Hannesson, 1956)

Composition

| | |
|--|--------|
| • Tryptone | 20,00g |
| • Extrait de levure déshydraté | 5,00g |
| • Gélatine | 2.50g |
| • Lactose | 5,00g |
| • Saccharose | 5,00g |
| • Glucose | 5,00g |
| • Acétate de sodium trihydraté (CH ₃ CO ₂ Na, 3H ₂ O) | 2.50g |
| • Chlorure de sodium (NaCl) | 4,00g |
| • Acide ascorbique | 0,50g |
| • Eau distillée | 1000ml |

Préparation

Dissoudre les composants dans de l'eau distillée, agiter à l'aide d'un agitateur magnétique, ajuster le pH à l'aide d'un pH mètre de sorte que le pH soit de 6.4, stériliser le milieu à 120°C pendant 20 min.

2- Milieu MRS : (de Man, Rogossa & Sharpe, 1960)

Composition

| | |
|--|---------|
| • Polypeptone | 10,00 g |
| • Extrait de viande | 10,00 g |
| • Extrait autolytique de levure | 5,00 g |
| • Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆) | 20,00 g |
| • Tween 80 (Sorbitane monoléate) | 1,08 g |
| • Phosphate dipotassique | 2,00 g |
| • Acétate de sodium | 5,00 g |
| • Citrate d'ammonium | 2,00 g |
| • Sulfate de magnésium | 0,20 g |
| • Sulfate de manganèse | 0,05 g |
| • Agar agar bactériologique | 15,00 g |
| • Eau distillée | 1000ml |

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau distillée, agiter à l'aide d'un agitateur magnétique, ajuster le pH, à l'aide des réactifs en utilisant un pH mètre de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,2 à 25°C. Répartir dans des flacons de 250ml et stériliser à 120°C pendant 15min (Leuveau et *al.*, 1991)

3- Milieu M17 : (Terzaghi & Sandine, 1975)

Composition

| | |
|---------------------------------|---------|
| • Tryptone | 2,50 g |
| • Peptone pepsique de viande | 2,50 g |
| • Peptone papaïnique de soja | 5,00 g |
| • Extrait autolytique de levure | 2,50 g |
| • Extrait de viande | 5,00 g |
| • Lactose | 5,00 g |
| • Glycérophosphate de sodium | 19,00 g |
| • Sulfate de magnésium | 0,25 g |
| • Acide ascorbique | 0,50g |
| • Agar-Agar | 15,00g |
| • Eau distillée | 1000ml |

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau distillée, agiter à l'aide d'un agitateur magnétique, ajuster le pH, à l'aide des réactifs en utilisant un pH mètre de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,1 à 25°C. Répartir dans des flacons de 250ml et stériliser à 120°C pendant 15min.

4- Bouillon hypersalé (6,5 % de NaCl)

Composition

| | |
|--|--------|
| • Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆) | 5,00g |
| • Extrait de viande | 5,00g |
| • Peptone | 15,00g |
| • Chlorure de sodium | 65,00g |
| • Eau distillée | 1000ml |

Préparation

Après dissolution ajuster le pH à 7,5 puis stériliser à 120°C pendant 20min pour obtenir un bouillon à 4% de Chlorure de sodium, il suffit de mettre 40g de NaCl au lieu de 65g.

5- Bouillon glucosé pour le test de type fermentaire (homo-hétérofermentaire)**Composition**

| | |
|---------------------|--------|
| • Extrait de viande | 3,00g |
| • Glucose | 0,50g |
| • Tryptone | 5,00g |
| • Eau distillée | 1000ml |

Préparation

Dissoudre les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7,0, répartir des tubes à essai refermant les cloches de DURHAM (10ml/tube). Stériliser à 115°C pendant 15min.

6- Milieu semi-solide de mannitol mobilité**Composition**

| | |
|------------------------|--------|
| • Peptone | 20,00g |
| • Mannitol | 2,00g |
| • Rouge de phénol à 1% | 4ml |

Préparation

Ajuster le pH à 8. Répartir en tubes à essai (8 à 10ml). Stériliser à 120°C pendant 15min.

7- BHIB : Brain heart infusion (gélose cervelle-cœur)

| | |
|---|--------|
| • Protéose-peptone | 10,00g |
| • Infusion de cervelle de veau | 12,50g |
| • Infusion de cœur de bœuf | 5,00g |
| • Chlorure de sodium | 5,00g |
| • Phosphate disodique | 2,50g |
| • Glucose | 2,00g |
| • Gélose | 12,00g |
| • Eau distillée | 1000ml |
| • pH 7,4. Stérilisation à 120°C pendant 15min | |

8- GN (gélose nutritive)

- Peptone 10,00g
- Extrait de viande 5,00g
- Chlorure de sodium 5,00g
- Gélose 12,00g
- Eau distillée 1000ml
- pH 5,5. Stérilisation à 105°C pendant 20min.

Résumé

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis très longtemps pour la conservation des aliments. La production d'acide lactique est le caractère le plus exploité dans ce domaine, mais d'autres produits de métabolisme tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines sont également des agents antimicrobiens. Ces derniers, de structure peptidique, peuvent avoir une action antibactérienne spécifique vis-à-vis de plusieurs espèces bactériennes. Leur spectre d'activité est quelques fois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices. Cependant, il peut être plus ou moins large, incluant des microorganismes d'altération et pathogènes.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude qui a pour objectif la mise en évidence de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques isolées à partir des échantillons de yaourt et vis-à-vis de bactéries pathogènes.

Mots clés : Bactéries lactiques, Bactériocines, Activité antibactérienne, Inhibition des bactéries pathogènes.

Summary

Lactic acid bacteria have been used for a very long time for food preservation. The production of lactic acid is the character the most exploited in this domain, but other products of metabolism such as the peroxide of hydrogen, the diacetyl and bacteriocins are also antimicrobial agents. These molecules, of peptide structure, can have a specific antibacterial action. Their spectre of activity is several times limited in the close species phylogenetically producing bacteria. However, it may be more or less wide, including pathogenic and microorganisms of alteration.

It is in this context that joins our study which has for objective the revealing of the antibacterial activity of lactic bacteria isolated from samples of yoghurt and towards pathogenic bacteria.

Keywords: Lactic acid bacteria, Bacteriocins, Antibacterial activity, Inhibition of pathogenic bacteria.

الملخص

ان بكتيريا حمض اللبن استخدمت لفترة طويلة جدا لحفظ الأغذية. إنتاج حامض اللبن هو الأكثر استخداما في هذا المجال ولكن المنتجات الأيضية الأخرى مثل بيروكسيد الهيدروجين وثنائي الأسيتيل و البكتيريوسينات هي أيضا مضادة للميكروبات.

ان بعض بكتيريا حمض اللبن قادرة على صنع البكتيريوسينات ، إذا كانت الظروف مواتية للتنمية. هذه الجزيئات البيبتيدية قد تكون لها عمل مضاد لجراثيم محددة . نشاطها يقتصر على عدد قليل من أنواع البكتيريا المشابهة لها عن قرب. ومع ذلك، قد يكون أكثر أو أقل اتساع، بما في ذلك تلف الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض.

ان دراستنا تهدف إلى تسليط الضوء على النشاط المضاد لبكتيريا حمض اللبن المعزولة من عينات من اللبن الزبادي وجها لوجه ضد البكتيريا المسببة للأمراض.

كلمات البحث

بكتيريا حمض اللبن . البكتيريوسينات . نشاط مضاد البيكتيريا . تثبيط البكتيريا المسببة للأمراض .