

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945-GUELMA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et l'Univers
Laboratoire de Biologie, Eau et Environnement

Département d'Écologie et Génie de l'Environnement



THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat 3^{ème} cycle en Sciences Biologiques

Option : Santé, Eau et Environnement

**Isolement et identification des bactéries lactiques et étude de
l'effet antagoniste vis-à-vis des germes pathogènes**

Présentée par :

Meryem MOUMENE

Devant le jury :

Président :	D. BENDJEDOU	Prof	Université de Guelma
Examineur :	A. G. DJAHOUDI	Prof	Université d'Annaba
Examineur :	L. SOUKI	Prof	Université de Guelma
Directeur de thèse :	D. E. BENOURETH	Prof	Université de Guelma

Année Universitaire : 2015/2016

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945-GUELMA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et l'Univers
Laboratoire de Biologie, Eau et Environnement

Département d'Écologie et Génie de l'Environnement



THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat 3^{ème} cycle en Sciences Biologiques

Option : Santé, Eau et Environnement

**Isolement et identification des bactéries lactiques et étude de
l'effet antagoniste vis-à-vis des germes pathogènes**

Présentée par :

Meryem MOUMENE

Devant le jury :

Président :	D. BENDJEDOU	Prof	Université de Guelma
Examineur :	A. G. DJAHOUDI	Prof	Université d'Annaba
Examineur :	L. SOUKI	Prof	Université de Guelma
Directeur de thèse :	D. E. BENOURETH	Prof	Université de Guelma

Année Universitaire : 2015/2016

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement

Monsieur le Professeur Djamel Eddine BENOUARETH, Professeur à l'Université de Guelma qui m'a encadré tout au long de ce travail, pour son enseignement, ses encouragements et sa compréhension.

Monsieur le Professeur Didier RAOULT, de m'avoir donné la chance de réaliser une grande partie de ma thèse dans son unité de recherche et de m'avoir coencadrer.

Madame le Professeur DALILA BENDJEDOU, Professeur à l'Université de Guelma qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury, je la remercie profondément .

Monsieur le professeur Abdelghani DJAHOUDI, Professeur à l'Université d'ANNABA, un grand merci pour vos encouragements et d'avoir accepté de vous déplacer à Guelma pour participer à la soutenance en tant qu'examinateur.

Madame le professeur Lynda SOUIKI, Professeur à l'Université de GUELMA un grand merci pour vos encouragements et d'avoir accepté de participer à la soutenance en tant qu'examinatrice.

Mes remerciements s'adresse également à :

Monsieur Hassen Kebeich, Responsable du laboratoire de la DSP à Guelma pour son aide et ses encouragements.

Docteur Vicky merhej pour son aide précieuse au cour de mon stage à Marseille. Merci à tous mes amis et mes collègues de GUELMA et de l'URMITE (en particulier Bilel DJEBBARI, Soumia, Myriam, Sabine et Donia). Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

DEDICACE

Je tiens à remercier particulièrement mes parents de m'avoir permis de réaliser ce travail grâce à leur amour, leurs encouragements, leur soutien inconditionnel, leurs disponibilités, leur patience, leurs conseils qui m'ont été très précieux.

A mon adorable jumelle :

Hanna, pour ses encouragements et son soutien ainsi que son époux Lahcen

A mes sœurs :

*Mouna pour son aide précieuse et Leïla ainsi que leurs époux : Fouad et Mourad
et à ma belle-sœur Karima.*

A mes frères :

Hichem et Ala-eddine, pour leur extrême serviabilité et compréhension

Aux anges de ma maison :

*Mes nièces : Yasmine, Marwa et Rim et mes neveux : Monder, Iskander, Elyess,
et Khalil*

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	i
LISTE DES TABLEAUX.....	iv
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
INTRODUCTION	1
PLAN DE LA THÈSE	3
I. CHAPITRE I : LAIT ET BACTERIES LACTIQUES	4
I.1 LE LAIT ET SES DÉRIVÉS.....	4
I.1.1 <i>Le lait cru</i>	4
I.1.2 <i>Le lait fermenté</i>	4
I.2 CONSOMMATION DU LAIT ET DES PRODUITS LAITIERS EN ALGÉRIE.....	7
I.3 LA DÉCOUVERTE DES BACTÉRIES LACTIQUES.....	8
I.4 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DES BACTÉRIES LACTIQUES.....	8
I.5 MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE DES BACTÉRIES LACTIQUES	9
I.5.1 <i>Métabolisme des sucres</i>	9
I.5.1.1 Métabolisme des protéines.....	11
I.5.2 <i>Métabolisme du citrate</i>	11
I.6 TAXONOMIE ET RELATIONS PHYLOGÉNÉTIQUES ENTRE GENRES DE BACTÉRIES LACTIQUES	12
I.6.1 <i>Taxonomie des bactéries lactiques</i>	12
I.6.2 <i>Classification des bactéries lactiques</i>	14
I.7 LE GENRE LACTOCOCCUS.....	18
I.7.1 <i>L'espèce Lactococcus garvieae</i>	18
II. CHAPITRE 2 : LES BACTÉRIOCINES	19
II.1 HISTORIQUE SUR LES BACTÉRIOCINES.....	19
II.2 DÉFINITION DES BACTÉRIOCINES	20
II.3 CLASSIFICATION DES BACTÉRIOCINES	21
II.3.1 <i>Classe I</i>	21
II.3.1.1 Les lantibiotiques	21
II.3.2 <i>Classe II</i>	22

II.3.3	Classe III	22
II.3.4	Classe IV	23
II.4	LE MÉCANISME DE PRODUCTION DES BACTÉRIOCINES ET SA RÉGULATION	25
II.4.1	Les Lantibiotiques	25
II.4.2	Les bactériocines de classe III.....	27
II.5	LES MÉCANIQUES D’ACTION DES BACTÉRIOCINES.....	29
II.5.1	Les lantibiotiques	29
II.5.2	Les bactériocines de classe II.....	30
II.5.3	Les bactériocines de classe III.....	31
II.6	PROTECTION ALIMENTAIRE	31
II.7	APPLICATION DES BACTÉRIOCINES DANS LE SECTEUR DE LA SANTÉ	32
II.8	PROBLÈME DE RÉSISTANCE AUX BACTÉRIOCINES.....	33
III.	CHAPITRE3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	36
III.1	MATÉRIEL	36
III.1.1	Matériel biologique.....	36
III.2	ANALYSE DES ÉCHANTILLONS.....	38
III.2.1	Analyses physicochimiques	38
III.2.2	Analyses microbiologiques.....	39
III.2.2.1	Étude de la flore non lactique	39
III.2.2.1.1	Dénombrement de la flore totale	39
III.2.2.1.2	Dénombrement des coliformes totaux et fécaux	40
III.2.2.1.3	Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux.....	41
III.2.2.1.4	Recherche et dénombrement des levures et Moisissures.....	43
III.2.2.1.5	Recherche de Staphylococcus aureus.....	44
III.2.2.1.6	Recherche de spores d’Anaérobies Sulfito-Réducteurs.....	44
III.2.2.1.7	Recherche des Salmonelles	46
III.2.2.2	Étude de la flore lactique	48
III.2.2.2.1	Dénombrement, Isolement et Identification des bactéries lactiques.....	48
III.2.2.2.1.1	Isolement et purification sur milieux solides	49
III.2.2.2.1.2	Caractérisation des isolats lactiques.....	49
III.2.2.2.1.3	Conservation des isolats	55
III.2.2.2.1.4	Identification des isolats lactiques.....	55
III.2.2.2.1.5	Criblage des bactéries lactiques à activité antimicrobienne.....	58
III.2.2.2.1.6	Identification moléculaire par séquençage du gène de l’ ARNr16S.....	58
III.2.2.2.1.7	Séquençage du génome complet de la souche <i>Lactococcus garvieae</i> M14	63
III.2.2.2.1.8	Annotation du génome.....	65

III.2.2.2.2	Approche protéomique	66
IV.	CAHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION	71
IV.1	RÉSULTATS DE L'ANALYSE DES ÉCHANTILLONS	71
IV.1.1	<i>Analyses physicochimiques</i>	71
IV.1.2	<i>Analyses microbiologiques</i>	71
IV.1.2.1	Étude de la flore non lactique	71
IV.1.2.2	Étude de la flore lactique	75
IV.1.2.2.1	Dénombrement des bactéries lactiques	75
IV.1.2.2.2	Isolement et caractérisation des bactéries lactiques par api 50 CHL.....	75
IV.1.2.2.3	Identification par MALDI-TOF MS	75
IV.1.2.2.4	Criblage des bactéries lactiques à activité antibactérienne.....	79
IV.1.2.2.5	<i>Lactococcus garvieae</i> M14 sur gélose Columbia au sang, en microscopie optique et électronique	81
IV.1.2.2.6	Classificaion et caractéristiques de la souche <i>Lactococcus garvieae</i> M14.....	82
IV.1.2.2.7	Résultats du séquençage du gène de l'ARN 16S.....	86
IV.1.2.2.8	Position de la souche <i>L. garvieae</i> M14 par rapport à d'autres souches phylogénétiquement proches au sein du genre <i>Lactococcus</i> et <i>Lactobacillus</i>	86
IV.1.2.2.9	Descriptions étendues des fonctionnalités.....	87
IV.1.2.2.10	Résultats du séquençage du génome complet de la souche <i>Lactococcus garvieae</i> M14	89
IV.1.2.2.11	Historique du projet du Génome	89
IV.1.2.2.12	Propriétés du génome	89
IV.1.2.2.13	Comparaison des génomes.....	94
IV.1.2.2.14	Connaissances étendues.....	96
IV.1.2.2.15	Métabolisme énergétique et transporteurs	96
IV.1.2.2.16	Résultats de l'approche protéomique	97
IV.1.2.2.17	Resultat de l'électrophorese SDS page	98
IV.1.2.2.18	Mécanismes de défense de <i>Lactococcus garvieae</i> M14	99
V.	CONCLUSION	101
	RÉSUMÉ.....	103
	ABSTRACT	104
	الملخص.....	105
	BIBLIOGRAPHIE.....	106
	ANNEXES	125

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: SÉQUENCES DE QUELQUES BACTÉRIOCINES DES CLASSE II	23
TABLEAU 2: DISTRIBUTION DES ÉCHANTILLONS.	37
TABLEAU 3: LES AMORCES UTILISÉES DANS L'AMPLIFICATION ET LE SÉQUENÇAGE DU GÈNE DE L'ARNr 16S (KHELILI ET AL., 2014).	59
TABLEAU 4: COMPOSITION DU MÉLANGE RÉACTIONNEL POUR LA PCR BIG DYE	62
TABLEAU 5: PROGRAMME D'AMPLIFICATION DE LA PCR BIG DYE	62
TABLEAU 6: DIGESTION TRYPSIQUE DES PROTÉINES.....	67
TABLEAU 7: COMPOSITION DU TAMPON D'ÉLECTROPHORÈSE.	67
TABLEAU 8: COLORATION DES PROTÉINES À L'ARGENT	68
TABLEAU 9: L'ÉTAPE AVANT LE PASSAGE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE (AUTOPHLEX).....	69
TABLEAU 10: COMPOSITION PHYSICO-CHIMIQUE DES ECHANTILLONS DE LAIT	71
TABLEAU 11: RÉSULTATS DES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DES ÉCHANTILLONS E1, E2, E3, E4, E5.....	72
TABLEAU 12: RÉSULTATS DES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DES ÉCHANTILLONS E6, E7, E8.	73
TABLEAU 13: RÉSULTATS DES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DES ÉCHANTILLONS E9, E10, E11.....	74
TABLEAU 14 : COMPARAISON ENTRE L'IDENTIFICATION DES BACTÉRIES LACTIQUE PAR API 50CHL ET SPECTROMÉTRIE DE MASSE (MALDI-TOF MS).	77
TABLEAU 15 : CARACTÉRISTIQUES PHÉNOTYPIQUES DIFFÉRENTIELS ENTRE L. GARVIEAE SOUCHE M14 ET LES ESPÈCES PHYLOGÉNÉTIQUEMENT PROCHES.....	85
TABLEAU 16 : INFORMATIONS SUR LE PROJET	89
TABLEAU 17: RÉSUMÉ DU GÉNOME : UN CHROMOSOME ET QUATRE PLASMIDES COMME INDIQUÉ PAR DES ASTÉRISQUES.	91
TABLEAU 18: CONTENU EN NUCLÉOTIDES ET LE NOMBRE DE GÈNES DU GÉNOME	91
TABLEAU 19: CONTENU EN NUCLÉOTIDES ET LE NOMBRE DE GÈNES DES PLASMIDES.....	92
TABLEAU 20: NOMBRE DE GÈNES DE <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> M14 ASSOCIÉS AUX CATÉGORIES FONCTIONNELLES COG GÉNÉRALE ET SA COMPARAISON AVEC <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> YT-3.....	93
TABLEAU 21: CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DES GÉNOMES.	95
TABLEAU 22: DENSITÉ OPTIQUE (D.O) EN FONCTION DU TEMPS DE LA SOUCHE <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> M14.	97
TABLEAU 23: IDENTIFICATION DES PROTÉINES DU CULOT DE LA SOUCHE <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> M14 PAR LA LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE (AUTOFLEX).....	100

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : SCHÉMA DE FABRICATION DES PRODUITS LAITIERS TRADITIONNELS ALGÉRIENS, ADAPTATION DE (BENKERROUM <i>ET AL.</i> , 2004).	7
FIGURE 2 : FERMENTATION DU LACTOSE CHEZ LES BACTÉRIES LACTIQUES : VOIE HOMOFERMENTAIRE ET VOIE HÉTÉROFERMENTAIRE.	10
FIGURE 3 : PROTÉOLYSE DU LAIT PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES (LEVEAU <i>ET AL.</i> , 1993).	11
FIGURE 4 : MÉTABOLISME DU CITRATE CHEZ LES BACTÉRIES LACTIQUES ADAPTATION DE (LEVEAU <i>ET AL.</i> , 1993).	12
FIGURE 5 : ARBRE CONSENSUS, BASÉE SUR L'ANALYSE COMPARATIVE DES SÉQUENCES ARNr, MONTRANT LES PRINCIPAUX GROUPES PHYLOGÉNÉTIQUES DE BACTÉRIES LACTIQUES À FAIBLE % G+C ET LES GENRES GRAM POSITIFS NON RELIÉS BIFIDOBACTERIUM ET PROPIONIBACTERIUM (HOLZAPFEL <i>ET AL.</i> , 2001, AMMOR, 2004).	14
FIGURE 6 : DENDROGRAMME ILLUSTRANT LES RELATIONS PHYLOGÉNÉTIQUES DE L'ORDRE « LACTOBACILLALES » DANS LA CLASSE DES « BACILLI » (VOS <i>ET AL.</i> , 2009).	17
FIGURE 7 : SÉQUENCE ET STRUCTURE DE L'ANTIBIOTIQUES : A) TYPE A (NISINE), B) TYPE B (MERSACIDINE), C) L'ANTIBIOTIQUE « TWO-PEPTIDE » (LACTICINE3147A1 ET A2).	21
FIGURE 8 : RÉGULATION DE LA PRODUCTION, MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES ET AUTO-IMMUNITÉ DE LA NISINE.	26
FIGURE 9 : ORGANISATION GÉNÉTIQUE DE BACTÉRIOCINES DE CLASSE II.	27
FIGURE 10: MÉTHODE DE DÉNOMBREMENT DES COLIFORMES TOTAUX ET FÉCAUX.	40
FIGURE 11: RECHERCHE ET DÉNOMBREMENT DES STREPTOCOQUES FÉCAUX. ADAPTATION DE (MOUFFOK, 2006).	42
FIGURE 12: RECHERCHE ET DÉNOMBREMENT DES LEVURES ET MOISSURES. ADAPTATION DE (MOUFFOK, 2006).	44
FIGURE 13 : RECHERCHE ET DÉNOMBREMENT DE SPORES D'ANAÉROBES SULFITO-RÉDUCTEURS.	45
FIGURE 14 : SCHÉMA ILLUSTRANT LA PREMIÈRE ÉTAPE DE L'APPROCHE PROTÉOMIQUE.	66
FIGURE 15 : ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES SOUCHES LACTIQUES À L'ENCONTRE DE <i>L. MONOYTOGENES</i> ATCC 7644 (MÉTHODE DE DOUBLE COUCHE). A) <i>LACTOCOCCUS GARVIEA</i> M14, B) <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> .	79
FIGURE 16 : ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES SOUCHES LACTIQUES À L'ENCONTRE DE <i>L. MONOYTOGENES</i> ATCC 7644 (MÉTHODE DE DIFFUSION EN GÉLOSE). A) <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> , B) <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> M14.	79
FIGURE 17 : ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES SOUCHES LACTIQUES À L'ENCONTRE DE <i>L. MONOYTOGENES</i> ATCC 7644 (MÉTHODE DE DOUBLE COUCHE). A) SOUCHES DU GENRE <i>LACTOCOCCUS</i> , B) SOUCHES DU GENRE <i>ENTEROCOCCUS</i> .	80
FIGURE 18 : ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES SOUCHES LACTIQUES À L'ENCONTRE DE <i>L. MONOYTOGENES</i> ATCC 7644 (MÉTHODE DE DOUBLE COUCHE). SOUCHES DU GENRE <i>LACTOBACILLUS</i> .	80
FIGURE 19 : <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> M14 SUR GÉLOSE COLUMBIA AU SANG.	81
FIGURE 20: <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> M14 EN MICROSCOPIE OPTIQUE APRÈS COLORATION DE GRAM (GROSSISSEMENT X 100).	81
FIGURE 21: MICROGRAPHES MET DE <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> M14.	82

FIGURE 22 : RÉSULTAT DES TESTS : A) TEST DE FERMENTATION DES CARBOHYDRATES (API 50CHL) DE LA SOUCHE <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> M14 , B) TEST API ZYM DE LA SOUCHE <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> M14	83
FIGURE 23: ARBRE PHYLOGÉNÉTIQUE SOULIGNANT LA POSITION DE LA SOUCHE. <i>L. GARVIEAE</i> M14 (LK985397) PAR RAPPORT À D'AUTRES SOUCHES PHYLOGÉNÉTIQUEMENT PROCHES AU SEIN DU GENRE <i>LACTOCOCCUS</i> ET <i>LACTOBACILLUS</i> , AVEC <i>LYSINIBACILLUS SPHAERICUS</i> COMME OUTGROUPE. NUMÉROS AUX NOEUDS SONT DES POURCENTAGES DE VALEURS DE BOOTSTRAP OBTENUES EN RÉPÉTANT 500 FOIS L'ANALYSE POUR GÉNÉRER UN ARBRE CONSENSUS MAJORITAIRE. LA BARRE D'ÉCHELLE REPRÉSENTE 2 % DE DIVERGENCE DE SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE.....	86
FIGURE 24 : SPECTRE DE MASSE DE RÉFÉRENCE DE LA SOUCHE <i>L. GARVIEAE</i> M14. LES SPECTRES À PARTIR DE 12 COLONIES INDIVIDUELLES ONT ÉTÉ COMPARÉS ET UN SPECTRE DE RÉFÉRENCE A ÉTÉ GÉNÉRÉ.....	88
FIGURE 25 : PROFIL DE SPECTROMÉTRIE DE MASSE (GEL VIEW) COMPARANT LES SPECTRES DE <i>L. GARVIEAE</i> M14 AVEC DES ESPÈCES DU GENRE <i>LACTOCOCCUS</i> (<i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> SSP <i>LACTIS</i> , <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> SSP <i>CREMORIS</i> ET DEUX SOUCHES DE <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i>) ET AVEC DES ESPÈCES DE <i>LACTOBACILLUS</i> (<i>LACTOBACILLUS SAKEI</i> SSP <i>SAKEI</i> , <i>LACTOBACILLUS SALIVARUS</i> , <i>LACTOBACILLUS RUMINIS</i> , <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> , <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ET <i>LACTOBACILLUS FERMENTUM</i>)	88
FIGURE 26: REPRÉSENTATION CIRCULAIRE DU GÉNOME DE LA SOUCHE <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> M14. LES CERCLES DE L'EXTÉRIEUR AU CENTRE : LES CONTIGS (ROUGE/GRIS), LES GÈNES SONT COLORÉES EN FONCTION DES CATEGORIES DÉTERMINÉES EN COGS SUR LE BRIN SENS ET ANTISENS (2 CERCLES), LES ARNr (ROUGE), 'ARNt (VERT), LE CONTENU EN GC ET LE GC SKEW (VERT/MOVE).....	90
FIGURE 27: CLASSIFICATION FONCTIONNELLE DES GÈNES CODÉS PAR <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> M14 ET SA COMPARAISON AVEC <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> YT- 3 ET <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> LG2 . LES SÉQUENCES CODANTES POUR DES PROTÉINE SONT CLASSÉS SELON LES CATEGORIES COGS.	96
FIGURE 28: RÉSULTAT DE L'SDS PAGE DE LA SOUCHE <i>LACTOCOCCUS GARVIEAE</i> M14.....	98

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

°D : degré d'ornic

1 N : 1 Normalité

16S : la petite sous unité ribosomique

1C : une colonie

A

A : Amplification

A : Adénine

a.a : acide aminé

ABI : Applied Biosystems

Abs : Absence

Ac : anticorps

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AgNO₃ : Nitrate

AMD : AmiDon

AMY : AMYgdaline

API 50 CH: Carbohydate fermentation strips

API® : Analytical Profile Index

ARB : ARButine

ARN : Acide Ribonucléique

ASR : Anaérobies Sulfuro-Réducteur

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosine Tri Phosphate

ATPase: Enzyme hydrolysant l'Adénosine TriPhosphate

B

Blast: Basic Local Alignment Search Tool

C

C : Cytosine

CEL : D-CELLobiose

CH₃-CHOH-COOH : acide lactique

COG : une base de donnée dédiée pour l'analyse des fonctions et évolution des protéines au sein du génome.

D

D : Dilution prise en compte

D.O : Densité Optique

DH₂ : Dihydrogène

dNTP : désoxyriboNucléotides Tri-Phosphate

DSP : Direction de la Santé et de la Population

DTT : DiThioThreitol

DXYL : D-Xylose

E

E1 : Echantillon 1

EBI : European Bioinformatics Institute

EDTA : Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique.

EMBL: European Molecular Biology Laboratory

EPS : Exo Polysaccharides

ESC : ESCuline

F

F : fécaux

FD : Forward

FRU : D-FRUctose

G

G + C % : Guanine+Cytosine pour cent

G: Guanine

GAL : D-GALactose

GAL : D-GALactose

Gb : Gigabyte

GEN : GENtiobiose

GEN : GENtiobiose

GenBank : Banque des séquences nucléotidiques

GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine ou NAG

GLU : D-GLUcose

Gram+ : Gramme positive

H

H : hydrure

H. Nbail : hammam Nbail

H⁺ : hydronium

H₂PO₄⁻ : Ion dihydrogénophosphate

H₂S⁺ : Sulfure d'hydrogene

HCL : Acide Chlorhydrique

HPLC : High-Performance Liquid Chromatography

HPO₄⁻² : Ion hydrogen phosphate

HSV : Herpes Simplex Virus

I

IAA: IodoAcetAmide.

K

KDa : KiloDalton

KH₂PO₄ : Phosphate de potassium monobasique.

L

L. garvieae : *Lactococcus garvieae*

L. monocytogenes : *Listeria monocytogenes*

LAB : Lactic Acid Bacteria

lab-on-a-chip : LOC (laboratoire sur puce)

LAC : D-LACtose

lan : Gène codant les Lantibiotiques

lanA : Gène codant le peptide (mutacin-1140) de la Lantibiotique

lanI, lanF, lanE et lanG : Gènes codant pour des protéines impliquées dans l'immunité

LanK : Histidine kinase

LanR : Régulateur de Réponse

Lb : Lactobacillus

LDC : Lysine décarboxylase

Le type E : Enhancing

Le type S : Synergy

M

M : Molarité

M.P.M : Marqueur de Poids Moléculaire

M17 : Terzaghi and Sandine

mA : milliampère

MALDI: Matrix-Assisted Laser
Desorption/Ionisation

MAN : D-MANnitol

Mega5 : Molecular Evolutionary Genetics
Analysis Version 5

MET: Microscopie Électronique en
Transmission.

MIGS : Minimum Information about a
Genome Sequence.

Mix : Mélange

Mix: mélange

mM : milli mole

MNE : D-MaNnosE

Mpa : Milli pascal

MRS : Man, Rogosa et Sharpe

MurNAc : N-acétylmuramique

N

n : la chute de la burette

n : Nombre de gouttes

N₂ : Diazote

Na₂CO₃ : Sodium carbonate

Na₂S₂O₃, 5H₂O : Sodium Thiosulfate
Pentahydrate

Na₂S₂O₃, 5H₂O: Sodium thiosulfate

NaCl : Chlorure de Sodium

NAG : N-AcetylGlucosamine

NaOH : Soude ou hydroxyde de sodium

NH₃ : Ammoniac

NH₄HCO₃ : Ammonium bicarbonate

nis : Gène codant de biosynthèse de la
Nisine

nM : nano Mole

nm : nanomètre

NPP : Nombre le Plus Probable

O

OX : Oxydase

P

PAGE : Polyacryl Amide Gel
Electrophoresis

pb : paire de base

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCA : Plate Count Agar

PCR : Polymerase Chain Reaction

pM : pascal Mole

PM : Poids Moléculaire

PO₄⁻³ : Ion phosphate

PSM : Poste of Security Microbiologic

PTS : Système phosphotransférase
phosphoénol-pyruvate dépendant

Q

QSP : Quantité Suffisante Pour

R

RIB : D-RIBose

Rp : Reverse

Rpm : Rotation Par Minute

S

S: Sequencing

SAC : D-SACcharose

SAL : SALicine

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

Sec : Seconde

SFB : Sélénite F Broth

Spp : sub-espèce

sppR : gène codant pour le régulateur de
réponse de la sakacin P

T

T : Thymine

T : totaux

Taq: Thermophilus aquaticus

TBE : Tris, Borate, EDTA

TEMED : tétraméthyléthylènediamine

TFA : Acide TriFluoroacétique

TOF : Time-Of-Flight

TRE : D-TREhalose

Tris : hydroxymethyl aminomethane

Tween: Polyethylene glycol sorbitan
monolaurate.

U

UFC : Unité Formant Colonies

UP: ultra-pure

USA : United States of America

UV : UltraViolet

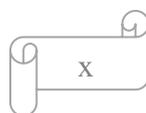
V

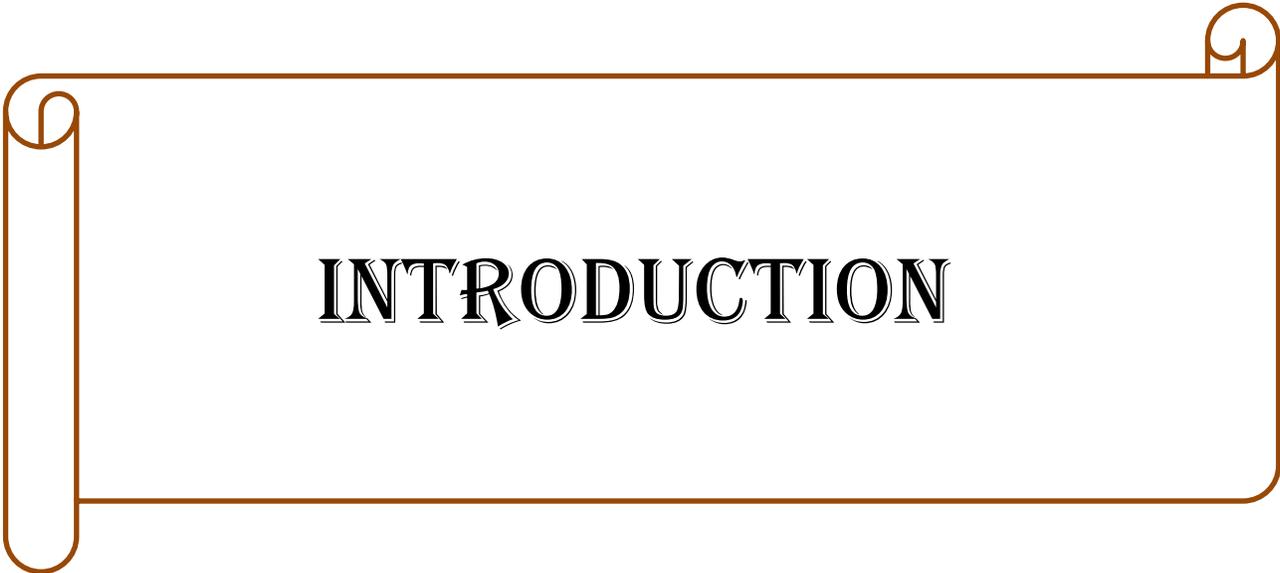
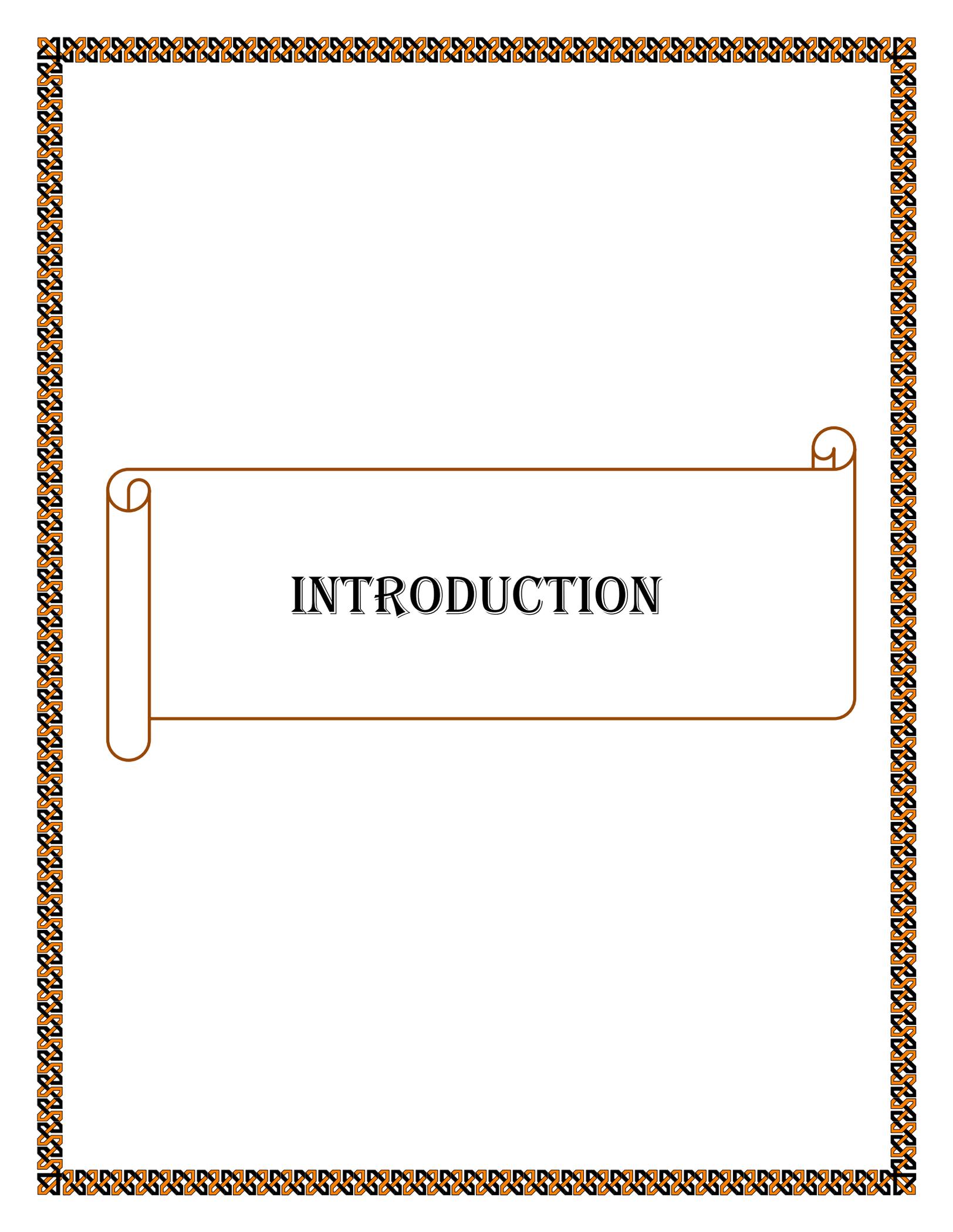
V : volume

Ve : Volume d'ensemencement

Z

Zn : Zinc





INTRODUCTION

INTRODUCTION

Nos aliments proviennent de notre environnement proche, mais aussi, de plus en plus, de pays divers. Nous exigeons que nos aliments soient sans danger pour notre santé. Cependant, il arrive que ces aliments soient contaminés en cours de production, de transformation, de transport et de manipulation par des substances potentiellement dangereuses pour la santé. Notre environnement est contaminé par des agents physiques, chimiques et surtout biologiques qui risquent de porter atteinte à notre santé. Divers contaminants peuvent donc être captés par la chaîne alimentaire et ainsi être transférés à l'être humain par voie digestive (Panisset *et al.*, 2003).

Les moyens de lutte employés contre les agents pathogènes biologiques font le plus souvent appel aux barrières microbiologiques traditionnelles telles que le sel, les nitrates et les sorbates. Cependant, les nouvelles tendances du marché montrent une réticence des consommateurs pour les additifs chimiques et le sel. De plus, le consommateur favorise de plus en plus le recours aux produits naturels. Ainsi, des investigations récentes se sont orientées vers la lutte biologique qui consiste à valoriser les produits issus du métabolisme des bactéries lactiques ayant une activité antimicrobienne (Naghmouchi, 2007).

Les bactéries lactiques sont généralement reconnues comme étant saines, de statut "GRAS" (Generally Reconised As Safe) et jouent un rôle important dans la fermentation et la conservation des aliments, que ce soit en tant que microflore naturelle ou comme cultures ajoutées sous des conditions contrôlées. Elles sont largement employées dans la préparation de nombreux aliments fermentés (yaourt, laits fermentés, fromages, etc.). En plus de leur rôle technologique, la contribution la plus importante de l'ajout de ces souches au produit est l'amélioration de sa qualité (saveur, texture) et son innocuité par l'intermédiaire de l'allongement de sa durée de vie et de l'inhibition de la flore compétitive d'altération et des bactéries pathogènes. Ces propriétés de conservation sont le résultat des propriétés inhibitrices des bactéries lactiques qui incluent la compétition pour les nutriments, les changements physico-chimiques du milieu, tels que l'acidification et la production de métabolites antimicrobiens. En effet, les bactéries lactiques ont la propriété de produire de nombreuses substances antimicrobiennes tels que les acides organiques (acide lactique), du peroxyde d'hydrogène, du

CO₂, de l'acétylène, de l'acétaldéhyde et des bactériocines. (Ray *et al.*, 1994, Sullivan *et al.*, 2002). Plusieurs revues et travaux de recherches rapportent le potentiel des bactéries lactiques utilisées comme cultures ajoutées pour inhiber des micro-organismes pathogènes présents dans les aliments (Wessels *et al.*, 1996, Stiles, 1996, Cintas *et al.*, 2001, Rodgers, 2002, Sullivan *et al.*, 2002, Katikou *et al.*, 2007) notamment l'inhibition de *Listeria monocytogenes* en présence de bactéries lactiques (Nilsson *et al.*, 1999, Richard *et al.*, 2004, Vaz-Velho *et al.*, 2005, Vescovo *et al.*, 2006).

Les bactériocines sont des peptides synthétisés au niveau des ribosomes et elles possèdent une activité bactéricide ou bactériostatique envers d'autres micro-organismes (Klaenhammer, 1993). Ceci permet à la bactérie productrice de pouvoir éliminer certains compétiteurs potentiels présents dans son environnement. Certaines bactériocines ne sont pas uniquement efficaces envers des bactéries phylogénitiquement semblables (Tagg *et al.*, 1976), elles peuvent avoir un spectre d'activité étendu et sont en mesure d'affecter une grande variété de bactéries sans pour autant se limiter à celles qui lui sont semblables (Stevens *et al.*, 1991, Klaenhammer, 1993). A la suite de leurs travaux sur les colicines (bactériocines de bactéries Gram -), Tagg *et al.* (Tagg *et al.*, 1976) citent 5 critères requis pour qu'une substance chimique soit dénommée bactériocine : la présence d'une partie biologiquement active de nature protéique, un spectre d'activité inhibitrice étroit et centré sur les espèces homologues, un mode d'action bactéricide, l'adsorption à des récepteurs spécifiques et la nature plasmidique des déterminants génétiques codants pour la production de la bactériocine et pour l'immunité à celle-ci.

L'utilisation des bactériocines dans les aliments fut introduite par Hirsch *et al* en 1951 (Hirsch *et al.*, 1951) lorsqu'il démontra que la nisine était en mesure d'inhiber la croissance de clostridium dans un fromage frais de lait pasteurisé. Cette découverte eut comme effet de propulser les études sur les bactériocines. En effet grâce à l'activité antimicrobienne de leurs bactériocines, les bactéries productrices ont la capacité de diminuer la charge microbienne d'un aliment et donc de contribuer à leur innocuité. Malgré tous, seule la nisine est autorisée à ce jour comme additif alimentaire (Delves-Broughton, 1990). En effet, la nisine est la seule bactériocine à posséder le statut GRAS (Generally Reconised As Safe), décerné en 1988 par la FDA (US Food and Drug Administration, 1988) des états-unis.

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

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la diversité des bactéries lactiques productrices des bactériocines à travers la sélection de nouvelles bactéries de ce type dans les produits laitiers fermentés de façon artisanale.

Plan de la thèse

Cette thèse consiste en quatre chapitres organisés comme suit :

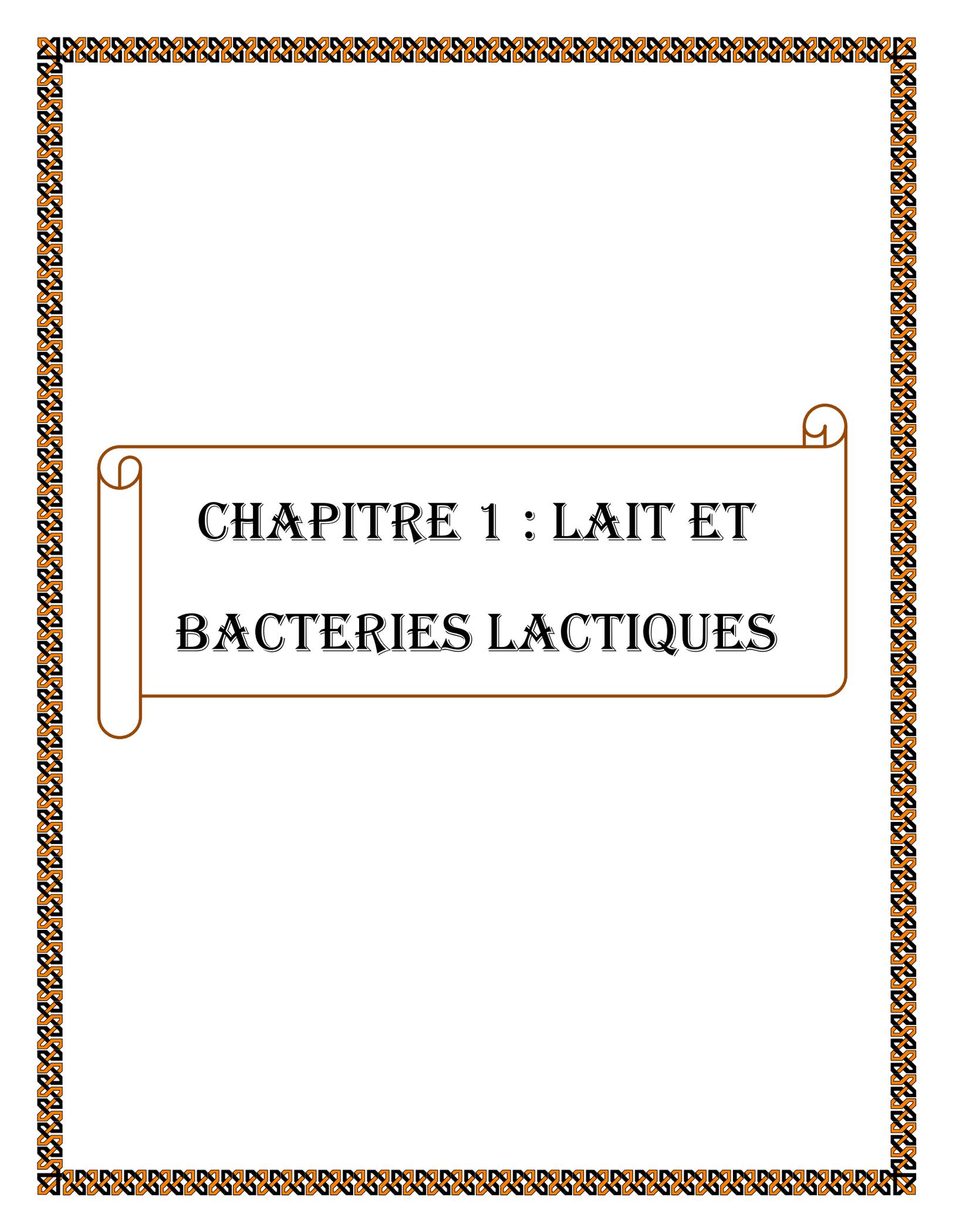
Le premier chapitre traite en deux volets les bases bibliographiques, d'une part du lait et ses dérivés et d'autre part, des bactéries lactiques, leur taxonomie et leurs caractéristiques et classification ainsi que les méthodes d'identifications.

L'ensemble du deuxième chapitre est consacré aux bactériocines, leur historique, leur classification, production et mécanisme d'action ainsi que leurs applications.

Le troisième chapitre porte sur la description du matériel et des méthodes d'analyse utilisés.

Les résultats obtenus ainsi que leur discussion seront présentés au quatrième chapitre

Une conclusion générale clôturera ce travail où sont récapitulés les principaux résultats obtenus et les perspectives.



CHAPITRE 1 : LAIT ET BACTERIES LACTIQUES

CHAPITRE I : LAIT ET BACTERIES LACTIQUES

I.1 Le lait et ses dérivés

I.1.1 Le lait cru

Chez beaucoup d'espèces animales, le lien entre la mère et son petit n'est pas subitement rompu après la naissance et la femelle continue de nourrir sa progéniture. C'est ainsi toujours le cas chez les mammifères où durant une période donnée, l'unique aliment du nouveau-né est le lait sécrété par les glandes mammaires de la femelle (Penaud, 2006).

Le lait a été défini lors du premier Congrès International pour la Répression des Fraudes à Genève, en 1908, comme le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et être exempt de colostrum (Penaud, 2006).

C'est également un aliment nutritif pour les êtres humains, indispensable pour le nouveau-né et il s'avère très bénéfique pour l'adulte (Ouahghiri, 2009).

Traditionnellement, le lait de vache a été considéré comme un aliment de base dans de nombreux régimes alimentaires. C'est une boisson saine puisque sa consommation est associée à une alimentation de qualité. Il fournit une matrice facilement accessible, riche en une grande variété de nutriments essentiels : des minéraux, des vitamines et des protéines faciles à digérer. Il est par conséquent essentiel à l'ensemble des fonctions du corps (Steijns, 2006, Ouahghiri, 2009).

Le lait constitue également un milieu propice pour la croissance de nombreux micro-organismes en raison de sa teneur élevée en eau, de son pH proche de la neutralité et de sa composition en nutriments (Andriamahery, 2010).

I.1.2 Le lait fermenté

Divers types de produits laitiers fermentés existent à travers le monde. Leur nature dépend du type du lait utilisé, le prétraitement, les conditions de fermentation et le traitement ultérieur. La fermentation du lait implique principalement les bactéries lactiques (LAB), mais les

Microcoques, les corynéformes, les levures et les moisissures peuvent également jouer un rôle (Béal *et al.*, 2016).

Historiquement, les produits laitiers fermentés ont été produits pour prolonger la durée de conservation du lait. Ces aliments traditionnels ont persisté au cours des siècles et ils ont souvent évolué d'un niveau artisanal et traditionnel à la fabrication à grande échelle industrielle avec production utilisant des cultures spécifiques (starter) et équipements modernes. L'utilisation de starters a amélioré la qualité technologique des produits laitiers, mais en même temps, a limité leur biodiversité ainsi que les caractéristiques organoleptiques et la variabilité du produit fini. Par conséquent, il existe une demande croissante en nouvelles souches pouvant avoir des caractéristiques recherchées au niveau du produit fini. Les produits laitiers traditionnels sont une source indéniable d'un tel genre de micro-organisme (De Vuyst *et al.*, 2007).

Avec les céréales, les viandes, les légumes et les fruits, les produits laitiers sont considérés comme des aliments riches en nutriments, ils fournissent de nombreux éléments nutritifs à teneur relativement faible en énergie et indispensables à la santé tout au long du cycle de vie (Drewnowski, 2005). La consommation des produits laitiers est également associée à des effets bénéfiques sur la santé en plus de leurs valeurs nutritionnelles (Ouahghiri, 2009). Les laits fermentés algériens sont le Lben et le Raib.

➤ **L'ben**

L'origine de ce produit remonte à des temps immémoriaux, probablement à l'époque où l'homme a commencé à domestiquer les espèces laitières et à utiliser leurs laits. Sa fermentation lactique lui donne son arôme naturel et sa saveur inimitable. Sa préparation artisanale est simple, le lait est abandonné à lui-même jusqu'à sa coagulation. Celle-ci se fait à température ambiante et dure 24 à 48 h selon la saison. Le barattage qui lui succède dure 30 à 40 minutes. A la fin du barattage, on ajoute généralement un certain volume d'eau (Environ 10 % du volume du lait), chaude ou froide, suivant la température ambiante, de façon à ramener la température de l'ensemble à un niveau convenable au rassemblement des grains de beurre (Benkerroum *et al.*, 2004, Ouahghiri, 2009).

Le L'ben est produit également à l'échelle industrielle. C'est un lait pasteurisé fermenté. L'acidification est provoquée par ensemencement des ferments lactiques mésophiles. Le lait qui sert à la préparation du L'ben est reconstitué. Il subit une pasteurisation à 84°C pendant 30

secondes, puis refroidi à 22°C et ensemencé de levain lactique (*Streptococcus crémoirs* ; *Streptococcus lactis* et *Streptococcus diacetylactis* ; *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc. citrovorum* et *Leuconostoc. Mesenteroides*) (Benkerroum et al., 2004).

➤ Raïb

Le Raïb fait partie des produits laitiers fermentés populaires en Algérie, en plus du L'ben (lait écrémé fermenté). Le Raïb a une très ancienne tradition en Algérie; il est fabriqué à partir du lait cru de vache ou de chèvre. La fermentation du lait, comme de nombreux procédés traditionnels de fermentation, est spontanée et incontrôlée et pourrait être une source précieuse des bactéries lactiques autochtones. Contrairement au L'ben, le Raïb ne subit pas une opération de barattage et d'écémage, il s'agit d'un lait fermenté entier (Mechai, 2009).

➤ Yaourt

Le yaourt est un lait fermenté obtenu exclusivement par la coagulation du lait sous l'action de deux bactéries : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* (Delorme, 2008, De Vuyst *et al.*, 2008, Michaylova *et al.*, 2007, Quiberoni *et al.*, 2010). Ces bactéries doivent être vivantes dans le produit et leur nombre doit dépasser dix millions par gramme de yaourt à la date limite de conservation (Hols *et al.*, 2005, Pfeiler *et al.*, 2007, Champagne *et al.*, 2009). La principale préoccupation des industriels est d'obtenir régulièrement un produit de bonne qualité. Cet objectif implique:

- Un ajustement de la qualité du lait utilisé;
- La connaissance des propriétés des cultures bactériennes employées;
- La maîtrise des différentes étapes de la fabrication du yaourt.

En effet, ces trois paramètres affectent le déroulement normal de la fermentation du yaourt. Les propriétés fermentaires aromatiques et épaississantes des bactéries lactiques du yaourt confèrent au produit final ses caractéristiques organoleptiques. Les résultats de recherche ont montré que la production d'acide et la production d'acétaldéhyde de la culture mixte de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* sont beaucoup plus importantes que celles des cultures pures, on peut également observer un effet synergique marqué sur la consistance et la viscosité du produit lorsqu'on emploie des cultures épaississantes bonnes

productrices d'exopolysaccharides (EPS) (Hui, 1993, Jelen, 1994, Ravin *et al.*, 2006, Yildiz, 2010).

I.2 Consommation du lait et des produits laitiers en Algérie

L'Algérie est un pays de tradition laitière. Le lait et les produits laitiers occupent une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens (figure 1), ils apportent la plus grosse part de protéines d'origine animale. En regard de son contenu en énergie métabolisable, le lait présente une forte concentration en nutriments. Il n'a pas seulement un intérêt alimentaire mais occupe aussi une place centrale dans l'imaginaire des algériens. Ce n'est d'ailleurs pas par hasard qu'il est offert comme signe de bienvenue, traduisant, ainsi par l'acte notre tradition d'hospitalité (Ubi, 2010).

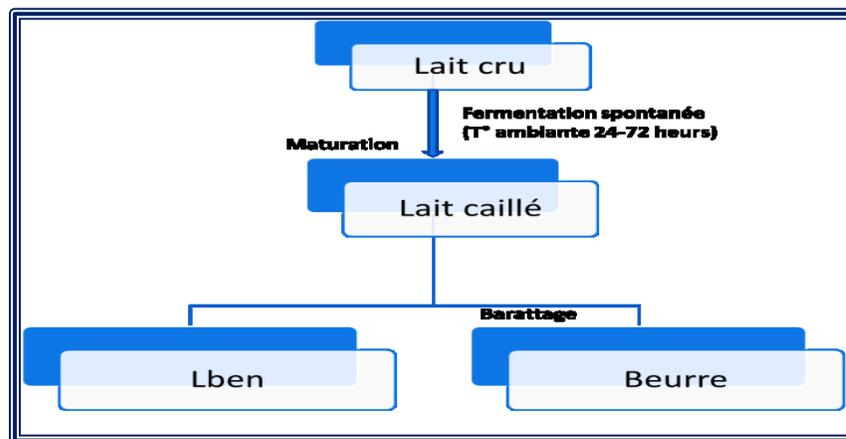


Figure 1 : Schéma de fabrication des produits laitiers traditionnels algériens, adaptation de (Benkerroum *et al.*, 2004).

Les besoins algériens en lait et produits laitiers sont considérables. Avec une consommation moyenne de 110 litres de lait par habitant et par an, estimée à 115 litres en 2010, l'Algérie est le plus important consommateur de lait dans le Maghreb. La consommation nationale s'élève à environ 3 milliards de litres de lait par an, la production nationale étant limitée à 2,2 milliards de litres, dont 1,6 milliard de lait cru. C'est donc près d'un milliard de litres de lait qui est ainsi importé chaque année, majoritairement sous forme de poudre de lait". Chaque année, l'Algérie importe 60% de sa consommation de lait en poudre, et la croissance annuelle moyenne du marché algérien des produits laitiers est estimée à 20% (Ubi, 2010).

I.3 La découverte des bactéries lactiques

L'utilisation de la fermentation par l'Homme remonte à des temps très anciens. Les premières preuves de l'existence des produits laitiers fermentés remontent à 8000 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 *et al.*, 2004, Herve-Jimenez *et al.*, 2009).

Cependant, c'est à l'époque des grandes découvertes de la microbiologie, à la fin du 19^{ème} siècle, que des chercheurs se sont penchés sur la fermentation du lait pour trouver la cause de sa coagulation acide. 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 Lister en 1873 (Lister, 1873, American association for the advancement of science, 1889, Weigmann, 1908). En 1890, Storch *et al.* (Storch, 1980) ont conclu que la présence de bactéries lactiques est responsable de l'acidification du lait et de la maturation de la crème. Metchnikoff (Metchnikoff, 2004) 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 (Penaud, 2006, Ouadghiri, 2009).

I.4 Caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe hétérogène de microorganismes (Dortu *et al.*, 2008), ce sont des bactéries Gram-positives, non pigmentées, asporulées, généralement immobiles et dépourvues de nitrate réductase, dépourvues de cytochromes oxydases et de catalase à l'exception de certains genres à pseudo-catalase (Doguiet Koffi- Denis, 2010).

Sur la base de leur profil fermentaires, les bactéries lactiques peuvent être classées en deux grands groupes : les homofermentaires et les hétérofermentaires. Les bactéries lactiques homofermentaires utilisent la voie de la glycolyse pour produire à partir du glucose deux molécules d'acide lactique. Les souches hétérofermentaires en utilisant la voie de 6-phosphogluconate, fermentent les hexoses pour former l'acide lactique, le dioxyde d'oxygène et

l'éthanol (ou l'acide acétique) comme produits finaux (Ström *et al.*, 2005). La différence entre ces deux groupes est détectable par dégagement de CO₂. Certaines bactéries lactiques homofermentaires, sous certaines conditions, c'est-à-dire dans les milieux pauvres en hexoses, peuvent fermenter les pentoses pour produire de l'acide lactique et de l'acide acétique comme produits finaux. Ces bactéries sont qualifiées d'hétérofermentaires facultatives (Salminen *et al.*, 2004, Doguiet Koffi- Denis, 2010).

Elles sont considérées comme des anaérobies. Cependant, leur sensibilité à l'oxygène peut être très variable selon les souches : d'anaérobies strictes à aérotolescentes voire insensibles (Leveau *et al.*, 1993).

Pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles), leur capacité de biosynthèse est faible, ce qui explique leur poly-auxotrophie pour divers acides aminés ou peptides, des bases nucléiques, des vitamines et des acides gras. (Bourgeois *et al.*, 1996). Les milieux de culture sont complexes et dits « riches ». Il est donc difficile d'obtenir de bons milieux sélectifs. Seul l'abaissement de pH sera souvent utilisé comme agent de sélection (Doguiet Koffi- Denis, 2010).

Les bactéries lactiques colonisent de nombreux produits alimentaires tels que les produits laitiers, la viande, les végétaux, et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (Dortu *et al.*, 2009). Elles sont pour la plupart mésophiles ; certaines sont psychrotoléscentes ou thermotoléscentes. Elles se développent majoritairement à des pH compris entre 4 et 6,5 et certaines sont encore actives à pH 9,6 ou à pH 3,2. Elles ont des tolérances très variables vis-à-vis du sel (Doguiet Koffi- Denis, 2010).

I.5 Métabolisme énergétique des bactéries lactiques

I.5.1 Métabolisme des sucres

Les sucres utilisés par les bactéries lactiques sont fermentés essentiellement en acide lactique. Pour pénétrer dans la cellule, ces sucres doivent d'abord franchir la membrane cellulaire. Deux systèmes de transports actifs des sucres sont présents chez les bactéries lactiques : le système phosphotransférase phosphoénol-pyruvate dépendant (PTS), qui couple le transport et la phosphorylation du glucide (phosphorylation en cascade), et le système perméase

énergie-dépendant, qui fait pénétrer les glucides sous forme de sucres libres (Corrieu *et al.*, 2008). La fermentation lactique s'effectue selon deux voies (figure 2).

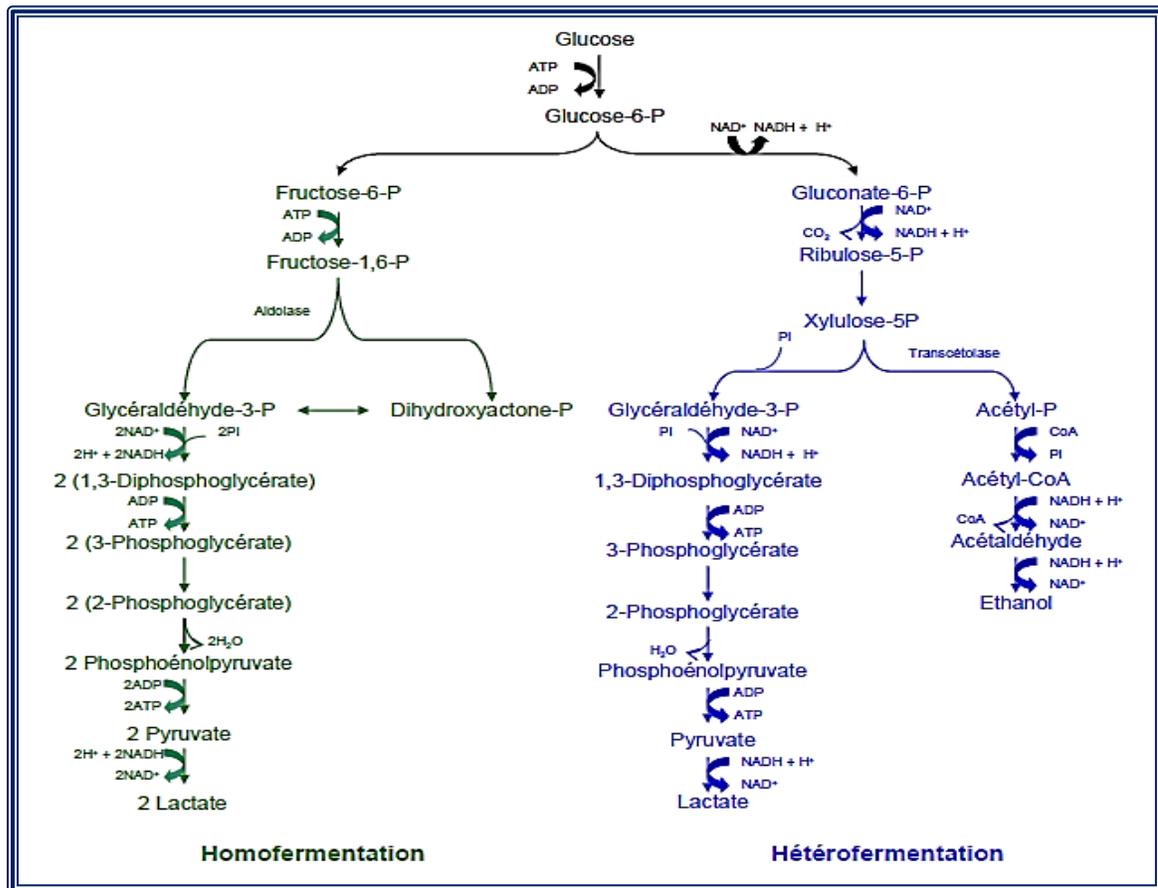


Figure 2 : Fermentation du lactose chez les bactéries lactiques : voie homofermentaire et voie hétérofermentaire.

- ✓ Voie d'Embden-Meyerhof : homofermentation, dont laquelle l'acide lactique est le principal ou le seul produit du métabolisme excrété à partir du substrat.
- ✓ Voie de Dickens-Horecker : hétérofermentation, conduisant à l'acide lactique en mélange avec d'autres produits d'excrétion comme le CO₂, acide acétique, éthanol...

Certaines bactéries homofermentaires sont aussi capables de fermentation hétérolactique dans des conditions de croissance non optimales ou selon la nature du sucre utilisé (Leveau *et al.*, 1993).

I.5.2 Métabolisme des protéines

Après l'utilisation des acides aminés et des peptides libres, les bactéries lactiques doivent, pour croître dans le lait, hydrolyser les protéines. Le système protéolytique de ces bactéries est constitué de deux types d'enzymes distinctes : les protéases capables d'hydrolyser des protéines natives par exemple les caséines ou leurs dérivés et les peptidases détectées par l'hydrolyse de peptides issus de la dégradation des protéines. Ces enzymes peuvent être intracellulaires ou liées à la paroi bactérienne (Leveau *et al.*, 1993).

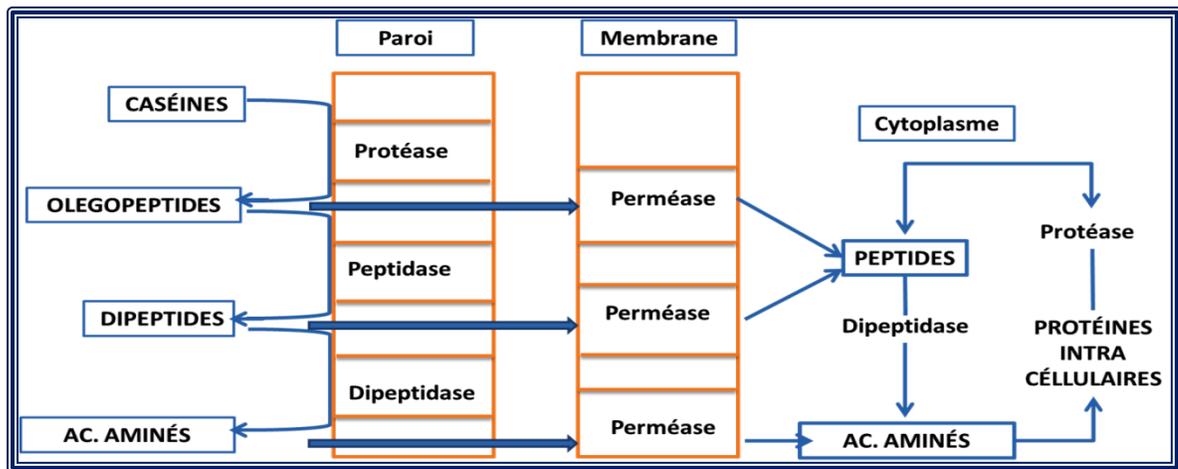


Figure 3 : Protéolyse du lait par les bactéries lactiques (Leveau *et al.*, 1993).

Les enzymes intracellulaires peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire par l'autolyse bactérienne liée à l'âge de la cellule ou aux conditions physiologiques défavorables qui activent les autolysines capables d'hydrolyser les peptidoglycanes de la paroi (Roudj *et al.*, 2009). La protéolyse du lait par les bactéries lactiques est résumée dans la figure 3.

I.5.3 Métabolisme du citrate

Le citrate est transporté à l'intérieur des cellules par une citrate perméase où il est scindé en acétate et en oxaloacétate par le complexe enzymatique citrate lyase. L'oxaloacétate est converti en pyruvate et en CO₂ par une oxaloacétate décarboxylase. Du 2,3 butylène glycol peut être produit à partir de l'acétoïne par l'acétoïne réductase. Le citrate réprime la synthèse de cette enzyme ainsi que celle de la diacétyle réductase, ce qui peut expliquer l'accumulation du diacétyl ou de l'acétoïne dans les cultures de biovar *diacetylactis* (figure 4), (Houali, 1999).

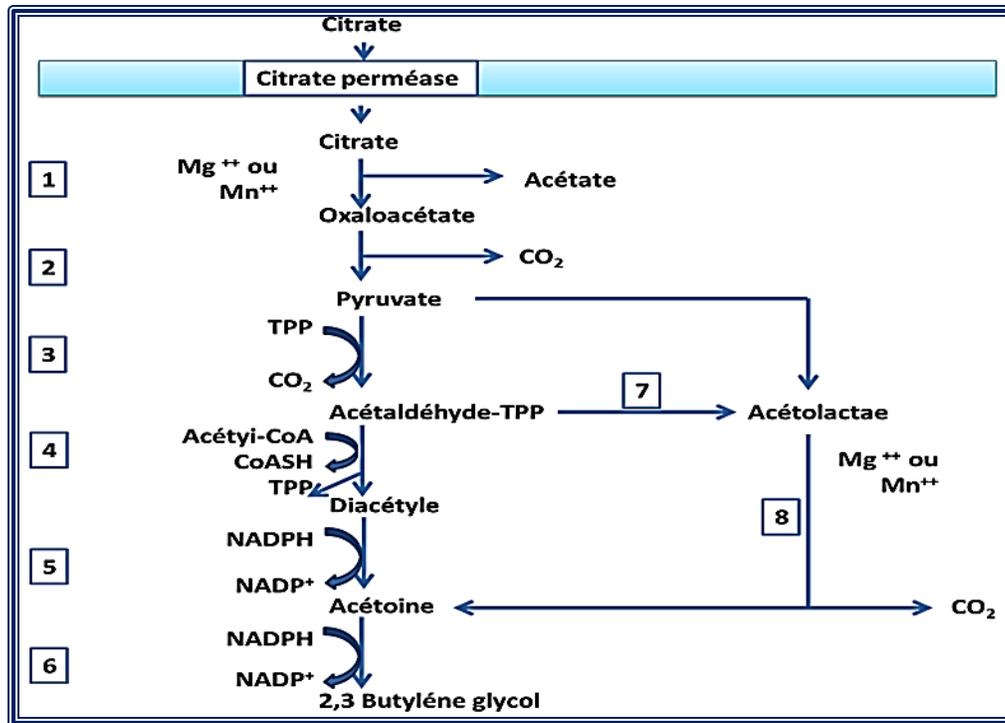


Figure 4 : Métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques adaptation de (Leveau *et al.*, 1993).

TPP : thiamine pyrophosphate ; (1) : citrate lyase (citritase) ; (2) : oxaloacétate décarboxylase ; (3) : pyruvate décarboxylase ; (4) : diacétyle synthétase ; (5) : diacétyle réductase ; (6) : acétoïne réductase ; (7) : acétolactate synthétase ; (8) : acétolactate décarboxylase.

I.6 Taxonomie et relations phylogénétiques entre genres de bactéries lactiques

I.6.1 Taxonomie des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries unies par une constellation de caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques. Elles appartiennent à la lignée des *Fimicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales* (Garrity *et al.*, 2004). Phylogénétiquement, elles appartiennent au phylum des *Clostridium* des bactéries Gram positif (G+C < 50 mol%). Traditionnellement, le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu G+C > 50 mol% et affecté au phylum des *Actinomyces* (figure 5) Néanmoins, les *Bifidobactéries* sont également considérées comme des bactéries lactiques, en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables,

(elles produisent de l'acide lactique et sont utilisées dans les laits fermentés) et du fait qu'elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques tel que le tractus gastro-intestinal (Holzapfel *et al.*, 2001, Klein *et al.*, 1998).

Selon Stiles et Michael E., (Stiles *et al.*, 1997) et Axelsson., (Axelsson, 2004), les bactéries lactiques englobent les genres suivants : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactosphaera*, *Vagococcus* et *Weisella*. Néanmoins, c'est surtout *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weisella* et à grande échelle *Lactobacillus*, qui ont une certaine importance dans les aliments (Vandamme *et al.*, 1996). La relation phylogénétique entre les différents genres des bactéries lactiques est représentée sur la figure 5 et est basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S. *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Lactosphaera* sont étroitement apparentés les uns aux autres. *Lactococcus* et *Streptococcus* apparaissent comme relativement apparentés, alors que *Lactobacillus* est phylogénétiquement distinct.

Récemment 15 genres lactiques ont été décrits (*Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Ermecoccus*, *Facklamia*, *Ignavigranum*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Desemzia*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Marinilactobacillus*, *Trichococcus*, *Atopobacter*, *Paralactobacillus*, *Oscillospira*). Parmi ces 15 nouveaux genres, seul *Paralactobacillus* est d'origine alimentaire (Leisner *et al.*, 2000, Bahloul *et al.*, 2012).

En outre, il est à signaler que le nombre d'espèces lactiques d'origine alimentaire ne cesse d'augmenter. Très récemment deux nouvelles espèces lactiques ont été isolées de la viande, il s'agit de *Lactobacillus versmoldensis* (Kröckel *et al.*, 2003) et *Vagococcus carniphilus* (Shewmaker *et al.*, 2004). Ces deux espèces ont été respectivement isolées du saucisson cru et de la viande hachée. Parallèlement, *Carnobacterium piscicola* a été reclassée comme *Cb. maltaromaticum* (Mora *et al.*, 2003). Koort et al (Koort *et al.*, 2004) a montré quant à lui que *Lb. Curvatus subsp. melibiosus* est synonyme de *Lb. Sakei subsp. carnosus*.

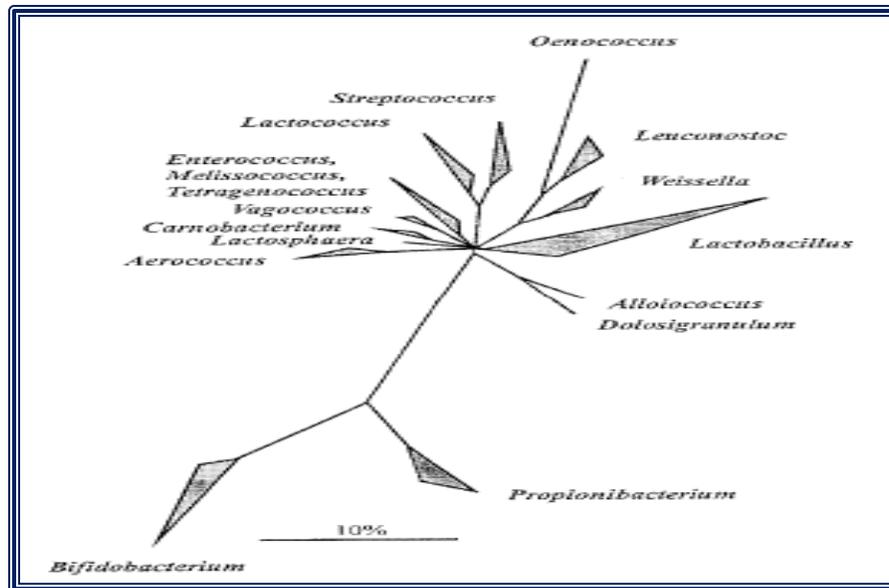


Figure 5 : Arbre consensus, basée sur l'analyse comparative des séquences ARNr, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible % G+C et les genres Gram positifs non reliés Bifidobacterium et Propionibacterium (Holzapfel *et al.*, 2001, Ammor, 2004).

I.6.2 Classification des bactéries lactiques

La première classification des bactéries lactiques basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen (Orla-Jensen, 1919). elle réunissait dans un même groupe, des bactéries à Gram+, non mobiles, non sporulantes, avec une morphologie bacille ou coque et produisant de l'acide lactique à partir de la fermentation anaérobie des sucres (Stile *et al.*, 1997).

Par la suite, d'autres propositions de classification ont été proposées, notamment celle de Lancefield (Lancefield, 1933) proposant des différenciations sérologiques et celle de Sherman. (Sherman, 1937) basé sur des caractéristiques physiologiques (Stiles *et al.*, 1997). Ces classifications étaient basées sur des critères phénotypiques, utilisés traditionnellement. Les critères phénotypiques étant la morphologie, l'étude des protéines et leurs fonctions, les analyses de la composition de la paroi, le type d'acides gras cellulaires, le type de quinones (accepteur d'électrons) (Vandamme *et al.*, 1996). La détermination de la gamme de sucres métabolisés (tests biochimiques) est encore aujourd'hui très utilisée et répandue grâce aux galeries API® commercialisées depuis les années 70 par Biomérieux (Marcy-l'Etoile, France). Le principe d'identification par galeries API® consiste à identifier les microorganismes par leur capacité à fermenter des sucres, capacités différentes en fonction des espèces, ce qui permettra ensuite de

les identifier par rapport à une base de données établie (Herve-Jimenez *et al.*, 2009, Ninane, 2008).

Les marqueurs chimiotaxonomiques tels que la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été aussi utilisés pour la classification. Les nouvelles techniques pour l'identification et la classification des bactéries lactiques remettent couramment en causes et / ou complètent les approches phénotypiques anciennement utilisées.

En 1977, Fox et al (Fox *et al.*, 1977a, Fox *et al.*, 1977b) introduisent la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques. Cette méthode a révolutionné la taxonomie des bactéries et la classification des BL a été profondément modifiée (Herve-Jimenez *et al.*, 2009). D'autres méthodes génotypiques (basées sur les acides nucléiques) sont aussi utilisées en classification, comme le pourcentage en GC ou l'hybridation ADN/ADN (Penaud, 2006).

Selon la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (Vos *et al.*, 2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilli et l'Ordre des Lactobacillales renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles (figure 6). Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de:

Aerococcus : les cellules de ce genre sont de forme ovoïde (1-2 μ m de diamètre), α -hémolytiques, non-gazogènes, arginine(-), pouvant croître à une concentration de 6.5% de NaCl, la division se déroule sur deux plans formant ainsi des tétrades. Cependant, des cellules isolées ou en paires peuvent être observées au milieu de la phase exponentielle.

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

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

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

Leuconostoc : ce genre comprend 10 espèces fastidieuses dans leurs exigences nutritionnelles, les cellules sont ellipsoïdales à sphériques généralement allongées qui s'arrangent en paires ou en chaînes, non acidophiles avec un pH optimum de croissance égal à 6.5. Néanmoins, certains *Leuconostocs* peuvent croître même à un pH de 4,5. La température optimale est comprise entre 20°C et 30°C mais la croissance peut aussi avoir lieu même à 5 °C. Les *Leuco nostocs* sont des hétérofermentaires obligatoires. Sur un milieu concentré en saccharose, certaines souches produisent des dextrans extracellulaires.

Oenococcus : les cellules sont immobiles, asporulantes de forme ellipsoïdale à sphérique, avec un arrangement en paires ou en chaînes, non hémolytiques et généralement non protéolytiques. Elles exigent un milieu riche en acides aminés et en facteurs de croissance, leur pH optimum étant de 6 à 6,8 et la température optimale de 20°C à 30°C.

Pediococcus : ce genre est représenté par neuf espèces ayant un métabolisme homofermentaire. Il rassemble des cellules immobiles de forme sphérique parfois ovoïdes, isolées ou en paires qui se divisent dans deux directions perpendiculaires formant ainsi les tétrades mais jamais les chaînes. Certaines espèces produisent une catalase ou une pseudocatalase. Les cellules sont acidophiles mais non halophiles et croissent à pH: 5 mais pas à pH: 9, la température optimale de croissance variée est dans l'intervalle de 25°C à 35°C.

Streptococcus: les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est 37°C.

Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH: 9.6. Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes.

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

Tetragenococcus : ce genre rassemble des cellules immobiles, sphériques ou ovoïdes avec un diamètre de 0.5-1.0 µm formant des tétrades après leur division dans deux directions perpendiculaires ; comme elles peuvent être isolées en paires. Le métabolisme des tétragenococci est homofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ à partir de glucose comme ils sont incapables de réduire les nitrates ni d'hydrolyser l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 35°C et ne peuvent pas croître à 10°C et à 45°C.

Weissella: les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont immobiles et hétérofermentaires. La température optimale de croissance est de 15°C, mais quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 45°C (Garrity *et al.*, 2008, Vos *et al.*, 2009).

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

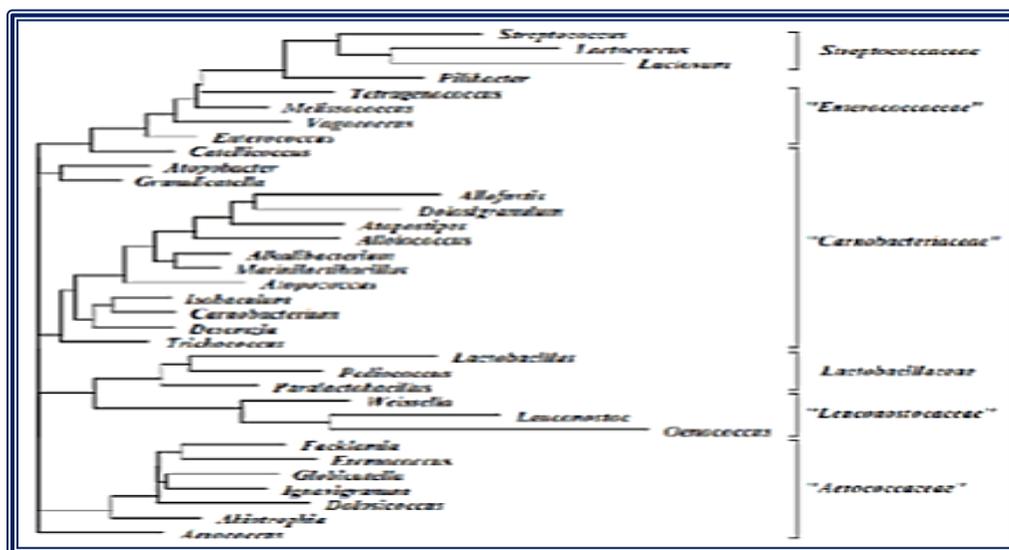


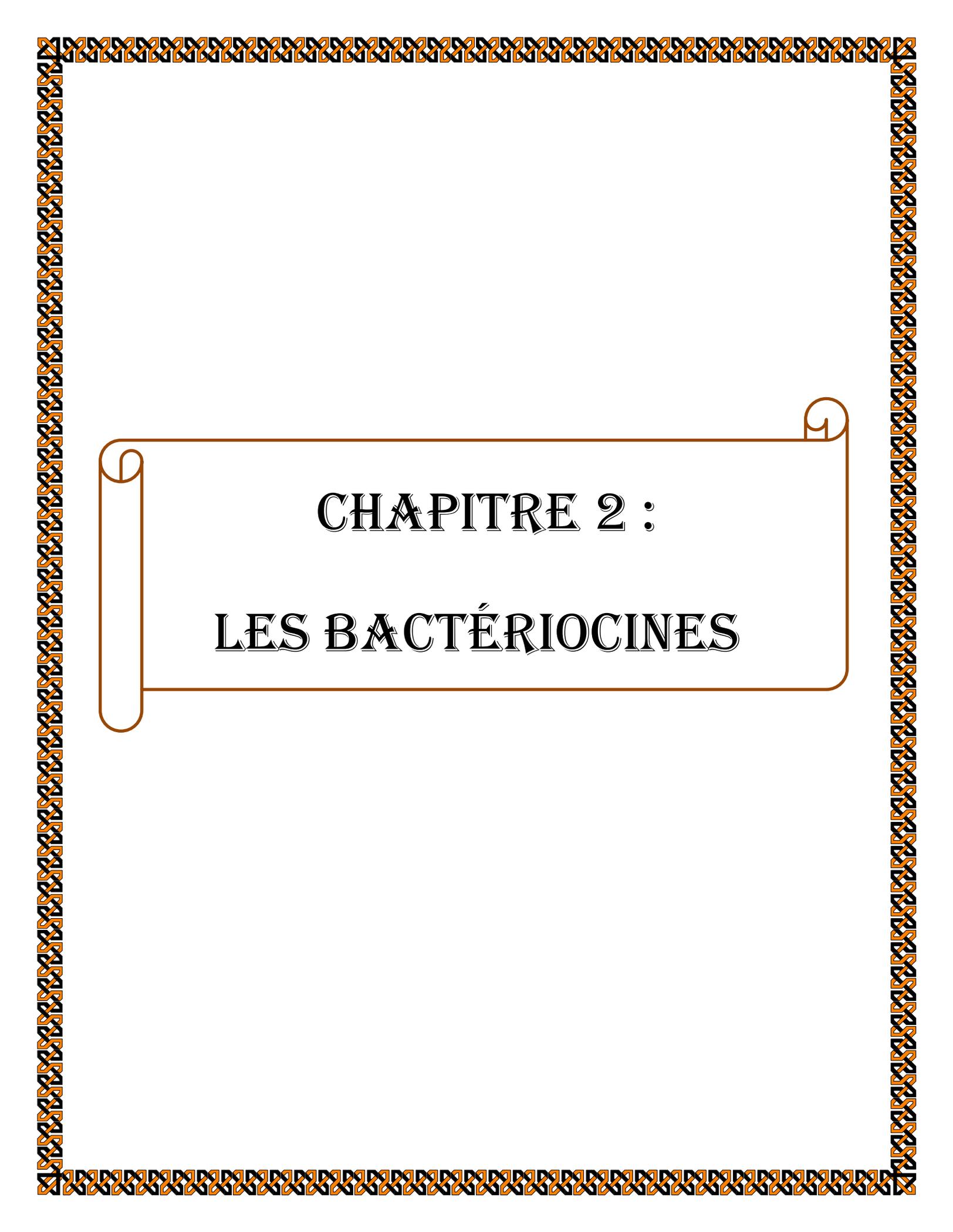
Figure 6 : Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre « Lactobacillales » dans la classe des « bacilli » (Vos *et al.*, 2009).

I.7 Le genre *Lactococcus*

Les cellules de ce genre sont sphériques ou ovoïdes isolées, en paires, ou en chaînes. De type mésophiles, leur température optimale varie de 10 à 40°C mais sont incapables de se développer à 45°C. Celles-ci se développent généralement à 4% de NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits (Ababsa, 2012).

I.7.1 L'espèce *Lactococcus garvieae*

Lactococcus garvieae est une bactérie lactique qui a été communément utilisée dans la fabrication de nombreuses variétés de fromages et autres produits laitiers fermentés (El-Baradei *et al.*, 2007, El-Baradei *et al.*, 2008) et des produits de viande (Aquilantia *et al.*, 2007). La capacité de certaines bactéries lactiques à produire des protéines ayant des propriétés bactéricides appelées bactériocines, a conduit à leur utilisation comme bio-conservateurs dans l'industrie alimentaire contre une gamme de bactéries pathogènes, y compris *Listeria sp.* et *Clostridium sp.* (Monteagudo-Mera *et al.*, 2012, Schoster *et al.*, 2013). En outre, en raison des bactériocines, certaines bactéries lactiques sont considérées comme des organismes à agir bio-protectrices qui jouent un rôle majeur dans la composition du microbiote (Bernbom *et al.*, 2006). Premièrement isolé de cas de mammite bovine (Collins *et al.*, 1983), *L. garvieae* a été reconnue comme un pathogène potentiel des différentes espèces de poissons, y compris la truite arc (Vendrell *et al.*, 2006). En outre, *L. garvieae* a été impliqué dans de nombreux cas cliniques, y compris l'endocardite infectieuse associée à la septicémie, spondylodiscite, urinaires et les infections cutanées (Yiu *et al.*, 2007, Zuily *et al.*, 2011).



CHAPITRE 2 :

LES BACTÉRIOCINES

CHAPITRE 2 : LES BACTÉRIOCINES

II.1 Historique sur les bactériocines

La découverte de la première bactériocine remonte à 1925. Cette dernière, isolée d'*Escherichia coli*, possédait une activité bactéricide envers une autre souche d'*Escherichia coli*. Elle fut nommée colicine V (Gartia, 1925). A cette époque, le concept de compétitions entre diverses bactéries était instauré et bien accepté. Par contre, celui ou des bactéries inhibent la croissance de souches de la même famille diffère des conceptions établies. La découverte d'une bactériocine chez les Lactocoques remonte à 1933. A cette époque, (Whitehead, 1993) avait observé dans un lot de lait spécifique que la présence de deux souches de Lactocoques inhibait la croissance d'un ferment de culture fromagère. L'étude démontra que les deux Lactocoques produisaient une substance de nature protéique résistante au traitement thermique.

Ce n'est qu'en 1944 que la première bactériocine d'origine lactique, la diplococcine, fut identifiée (Oxford, 1944). C'est en 1951 que l'utilisation de bactériocine pour protéger les aliments fut proposée. En effet, (Hirsch *et al.*, 1951) démontrèrent que la Nisine inhibait la croissance de *Clostridium* lors de la maturation d'un fromage de type suisse.

Le terme plus général de bactériocine fut proposé en 1953 pour englober tous les agents de type colicine caractérisés par une activité bactéricide (Jacob *et al.*, 1953). A cette époque, les bactériocines étaient encore définies comme ayant un spectre d'action limité. En 1963, (Hamon *et al.*, 1963) observèrent que certaines bactériocines produites

par des bactéries à Gram + pouvait avoir un spectre d'action étendu. Malgré cela, (Tagg *et al.*, 1976) proposent une définition selon laquelle les bactériocines ne regroupent que celles qui ont un spectre d'action limité. Bien que cette définition soit appropriée pour la majorité des bactériocines, elle fut par la suite élargie pour englober les bactériocines qui ont un spectre d'action étendu (Klaenhammer, 1993).

Aujourd'hui, il est généralement accepté que la majorité de ces peptides sont cationiques et hydrophobes, qu'ils sont sensibles aux protéases et qu'ils présentent une activité maximale à pH acide) (Ennahar *et al.*, 2000).

II.2 Définition des bactériocines

Les bactériocines sont des substances antimicrobiennes de nature protéiques dont l'activité inhibitrice est dirigée contre des espèces taxonomiquement proches du microorganisme producteur (Tagg *et al.*, 1976). La détection des bactériocines remonte à 1925 par Andre Gratia qui a observé que la croissance de certaines souches d'*Escherichia coli* a été inhibée en présence d'un composé antibactérien, dont il a donné le nom de colicine. La colicine V a été caractérisée comme composé peptidique thermostable (Gartia, 1925). Tagg, et al. (Tagg *et al.*, 1976) suggéraient qu'un composé antimicrobien ne doit être considéré comme une bactériocine que lorsqu'il satisfait aux critères suivants :

1. L'activité des bactériocines doit disparaître sous l'action des protéases.
2. Un spectre d'inhibition étroit dirigé contre les espèces apparentées à la souche productrice.
3. La présence d'une fraction protéique biologiquement active.
4. Un mode d'action bactéricide.
5. Un site d'attachement (récepteur) spécifique sur les cellules sensibles.
6. La bactérie productrice synthétise une molécule qui l'a protège contre sa propre bactériocine.
7. Les bactériocines sont codées par des plasmides.

Comme cette définition est restrictive et plusieurs substances inhibitrices ne peuvent réunir tous ces critères, les mêmes auteurs ont proposés que les bactériocines produites par les bactéries à Gram + doivent être aux moins des protéines biologiquement actives ayant une action bactéricide contre les micro-organismes qui leurs sont sensibles.

Cette définition risque de changer puisqu'il est aujourd'hui admis que les bactériocines peuvent avoir un spectre plus large incluant des espèces qui ne sont pas proche sur le plan taxonomique du micro-organisme producteur (Stevens *et al.*, 1991).

Les bactériocines sont produites par une vaste gamme d'espèces bactériennes et forment un groupe hétérogène de souches productrices, à leurs spectres d'action antimicrobiens, leurs modes d'action et leurs propriétés physico-chimique.

II.3 Classification des bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes proposé par (Klaenhammer, 1993). classes sont décrites ci-dessous.

II.3.1 Classe I

II.3.1.1 Les lantibiotiques

Peptides de taille 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 et la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (Mc Auliffe *et al.*, 2001, Twomey *et al.*, 2002). Certains Lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la Lacticin 3147. Les séquences et structures d'un l'antibiotique de chaque type se trouvent sur la figure 7.

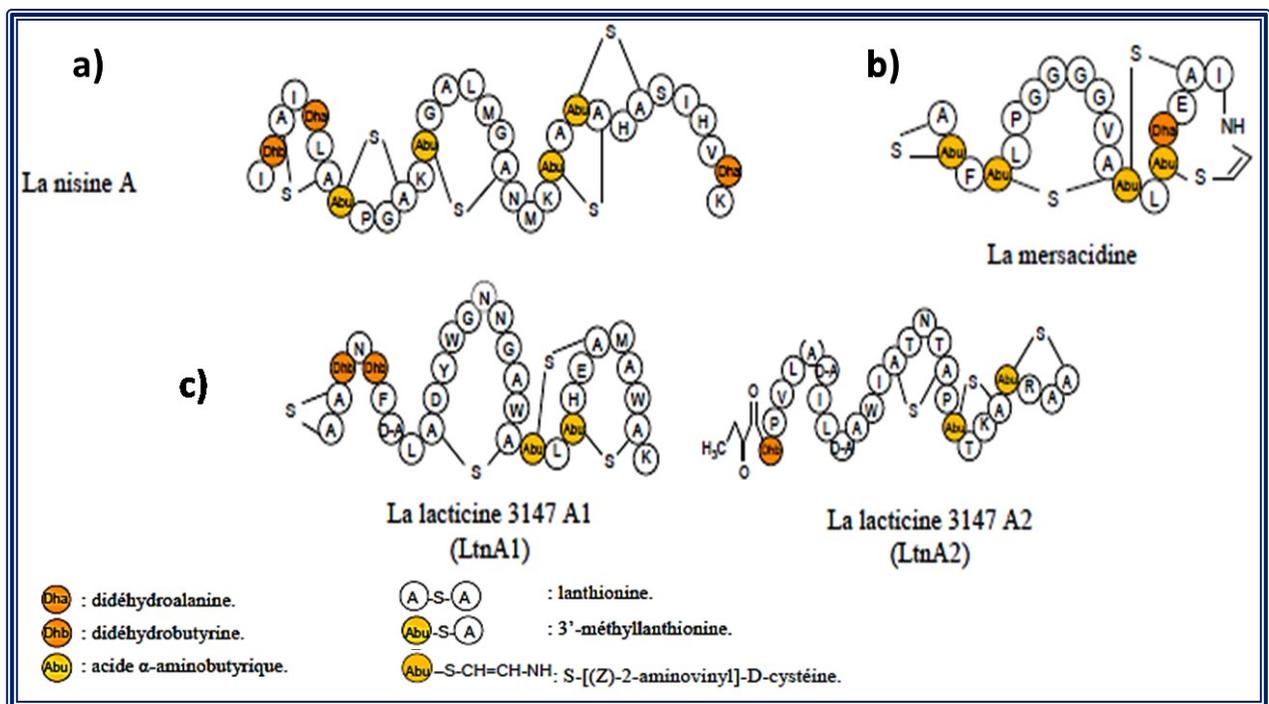


Figure 7 : Séquence et structure de Lantibiotiques : a) type A (Nisine), b) type B (Mersacidine), c) lantibiotique « Two-peptide » (Lacticine3147A1 et A2).

II.3.2 Classe II

Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoélectrique varie entre 8 et 10. Les séquences de quelques bactériocines appartenant à cette classe se trouvent sur le tableau 1. 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 septicité d'action (Fimland *et al.*, 2000). 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 (Eijsink *et al.*, 1998, Fimland *et al.*, 2000, Drider *et al.*, 2006, 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.

II.3.3 Classe III

Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. 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 *Spreptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Nilsen *et al.*, 2003, Papagianni, 2003, Nigutova *et al.*, 2007).

II.3.4 Classe IV

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

Tableau 1: Séquences de quelques bactériocines des classe II.

Classe IIa- (Nissen-Meyer <i>et al.</i> , 2009)																																																
Sous groupe 1	1	10	20	30	40																																											
Entéroïcine A	T	T	H	S	G	K	Y	Y	G	N	G	V	Y	C	T	K	N	K	C	T	V	D	W	A	K	A	T	T	C	I	A	G	M	S	I	G	G	E	L	G	G	A	I	P	G	--	K	C
Divercine V41 :	T	T	K	Y	Y	G	N	G	V	Y	C	N	S	K	K	C	W	V	D	W	G	Q	A	S	G	C	I	G	T	V	V	G	G	W	L	G	G	A	I	P	G	--	K	C				
Divergicine M35 :	T	T	K	Y	Y	G	N	G	V	Y	C	N	S	K	K	C	W	V	D	W	G	T	A	Q	G	C	I	D	--	V	V	I	G	Q	L	G	G	G	I	P	G	K	G	K	C			
Coaguline :	K	Y	Y	G	N	G	V	T	C	G	K	H	S	C	S	V	D	W	G	K	A	T	T	C	I	I	N	G	A	M	A	W	A	T	G	G	H	Q	G	T	H	K	C					
Pédiocine PA-1:	K	Y	Y	G	N	G	V	T	C	G	K	H	S	C	S	V	D	W	G	K	A	T	T	C	I	I	N	G	A	M	A	W	A	T	G	G	H	Q	G	N	H	K	C					
Sakacin P :	K	Y	Y	G	N	G	L	S	x	N	K	K	x	T	V	D	W	G	T	A	I	G	I	I	G	N	N	A	A	N	x	A	T	G	G	A	A	G	x	N	K	?						
Listériocine 743A:	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	G	K	H	S	C	T	V	D	W	G	T	A	I	G	N	I	G	N	N	A	A	N	W	A	T	G	G	N	A	G	W	N	K						
Mundticine e KS:	K	S	Y	G	N	G	V	H	C	N	K	K	C	W	V	D	W	G	S	A	I	S	T	I	G	N	N	S	A	A	N	W	A	T	G	G	A	A	G	W	K	S						
Mundticine:	K	Y	Y	G	N	G	V	S	C	N	K	K	C	S	V	D	W	G	K	A	I	G	I	I	G	N	N	S	A	A	N	L	A	T	G	G	A	A	G	W	K	S						
Piscicoline 126:	K	Y	Y	G	N	G	V	S	C	N	K	K	C	S	V	D	W	G	K	A	I	G	I	I	G	N	N	S	A	A	N	L	A	T	G	G	A	A	G	W	S	K						
Sakacine 5X:	K	Y	Y	G	N	G	V	S	C	N	K	G	C	T	V	D	W	S	K	A	I	G	I	I	G	N	N	A	A	N	L	T	T	G	G	A	A	G	W	N	K	G						
Leucocine C:	K	Y	Y	G	N	G	L	S	C	N	K	S	G	C	S	V	D	W	S	K	A	I	S	I	I	G	N	N	A	V	A	N	L	T	T	G	G	A	A	G	W	K	S					
Sous groupe 2																																																
Lactococcine MMFII :	T	S	Y	G	N	G	V	H	C	N	K	S	K	C	W	I	D	V	S	E	L	E	T	Y	K	A	G	T	V	S	N	P	K	D	I	L	W											
Leucocine A :	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	T	K	S	G	C	S	V	N	W	G	E	A	A	S	A	G	V	H	R	L	A	N	G	G	N	G	F	W											
Mésentéricine Y105 :	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	T	K	S	G	C	S	V	N	W	G	E	A	A	S	A	G	I	H	R	L	A	N	G	G	N	G	F	W											
Sakacine G :	K	Y	Y	G	N	G	V	S	C	N	S	H	G	C	S	V	N	W	G	Q	A	W	T	C	G	V	N	H	L	A	N	G	G	H	G	V	C											
Plantaricine C19 :	K	Y	Y	G	N	G	L	S	C	S	K	K	G	C	T	V	N	W	G	Q	A	E	S	C	G	V	N	R	V	A	T	A	G	H	G	K	x											
Plantaricine 423 :	K	Y	Y	G	N	G	V	T	C	G	K	H	S	C	S	V	N	W	G	Q	A	E	S	C	S	V	S	H	L	A	N	E	G	H	G	K	C											
Sous groupe 3																																																
Curvacine A :	A	R	S	Y	G	N	G	V	Y	C	N	N	K	C	W	V	N	R	G	E	A	T	Q	S	I	I	G	G	M	I	S	G	W	A	S	L	A	G	M									
Carnobactériocine BM1:	A	I	S	Y	G	N	G	V	Y	C	N	K	E	K	C	W	V	N	K	A	E	N	K	Q	A	I	T	G	I	V	I	G	G	W	A	S	L	A	G	M	G	H						
Entéroïcine P:	A	I	R	S	Y	G	N	G	V	Y	C	N	N	S	K	C	W	V	N	W	G	E	A	K	E	N	I	A	G	I	V	I	S	G	W	A	S	L	A	G	M	G	H					
Sous groupe 4																																																
Bactériocine 31 :	A	T	Y	Y	G	N	G	L	Y	C	N	K	Q	K	W	D	W	N	K	A	S	R	E	I	G	K	I	I	V	N	G	W	V	Q	H	G	P	A	P	R								
Bactériocine RC714 :	A	T	Y	Y	G	N	G	L	Y	C	N	K	E	K	W	D	W	N	Q	A	K	G	E	I	G	K	I	I	V	N	G	W	N	H	G	P	A	P										
Bactériocine T8 :	A	T	Y	Y	G	N	G	L	Y	C	N	K	E	K	W	D	W	N	Q	A	K	G	E	I	G	K	I	I	V	N	G	W	N	H	G	P	A	P	R									
Pénocine A :	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	G	K	T	C	Y	V	D	W	G	Q	A	T	A	S	I	G	K	I	I	V	N	G	W	T	Q	H	G	P	W	A	H	R							
Entéroïcine SE-K4 :	A	T	Y	Y	G	N	G	V	Y	C	N	K	Q	K	W	D	W	S	R	A	R	S	E	I	I	D	R	G	V	K	A	Y	V	N	G	E	T	K	V	L	G							
Carnobactériocine B2 :	V	N	Y	G	N	G	V	S	C	S	K	T	K	C	S	V	N	W	G	Q	A	T	Q	E	R	Y	T	A	G	I	N	S	F	V	S	G	V	A	S	G	A	G	S	I	G	R	R	P

Classe IIb - deux peptides. (Leah <i>et al.</i>, 2009)	
Lactocine 705 :	Lac705 α MDNLNPKFKLSDNKLQATIGG GMSGTYICGIPDFLKCCTAECISAANKHKKGRGLY Lac705 β MESNKLEKFANISNKDLNKITGG CFWGGICTYIACRVCAAYGCAQASANNHSPING
Lactococcine G :	LcnG α MKELSEKELRECVGG GTWDDI CGGICRVAYWGTAMC MSDVNQASRINRKKKH LcnG β MKNNNNPFKDMMEIIEDGELVSIITGG KKWGLAWVDPAYEPI CFKCAI KEGNKDKWKNI
Lactococcine Q :	LcnQ α MKELSEKELRECVGG SIWGD ICGVC KAAYW GTAMC MSDVNQASRINRKKKH LcnQ β MKNNNNPFKDMMEIIEDGELVSIITGG KKWGLAWVPEPAGEFL CFKCAI KEGNKDKWKNI
Lactacine F :	Laf A MKQFNLYLSHKDLAVVVG RNNWQTNVGGAV CFAVCSAMI CFYVCFYCF PACAVAGAHYLPILWGTVAATGGPGKIRK Laf X MKNLNDKELSKIIVGG NRRGDTVLSAAS CACTC IKACKSFGPWGMATCGV CAAI CGYV YTHN
Plantaricine :E/F	Pln E MLQFEKIQYSRLPQKKLAKISGG FNRG CFYFCK SVRVHVD ICVAG IRGILKSIR Pln F MKKFLVLRDRELNAISGG VFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISA VR CFPI GG
Plantaricine J/K :	Pln J MTVNMIKDLDDVDAFAPISNNKLVVGG GAWKNFWSLR CFYD CEAGRIRR Pln K MKIKLTVLNEFEELTADAENISGG RRSRKN GI CFYI CFYFCA VERAVLGGSRDYNK
Plantaricine NC8 :	PlnNC8 α MNNLNKFSTLGSLSQIEGG DLITKLWSS CFYI CFK KARNNLKHPYQF PlnNC8 β MDKFEKISTSNLEKISGG SVPTSVTYLLGIKIL NSAY CFR CFYI CFK SNKGFYH
Plantaricine S :	Pls α MNNALSFEQQFTDFSTLSDSELEVEGG RNKLAY MC RY CFK ATIFGLAANALLA Pls β MDKIIKFGGISDDQLNAVIGG KKKKQSN Y CFR CFYI CFK AVSFGEGFLNAN
Salivaricine P :	Sln 1 KRGPNCV CFYI CFYFCA CAAGV CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA LTCL Sln 2 KNGYGGSGNRWVHCG CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA LTCL
ABP-118 :	Abp118 α MKKEFTVLTECELAKVDGG KRGPNCV CFYI CFYFCA CAAGV CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA LTCL Abp118 β MKNLDRFTIMTEEDNLASVNGG KNGYGGSGNRWVHCG CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA LTCL
Entéroccine 1071 :	Ent1071A MKQYKVLNEKEMKPIGG ESVFSKI CFYV CPAAYWILKGLGNMSDVNQADRINRKKH Ent1071B MKNIKNASNIKVIEDNELKAITGG GPGKWL CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA LTCL
Entéroccine C :	Ent C1 MKQYKVLNEKEMKPIGG ESVFSKI CFYV CPAAYWILKGLGNMSDVNQADRINRKKH Ent C2 MKNIKNASNIKVIEDNELKAITGG GPGKWL CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA LTCL
Mutacine IV :	Nlm A KVSQGEAVAAIGICATASAA CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA LTCL Nlm B DKQADTFLSAVG CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA LTCL
Thermophiline 13 :	Thm A AYSQDCLDMGCGYAL CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA LTCL Thm B QINW CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA LTCL
Brochocine C :	Brc A MHKVKLLNQBELQIIVGG YSSKDC CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA LTCL Brc B MKKELLNKNEMSRITGG KIN CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA CFYVCCANLGNVGG CFYI CFYFCA LTCL
Classe IIc (Martin-Visscher <i>et al.</i>, 2009)	
Groupe i	
Cc1A :	-LVAYGIAQGTAEKVVSLINAG---LTVGSIIS-ILG-G-----VTVGLSGVFTAVKAAIAKQGIKKAIQL
LacQ :	LIDHLGAPRWAVDTILGAIAVG----NLASWVL-ALVPG-PGWAVKAGLATAAAIVKH----QGKAAAAAW
AS-48 :	MAKEFGIPAAVAGTVLNVVEAGGWVTTIIVSILT-AVGSGLSLLAAAGRESIKAYLKEIKKKGKRAVIAW
CirA :	VAGALGVQTAATTVNVVILNAGTLVTVLGGIIA-SIASGGAGTLMTIGWATFKATVQK-LAQSMARAIAV
Ubér :	LAGYTGIASGTAKKVVDIDKGAAAFVVISIISTVVISAGALG-AVSASADFIILTVKNYISRNLKAQAVIW
	* .. .: : . : : : * . : : : .
Groupe ii	
GassA :	IYWIADQFGIHLATGTARKLLDAMASGASLGTAFAAAILGVTLPAWALAAAGALGATAA
Reut 6 :	IYWIADQFGIHLATGTARKLLDAMASGASLGTAFAAAILGVTLPAWALAAAGALGATAA
B-AR10 :	IYFIADKMGIQ LAPAWYQDIVNWVSAGGLTTTGFAIIVGVTPAWIAEAAAAFGIASA
	** : ** : : ** : ** . . : : : : : : * * . * * * : : : * * * * : : *

II.4 Le mécanisme de production des bactériocines et sa régulation

Différentes protéines sont impliquées dans la production des bactériocines et sa régulation. Les bactériocines sont produites sous forme d'un pré peptide non-biologiquement actif qui subira des modifications post-traductionnelles pour aboutir au peptide actif. Cette production 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.

II.4.1 Les Lantibiotiques

L'organisation génétique et le mécanisme de production d'un lantibiotique, la nisine, est montrée sur la figure 8. Les gènes de biosynthèse des lantibiotiques ont été désignés par le symbole commun *lan*, avec un nom plus spécifique pour chaque lantibiotique (*nis* pour la nisine, par exemple). Le gène de structure, *lanA*, code pour un prépeptide contenant une séquence N Terminale de 23 à 30 acides aminés qui sera clivée lors du transport à l'extérieur de la cellule. Ce prépeptide subira différentes modifications post-traductionnelles afin d'acquérir les quatre acides aminés inhabituels.

La première étape de ces modifications consiste en la déshydratation de la sérine et de la thréonine pour former la déhydroalanine et la déhydrobutyrine. **La deuxième étape** consiste en la formation d'un lien thioéther entre ces résidus déshydratés et les cystéines environnantes, donnant aux lantibiotiques une structure cyclique. Les enzymes impliquées sont une déshydratase et une cyclase codée soit par les gènes *lanB* et *lanC* ou le gène *lanM*. Après ces modifications, le prépeptide sera clivé lors de l'excrétion hors de la cellule par la protéase **LanP** ou le domaine protéasique de l'ABC transporteur **LanT**. Cette dernière modification permettra d'obtenir le peptide biologiquement actif (Mc Auliffe *et al.*, 2001, Kleerebezem, 2004, Xie *et al.*, 2004, Patton *et al.*, 2005). La production des lantibiotiques est sous le contrôle d'un mécanisme de régulation à deux composantes basé sur le Quorum Sensing. Une histidine kinase **LanK** réagira à un stimulus extérieur et induira la phosphorylation d'un régulateur de réponse **LanR**. Ce régulateur de réponse phosphorylé va permettre l'activation de l'expression de l'opéron. Le stimulus extérieur est la bactériocine elle-même qui est présente dans la culture à basse concentration en début de croissance. Elle s'accumule et quand un certain seuil est atteint, elle interagit avec le système de régulation pour activer la transcription du gène de structure mais

également de ceux d'immunité et de transport, on parlera donc d'autorégulation (Mc Auliffe *et al.*, 2001, Twomey *et al.*, 2002, Kleerebezem, 2004, Patton *et al.*, 2005). Les quatre gènes *lanI*, *lanF*, *lanE* et *lanG* codent pour des protéines impliquées dans l'immunité de la souche vis-à-vis de la bactériocine qu'elle produit. Bien que le mécanisme d'action ne soit pas complètement compris, il semblerait que **LanI** est une lipoprotéine qui s'attache à la surface externe de la membrane et interagit avec le lantibiotique afin de l'empêcher d'y former des pores. **LanF**, **LanE** et **LanG** forment un ABC transporteur. Il permettrait d'exporter à l'extérieur de la membrane cytoplasmique les lantibiotiques qui n'auraient pas interagi avec la lipoprotéine **LanI** et qui s'y trouveraient, l'empêchant ainsi de former des pores (Mc Auliffe *et al.*, 2001, Twomey *et al.*, 2002, Stein *et al.*, 2003, Lubelski *et al.*, 2007).

Sur la figure 8, le substrat **NisA** est le pré-peptide 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**.

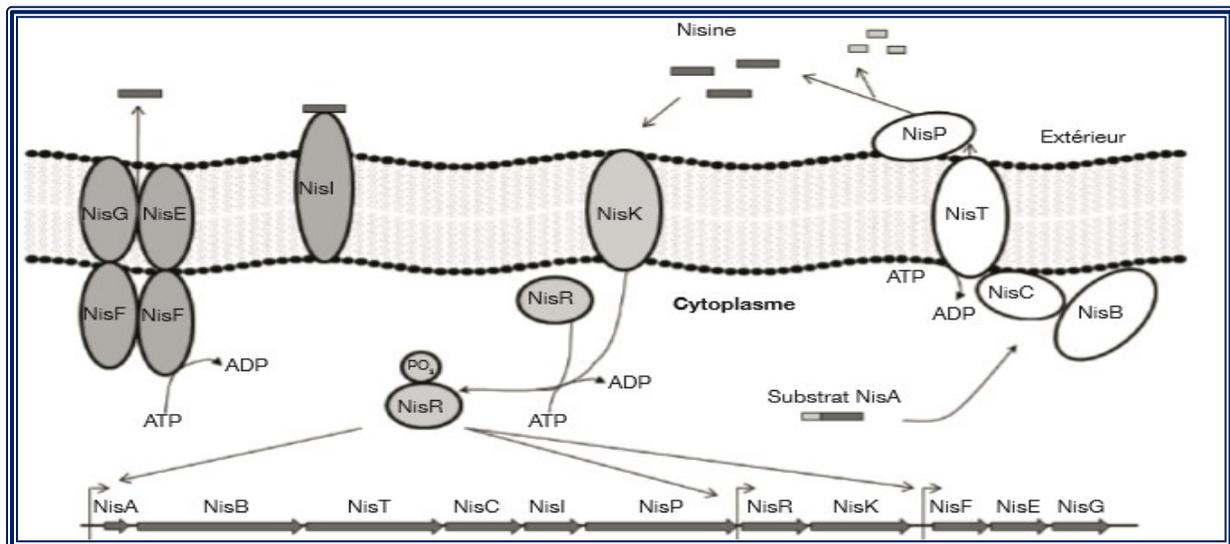


Figure 8 : Régulation de la production, modifications post-traductionnelles et auto-immunité de la nisine.

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 protectin 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).

II.4.2 Les bactériocines de classe III

La figure 9 montre l'organisation génétique de l'opéron codant pour deux bactériocines de classe IIa, la sakacin P et la piscicolin 126, ainsi que pour une bactériocine de classe IIb, l'ABP118. Les bactériocines de classe IIa sont également produites sous la forme d'un pré-peptide non biologiquement actif dont la séquence N-terminal très conservée, appelée séquence signal et contenant une vingtaine d'acides aminés, sera clivée du côté C-terminal d'un motif GG par le domaine protéasique de l'ABC transporteur lors de l'excrétion pour donner le peptide biologiquement actif (Ennahar *et al.*, 2000). Avec la formation d'un ou deux ponts disulfures cruciaux pour l'activité, ce sera la seule transformation post-traductionnelle (Drider *et al.*, 2006). Certaines bactériocines de classe IIa sont excrétées par le « sec-dependent pathways » revu par (De Keyzer *et al.*, 2003) et basé sur la translocation du peptide par un pore aqueux composé de plusieurs protéines (Van Wely *et al.*, 2001, Rusch *et al.*, 2007). Les peptides signaux de ces bactériocines ne contiennent donc pas de doublet glycine mais bien la séquence signal typique des protéines secrétées par ce système qui sera clivé par une peptidase durant la translocation (Van Wely *et al.*, 2001, De Kwaadsteniet *et al.*, 2006, Sánchez *et al.*, 2007).

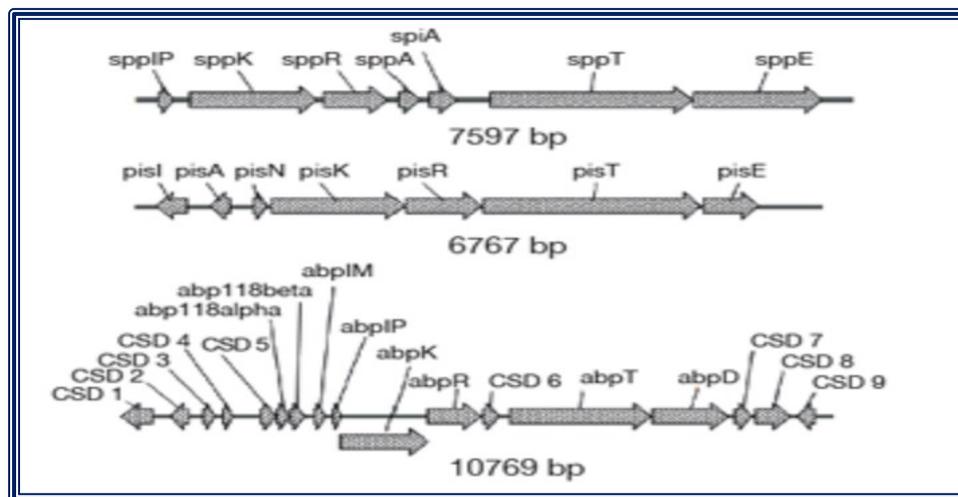


Figure 9 : Organisation génétique de bactériocines de classe II.

Spp : Sakacin P ; pis : piscicolin 126 ; abp118 : bacteriocine abp118_bacteriocin abp118 ; sppA, pisA, abp118 alpha et abp118 beta : gene de structure: spiA, pisI, abpIM ; gene d'immunité ; sppK, pisK, abpK : gene de l'histidine kinase ; sppR, pisR, abpR : gene de regulateur de réponse ; sppIP, pisN, abpIP : peptide d'induction ; sppT, pisT et abpT : gene de l'ABC transporteur ; sppE, pisE et abpD : gene de la protéine accessoire ; CDS1 à 9 : protéines hypothétiques dont la fonction n'est pas connue (figure 9) .

La régulation de la production des bactériocines de classe IIa est sous le contrôle d'un système de Quorum Sensing à trois composantes qui sont un peptide d'induction, une histidine kinase et un régulateur de réponse. Les gènes codant pour ces trois protéines sont co-transcrits (Eijsink *et al.*, 2002). Le peptide d'induction est produit à basse concentration comme un prépeptide de bas poids moléculaire, sans ou avec une très faible activité inhibitrice, stable à la chaleur, cationique et hydrophobe et dont la partie N-Terminal est clivée au niveau d'un doublet glycine lors de l'excrétion par l'ABC transporteur également impliqué dans l'excrétion de la bactériocine (Ennahar *et al.*, 2000, Eijsink *et al.*, 2002).

À une certaine concentration externe du peptide d'induction, l'histidine kinase transmembranaire est activée, ce qui induit la phosphorylation du régulateur de réponse et l'activation de l'expression des gènes de structure, d'immunité et de transport mais également du système de régulation à trois composantes. Le système est donc auto-induit (Dridier *et al.*, 2006, Eijsink *et al.*, 2002).

Cependant, il a été récemment suggéré que le gène codant pour le régulateur de réponse de la sakacin P (*sppR*), une bactériocine de classe IIa, pouvait produire deux protéines : une protéine complète et cette même protéine dont l'extrémité N-terminal est tronquée. Cette deuxième protéine tronquée peut alors réprimer l'expression des gènes codant pour la sakacin P, probablement en interférant avec l'action de la molécule complète (Straume *et al.*, 2007).

Les gènes codant pour la production des bactériocines de classe IIa sont, la plupart du temps, organisés en trois opérons, le premier contenant les gènes de structure et d'immunité, le deuxième les gènes nécessaires à la sécrétion de la bactériocine (l'ABC transporteur et une protéine accessoire) et le troisième les gènes du système de régulation à trois composantes. Le gène d'immunité code pour une protéine intracellulaire qui, en interagissant avec le complexe

membranaire formé par la bactériocine et la « mannose perméase », l'empêche de former des pores dans la membrane de la cellule productrice (Diep *et al.*, 2007).

Peu d'informations sont disponibles concernant la régulation de la production des bactériocines de classe IIb. Néanmoins, il a été montré qu'un système de régulation à trois composantes identique à celui retrouvé pour les bactériocines de classe IIa est impliqué dans la production de l'ABP-118 par *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius* UCC118 et des plantaricin E/F et J/K par *Lactobacillus plantaru* (Oppegård *et al.*, 2007, Flynn *et al.*, 2002).

II.5 Les mécaniques d'action des bactériocines

Le siège d'activité des bactériocines est la membrane cellulaire, raison pour laquelle les bactériocines n'ont pas d'activité contre les bactéries Gram-. Cependant, les mécanismes d'action des bactériocines sur la membrane sont variés.

II.5.1 Les lantibiotiques

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II (undecaprenyl-pyrophosphoryl MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un précurseur de peptidoglycanes. Suite à cette liaison, les lantibiotiques peuvent former des pores larges et non spécifiques dans la membrane cytoplasmique, ce qui va causer l'efflux rapide des petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va conduire à la dissipation des deux composantes de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. 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 (Mc Auliffe *et al.*, 2001, Twomey *et al.*, 2002, Bauer *et al.*, 2005, Patton *et al.*, 2005). Les lantibiotiques de type A dissipent la force proton-motrice par formation de 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. Néanmoins, certains forment également des pores dans la membrane des cellules cibles (Bauer *et al.*, 2005, Patton *et al.*, 2005). La nisine, un lantibiotique de type A, interagit avec le lipide II au niveau du MurNAc

tandis que la mersacidine, un lantibiotique de type B, interagit avec le GlcNAc du lipide II (Willey *et al.*, 2007). Les lantibiotiques composés de deux peptides comme la lacticine 3147 agissent également par formation de pores dans la membrane des cellules cibles (Mc Auliffe *et al.*, 2001). La lacticine 3147 (figure 1) a un spectre d'action large. Le peptide A1 a une activité qui est plus élevée en présence du peptide A2. Il a été récemment proposé que la lacticine 3147 A1 agit en se liant au lipide II, inhibant la synthèse des peptidoglycanes et permettant à la lacticine 3147 A2 de former un pore dans la membrane de la cellule cible (Morgan *et al.*, 2005, Wiedemann *et al.*, 2006).

II.5.2 Les bactériocines de classe II

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « mannose perméase », pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule, ce qui induit la perméabilisation de la membrane, la dissipation des deux composantes de la force proton motrice et la mort de la cellule (Dalet *et al.*, 2000, Héchard *et al.*, 2001, Gravesen *et al.*, 2002, Arous *et al.*, 2004, Vadyvaloo *et al.*, 2004, Bauer *et al.*, 2005). Le mécanisme de formation des pores n'est pas connu, même si l'hypothèse la plus courante est l'association de différentes molécules de la bactériocine (Ennahar *et al.*, 2000, Fimland *et al.*, 2000, Diep *et al.*, 2007). Les bactériocines de 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 force proton motrice. Les ions transportés sont spécifiques de la bactériocine (Oppegård *et al.*, 2007). Le ratio optimal d'activité entre les deux sous-unités est en général de 1:1 mais il est de 4:1 pour la lactocine 705 (Castellano *et al.*, 2007, Oppegård *et al.*, 2007). 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 liaison au même récepteur que pour les bactériocines de classe IIa (la « mannose perméase ») (Diep *et al.*, 2007). Castellano *et al.* (Castellano *et al.*, 2007) ont récemment montré que les deux peptides composant la lactocine 705 ont des activités bien spécifiques. La lactocine 705 α interagit avec la surface de la membrane cellulaire et la déshydrate, ce qui permet à la lactocine 705 β de former des pores.

II.5.3 Les bactériocines de classe III

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

II.6 Protection alimentaire

Les Bactériocines sont employés dans plusieurs domaines et leur utilisation dans le domaine alimentaire est devenue très intéressante grâce à leur potentiel d'assurer une sécurité microbienne et une bonne qualité de produits alimentaires (Delves-Broughton, 1990, Cutter *et al.*, 1998, Benech *et al.*, 2002). L'utilisation des bactériocines comme additifs naturels dans les aliments a succédé 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 (Nykänen *et al.*, 2000). Les produits à base d'œufs liquide pasteurisé (Delves-Broughton *et al.*, 1996), les fromages et d'autres produits laitiers (Delves-Broughton, 1990). En effet, la Nisine est la plus étudiée des bactériocines est 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 trente ans. Son utilisation a été tous d'abord établie comme préservateur dans les produits de fromage fondu, et depuis de nombreux d'autres applications alimentaires ont été rapporté (Delves-Broughton *et al.*, 1996). 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 près à consommer (Tahiri, 2007). Ces chercheurs n'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 monocytognes* et de *Clostridium botulinum* pendant 21 jours dans d'entreposage à 4 C °. De même aucun effet négatif n'a été observé au niveau de caractéristiques organoleptiques et sensorielles du saumon fumé traité. D'autres études ont montraient

l'utilisation des bactériocines comme agents antimicrobiens dans l'emballage des produits carnés. Des sacs enduits de Pédicines ont permis d'inhiber complètement la croissance de *Listeria monocytogenes* inoculé dans divers produits carnés conservés pendant 4 semaines à 4 C° (Tahiri, 2007). 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 :

1. Être actif sur les micro-organismes pathogènes aussi bien que sur ceux responsables des altérations des aliments.
2. Être inoffensifs pour les humains ou les animaux.
3. Être stables et non détruits au contact de l'aliment ou des micro-organismes.
4. Être rapidement solubles et distribué uniformément dans l'aliment.
5. Ne pas être inactivé par l'aliment ni conféré de saveur ou d'arôme à l'aliment.
6. Être économique.
7. Ne pas favoriser l'apparition du micro-organisme résistant.
8. Ne pas diminuer la valeur nutritive de l'aliment.

D'une façon générale, les conservateurs alimentaires entre autres les bactériocines inhibent les micro-organismes en interférant avec leur membrane cellulaire, leur activité enzymatique ou leur métabolisme génétique. Ainsi, ils peuvent dénaturer leurs protéines, altérer ou détruire leur ADN, leur paroi cellulaire ou leur membrane cytoplasmique. Ainsi, par ces divers mécanismes d'action, ces additifs naturels peuvent améliorer largement la sécurité alimentaire des produits.

II.7 Application des bactériocines dans le secteur de la santé

Tel que déjà mentionné, l'utilisation des bactériocines n'est pas restreinte au domaine alimentaire mais trouve aussi des applications dans le domaine médicale et médecine vétérinaire. Daw & Falkiner, (Daw *et al.*, 1996) ont rapporté que les bactériocines gagnent une attention particulière pour le traitement des infections des muqueuses causées par des bacilles a Gram négatifs tels *Pseudomonas*, *Klebsiella*, Entérobactéries. (Taylor *et al.*, 1949) , ont démontré que

la Nisine s'est avérée efficace contre des infections intra-mammaires dues aux Staphylocoques et Streptocoques.

D'autres études ont mentionnée que les bactériocines peuvent être une thérapie naturelle alternative aux antibiotiques. Mota-Meira *et al.*, (Mota-Meira *et al.*, 2000) ont montré que la nisine A et la mutacine B-Ny266 (isolée de *streptococcus mutans*) ont un potentiel antibiotique en remplacement de la vancomycine et de l'oxacilline, deux antibiotiques reconnus pour causer le développement de résistance chez les souches pathogènes traitées (entérocoques).

Le large spectre d'activité de la mutacine B-Ny266 contre des bactéries résistantes aux antibiotiques classiques supporte le développement de cette substance à des fins thérapeutiques (Mota-Meira *et al.*, 2000).

Wachsman *et al.*, (Wachsman *et al.*, 2003) ont montré que l'enterocine CRL35, produite par *Enterococcus faecium* CRL35, isolée de fromage, possède une activité antivirale contre le virus de l'herpès (HSV). L'inhibition du virus par l'entérocyne CRL35 serait liée à la prévention de la synthèse d'une glycoprotéine majeure impliquée dans le cycle de réplication du virus.

Récemment, Sejong *et al.* (Oh *et al.*, 2006) ont rapporté la bactériocine produite par *Lactococcus ssp.* HY449 possède une capacité à inhiber les bactéries tel que *Staphylococcus aureus* ATCC 65389, *Streptococcus pyogenes* ATCC 21059 et *Propionibacterium acnés* ATCC 6919 qui sont responsables des inflammations cutanées. L'application de cette bactériocine sur des sujets humains n'a causé ni des réactions allergiques cutanés ni d'irritations de la peau.

II.8 Problème de résistance aux bactériocines

A l'instar des antibiotiques conventionnels, certaines bactériocines sont sujettes aux mécanismes de résistance développés par les cellules bactériennes et qui tendent à réduire leur spectre d'activité. Plusieurs études rapportent un phénomène de résistance aux bactériocines de type nisine et pédiocine (Ennahar *et al.*, 2000, Gravesen *et al.*, 2001).

Dans le cas des bactériocines de classe IIa (type pédiocine), cette résistance naturelle affecte 1 à 8 % des souches sauvages des bactéries testées (Larsen *et al.*, 1993, Ennahar *et al.*, 2000) et se développe à des niveaux très élevés (Duffes *et al.*, 2000) comparativement au mécanisme de résistance à la nisine qui évolue graduellement (Gravesen *et al.*, 2001).

En effet, une activité de nisinase a été observée chez plusieurs *Bacillus ssp.*, (Jarvis *et al.*, 1971) *Bacillus cereus* produit une nisinase bien caractérisée qui possède une activité déhydroalanine réductase qui dégrade la nisine (Jarvis *et al.*, 1971). Dans certains cas, la résistance aux bactériocines peut être spontanées, elle résulte de l'accoutumance des bactéries à l'agent antimicrobien comme c'est le cas pour *Lactococcus Lactis* IL 1403 envers la Lacticine 3147 (Guinane *et al.*, 2006). Cependant, les souches résistantes à ces différentes bactériocines se sont montrées sensibles aux mutacines (Mota-Meira *et al.*, 2000, Morency *et al.*, 2001) et jusqu'à date aucun mutant résistant aux mutacines n'a été rapporté (Smith *et al.*, 2003, Dagry, 1996). Le développement de la résistance bactérienne aux bactériocines est un phénomène complexe dont les mécanismes ne sont pas totalement caractérisés mais qui semble incriminer plusieurs éléments. La résistance bactérienne peut survenir à la suite des altérations de la composition de la membrane cytoplasmique, des modifications en phospholipides membranaires, et des changements de la paroi cellulaire (Crandall *et al.*, 1998, Mc Entire *et al.*, 2004) ont montré que la résistance de *L. monocytogenes* à la nisine résulte d'une intense activité ATPase. D'autres études associent la résistance aux bactériocines à l'existence de plasmide.

Ainsi, Yun et ses collègues (Yun *et al.*, 2006) ont rapporté dans une étude effectuée chez *Lactococcus lactis*, que le gène déterminant la résistance à la nisine est situé sur un plasmide. Cette émergence de bactéries pathogènes résistantes à la nisine sème le doute quant à l'utilisation de bactériocines comme bio-préservatif alimentaire. A cela, on pourrait ajouter trois facteurs limitant qui réduisent leur efficacité dans les aliments :

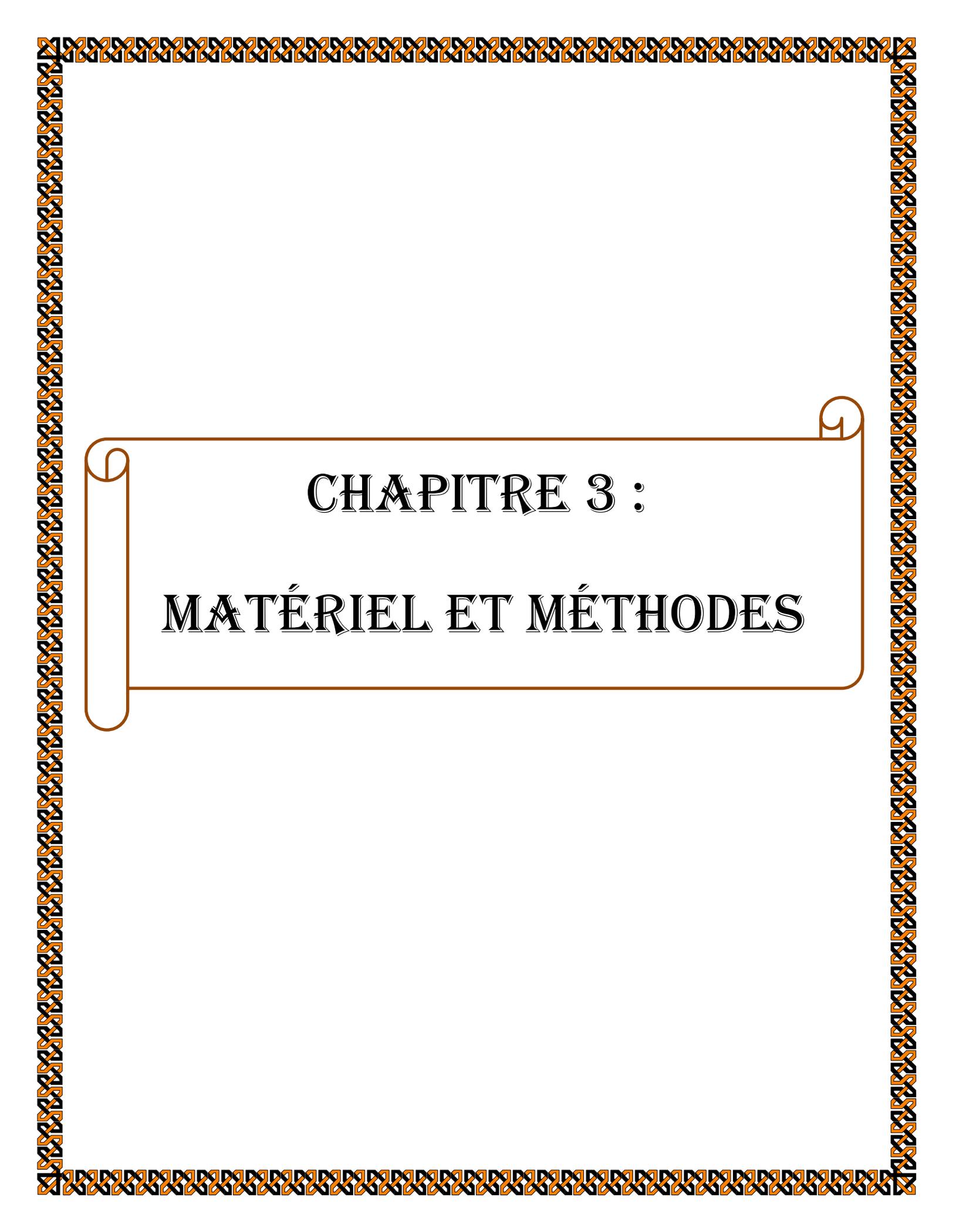
- Les bactériocines sont très peu actives contre les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures.
- Elles ne sont pas efficaces contre toutes les bactéries pathogènes à gram positif (cellules végétatives et spores). Leur spectre d'activité varie avec la nature de la matrice alimentaire.
- Il peut exister au sein des souches de bactéries à Gram positif sensibles, des mutants insensibles pouvant croître en présence de bactériocines (Hanlin, 1992).

Cependant, l'intérêt croissant du public pour les additifs de conservation d'origine biologique, stimulent les recherches sur d'autres bactériocines plus efficaces (Ennahar *et al.*, 2000). Ainsi, pour contourner le phénomène de résistance aux bactériocines, on préconise dans le

domaine alimentaire, l'utilisation combinée de plusieurs peptides antimicrobiens d'origines diverses et adaptés aux conditions de la matrice alimentaire.

Cela crée un effet synergique d'activité contre de nombreux pathogènes alimentaires. (Mulet-Powell *et al.*, 1998, Lüders *et al.*, 2003). Afin d'éliminer des bactéries indésirables, Sullivan *et al.* (Sullivan *et al.*, 2002) ont proposé l'introduction de bactériocines par application de culture de cellules productrices de plusieurs bactériocines.

De nouvelles techniques d'inhibition de croissance de micro-organismes pathogènes ou d'altération des aliments sont désormais utilisées. Leur principe est basé sur la combinaison des traitements physiques avec les bactériocines. Plusieurs études dans ce sens ont montré l'existence d'un effet synergique d'inhibition létale d'une association de la pression hydrostatique qui permet la destruction de tout microorganisme au-delà d'une pression de 200 Mpa, avec des bactériocines de bactéries lactiques sur des pathogènes à Gram positif et à Gram négatif (Hauben *et al.*, 1996).



CHAPITRE 3 :

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les travaux présentés dans cette thèse ont débutés au Laboratoire de Microbiologie à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et l'Univers à l'Université 08 Mai 1945, Guelma et en collaboration avec la (DSP) de la willaya de Guelma. La finalisation de ces travaux s'est déroulée à l'Institut Hospitalo-universitaire et à la Faculté de Médecine à Marseille, France.

La contamination des aliments est un problème majeur pour le consommateur. L'exploitation des interactions bactériennes est un nouveau moyen pour lutter contre les germes indésirables.

Nous allons pour cela essayer d'isoler et d'identifier des bactéries lactiques à partir de différents échantillons de lait fermenté de façon artisanale et quelques ferments lactiques commercialisés puis cribler celles douées d'une activité bactériocinogène, tout en déployant les moyens permettant d'optimiser la production et la détection des bactériocines.

III.1 Matériel

Le matériel et la composition des milieux utilisés durant ce travail de thèse sont présentés en annexes I et II respectivement.

III.1.1 Matériel biologique

Les échantillons de lait cru sont obtenus à partir de vaches importées et élevées dans des conditions d'alimentation et d'environnement local de deux fermes expérimentales localisées à Guelma (Algérie) et chez certains propriétaires privés en respectant les conditions d'hygiène concernant le matériel utilisé et le personnel manipulant, Le lait doit être obtenu uniquement à partir d'animaux sains (Doumandji *et al.*, 2008).

Les échantillons sont recueillis dans des flacons stériles de 250 ml et acheminés dans une glacière au laboratoire dans le plus bref délai afin d'éviter toute contamination et déstabilisation de la microflore naturelle de ces derniers (Bekhouche, 2006). Une fois au laboratoire, ils sont mis à coaguler pour favoriser le développement de la flore lactique endogène. Quelques ferments

lactiques commercialisés (yaourts naturels et fromage frais) ont également fait l'objet d'échantillonnage.

L'échantillonnage du lait cru a été menée au cours de la période du Septembre 2012 jusqu'au Juillet 2013. Les Caractéristiques des échantillons sont présentées sur le tableau 2.

Tableau 2: Distribution des échantillons.

Echantillons	Nature	Sources	Date
E1	Rayeb	Ferme Mekhancha	24/12/2012
E2	Rayeb	Ferme Mekhancha	24/12/2012
E3	Rayeb	Ferme Mekhancha	24/12/2012
E4	Rayeb	Ferme Mekhancha	24/12/2012
E5	Rayeb	Ferme Mekhancha	24/12/2012
E6	Rayeb	Ferme Mekhancha	10/01/2012
E7	Rayeb	Ferme Mekhancha	10/01/2013
E8	Rayeb	Ferme Mekhancha	10/01/2013
E9	Rayeb	Ferme Mekhancha	25/01/2013
E10	Rayeb	Ferme Mekhancha	25/01/2013
E11	Yaourt	Activia	06/02/2013
E12	Fromage	Fromage frais	06/02/2013
E13	Yaourt	Acti +	07/02/2013
E14	Yaourt	Activia	07/02/2013
E15	Yaourt	Activia	09/02/2013
E16	Fromage	Fromage frais	11/02/2013
E17	Fromage	Fromage frais	11/02/2013
E18	Yaourt	Acti +	14/02/2013
E19	Yaourt	Ramdy	15/02/2013
E20	Yaourt	Nature Soummam	20/02/2013
E21	Rayeb	Ferme Feizi	21/05/2013
E22	Rayeb	Ferme Feizi	21/05/2013
E23	Rayeb	Ferme Feizi	21/05/2013
E24	Rayeb	Ferme Feizi	21/05/2013
E25	Rayeb	Ferme Feizi	21/05/2013
E26	Lben	H. Nbail	27/06/2013
E27	Lben	H. Nbail	27/06/2013
E28	Lben	El fjouj	27/06/2013

Tableau 3: Distribution des échantillons - Suite.

E29	Lben	Belkhir	27/06/2013
E30	Lben	Badjarah	27/06/2013
E31	Rayeb	Ferme Feizi	15/07/2013
E32	Rayeb	Ferme Feizi	15/07/2013
E33	Rayeb	Ferme Feizi	15/07/2013
E34	Rayeb	Ferme Feizi	15/07/2013
E35	Rayeb	Ferme Feizi	15/07/2013
E36	Rayeb	Ferme Feizi	15/07/2013
E37	Rayeb	Ferme Feizi	02/08/2013
E38	Rayeb	Ferme Feizi	02/08/2013
E39	Rayeb	Ferme Feizi	02/08/2013
E40	Rayeb	Ferme Feizi	02/08/2013
E41	Rayeb	Ferme Feizi	02/08/2013
E42	Rayeb	Ferme Feizi	02/08/2013
E43	Rayeb	Ferme Feizi	02/08/2013
E44	Rayeb	Ferme Feizi	10/08/2013

III.2 Analyse des échantillons

III.2.1 Analyses physicochimiques

Après coagulation du lait, le pH des différents échantillons (Raib, Lben) est déterminé en utilisant un pH mètre de type : Hanna instruments (HI 2211 pH/DRP Meter), Le titrage de l'acidité est effectué sur 10 ml de l'échantillon par une solution d'hydroxyde de sodium 0.1 N à l'aide d'une burette de Mohr à robinet, en présence d'une goutte d'une solution méthanolique de phénophtaléine à 1 % utilisée comme indicateur coloré. L'acidité est exprimée en g d'acide lactique (PM = 90.08 g) par litre d'échantillon selon la formule suivante :

$$\text{Acidité} = 0.9 n \text{ g d'acide lactique / l de lait.}$$

n : étant la chute de la burette (Ouahghiri, 2009).

III.2.2 Analyses microbiologiques

Ces analyses comprennent l'étude de la flore non lactique et l'isolement et l'identification des bactéries lactiques.

Avant d'entreprendre la recherche des différents germes, il convient de préparer une série de dilutions décimales et ceci à partir de chaque échantillon. Le diluant utilisé est l'eau physiologique. 1 ml de la solution mère est ajouté et soigneusement mélangé avec 9 ml du diluant, ainsi la dilution 10^{-1} est réalisée et on procède de la même manière jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-5} (Bariz, 2009). Il est impératif de changer les pipettes entre chaque dilution.

Après plusieurs essais, seules les dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} sont retenues pour ensemercer les milieux de cultures. Ces dilutions permettent d'obtenir des colonies suffisamment séparées.

III.2.2.1 Étude de la flore non lactique

La recherche de cette flore est essentielle, elle permet de prévenir et de garantir la qualité hygiénique du produit. Dans notre travail, cette flore non lactique permet aussi de donner un aperçu sur les différents germes présents avec la flore lactique (Conditions microbiologiques des différents échantillons de lait d'où proviennent les bactéries lactiques).

III.2.2.1.1 Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale

Ce terme est impropre, car la méthode la plus courante consiste à ne dénombrer que la flore aérobie mésophile par comptage des colonies après culture sur plaques de gélose nutritive ensemencées et incubées en aérobiose pendant 3 jours à 30 °C, temps au bout duquel ces germes apparaissent sur boîte de Pétri sous forme de colonies de taille et de forme différentes. Excluant par conséquent certains germes (microflore exigeante, exemple: *Lactobacillus*). Cependant, c'est la méthode la plus courante et la plus pratique pour établir le niveau de contamination globale du lait (Guillet *et al.*, 2002, Bariz, 2009).

➤ Technique

- À partir de dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , porter aseptiquement 1 ml de chaque dilution dans une boîte de Pétri vide.
- Ajouter 15 ml de gélose PCA (Plate Count Agar) fondue et refroidie à 45 ± 1 °C. Pour homogénéiser l'inoculum à la gélose, faire des mouvements circulaires et de va-et-vient. Laisser solidifier, puis incuber à 30 °C pendant 72 h.

➤ Lecture et numération

Le dénombrement des boîtes présentant des microorganismes à la dilution 10^{-3} se fait sur la base de la norme fixée par la législation (Arrêté interministériel du 27 Mai 1998 paru sur le journal officiel de la RADP n° 35/98) (Mouffok, 2006). Nous comptons les différentes colonies sur les boites. On tiendra compte que des boites dont le nombre de colonies est compris entre 30 et 300. Le résultat trouvé est multiplié par l'inverse de la dilution et exprimé ensuite en nombre d'UFC/ml (Guillet *et al.*, 2002, Bariz, 2009).

III.2.2.1.2 Dénombrement des coliformes totaux et fécaux

Les coliformes appartiennent à la famille des Entérobactériaceae. Ils sont des bacilles Gram-, oxydase-, aéro-anaérobies facultatifs et incapable de sporuler (Bariz, 2009, Franklin *et al.*, 1962) leur présence dans le lait est l'indice d'une contamination fécale. Cet indice est mis à profit dans l'examen de la qualité sanitaire des produits. Certaines espèces peuvent être responsables d'infections gastro-intestinales (Food & Agriculture Org, 1995).

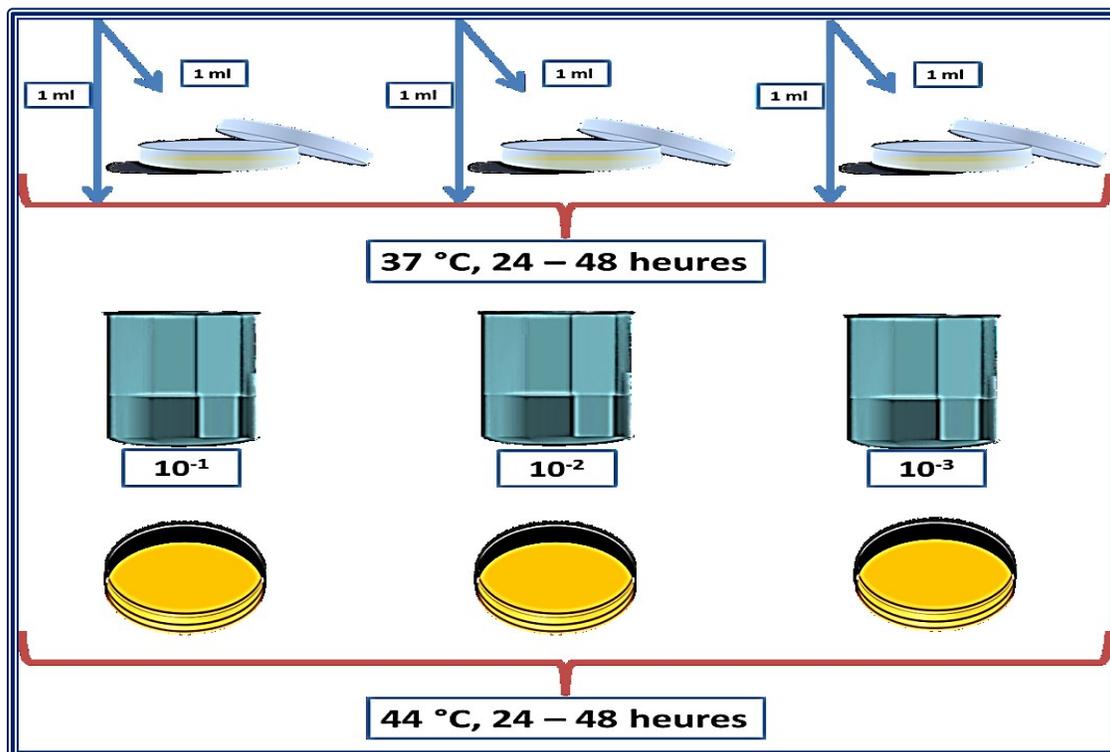


Figure 10: Méthode de dénombrement des coliformes totaux et fécaux

➤ **Technique**

À partir des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} , porter aseptiquement 2 fois 1 ml dans deux boîtes de Pétri vides.

Compléter ensuite chaque boîte avec environ 20 ml de gélose au Désoxycholate à 1 ‰ fondue puis refroidie à $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de 8 pour permettre à l'inoculum de bien se mélanger à la gélose utilisée (Mouffok, 2006).

➤ **Incubation**

Une série de boîtes sera incubée à 37°C , pendant 24 à 48 h et servira à la recherche de Coliformes totaux, l'autre série sera incubée à 44°C pendant 24 à 48 h et servira à la recherche de Coliformes fécaux (Mouffok, 2006).

➤ **Lecture et numération**

Que ce soit à 37°C ou à 44°C , les premières lectures se feront au bout de 24 h et consistent à repérer les petites colonies rouges ayant poussé en masse mais fluorescentes, ce qui signifie que la lecture doit se faire dans une chambre noire et sous une lampe à UV. Les autres colonies non fluorescentes ne sont ni des coliformes totaux ni des coliformes fécaux. La lecture se fait en tenant compte de ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies et de multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution (figure 10) (Mouffok, 2006).

III.2.2.1.3 Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux

Dans les laits et produits laitiers, les Streptocoques du groupe D ou Streptocoques fécaux sont recherchés et dénombrés en milieu liquide par la technique du NPP (Nombre le Plus Probable).

La technique en milieu liquide fait appel à deux tests consécutifs à savoir : Le test de présomption, réservé à la recherche des Streptocoques sur milieu de Rothe.

➤ **Technique**

- Préparer dans un portoir une série de tubes contenant le milieu sélectif de Rothe à raison de trois tubes par dilution.
- À partir des dilutions décimales 10^{-1} à 10^{-3} , porter aseptiquement 1 ml dans chacun des trois tubes correspondant à une dilution donnée (figure 11).
- Bien mélanger le milieu et l'inoculum.
- L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

➤ **Lecture**

Sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien.

➤ Le test de confirmation ou test de Mac Kenzie

Réservé à la confirmation proprement dite sur milieu EVA Litsky, des tubes trouvés positifs au niveau des tests de présomption.

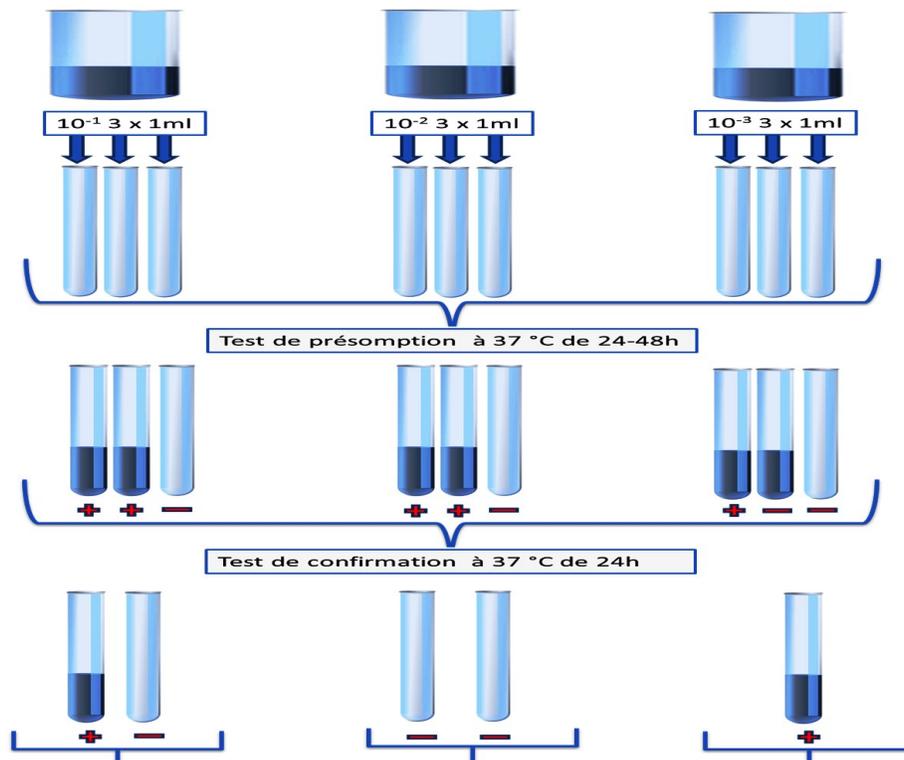


Figure 11: Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux. Adaptation de (Mouffok, 2006).

➤ **Technique**

Les contenus des tubes trouvés positifs lors du test de présomption, sont ensuite repiqués sur milieu EVA Litsky avec une anse de platine et soumis à une incubation à 37 °C pendant 48 heures.

L'apparition d'un trouble homogène et celle d'une pastille blanchâtre ou violette au fond des tubes signent la présence de streptocoques fécaux.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table de Mac Grady en tenant compte uniquement des tubes d'EVA Litsky positifs ou négatifs (figure 11) (Mouffok, 2006).

III.2.2.1.4 Recherche et dénombrement des levures et Moisissures

Les levures et les moisissures sont des champignons microscopiques se présentant respectivement sous forme unicellulaire et filamenteuse, qui peuvent provoquer des accidents de fabrication (altération de la texture, du goût dans le cas du fromage) lorsque leur nombre dans le produit dépasse un certain seuil. Ils se développent à des pH acides et à des températures avoisinant 20°C-25° C (Bariz, 2009).

➤ Technique

A partir des dilutions décimales, 10^{-1} à 10^{-3} , porter aseptiquement 4 gouttes dans une boîte de pétri contenant de la gélose Sabouraud au Chloramphénicol (figure 12) (Mouffok, 2006).

Étaler les gouttes à l'aide d'un râteau stérile, puis incuber à 22°C pendant 5 jours. Dans le souci de ne pas se trouver en face de boîtes envahies soit par les Levures soit par les Moisissures, on doit effectuer des lectures et des dénombrements tous les jours, Levures à part et les Moisissures à part (Mouffok, 2006).

➤ Interprétation des résultats

Étant donné d'une part, qu'on a pris 4 gouttes des dilutions décimales et étant donné d'autre part, qu'on considère que dans 1 ml, il y a 20 gouttes, donc et pour revenir à 1 ml, il faut multiplier le nombre trouvé par 5.

Par ailleurs, étant donné qu'on a travaillé avec des dilutions décimales, on doit multiplier le nombre trouvé par l'inverse de la dilution correspondante, faire ensuite la moyenne arithmétique, puis exprimer le résultat final en ml ou en gr de produit à analyser (Mouffok, 2006).

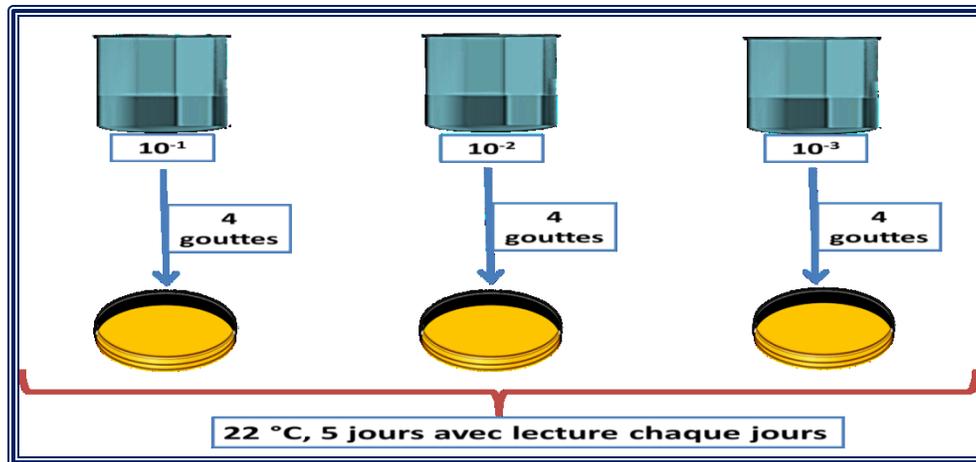


Figure 12: Recherche et dénombrement des Levures et Moisissures. Adaptation de (Mouffok, 2006).

III.2.2.1.5 Recherche de *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques appartiennent à la famille des Micrococcaceae, ce sont des Cocci Gram positif, immobiles, non sporulés et aero-anaérobie facultatifs (Bariz, 2009).

➤ **Technique et lecture**

Le milieu de Chapman après l'avoir fondu est coulé dans des boîtes de Pétri. On étale 0,1 ml de l'inoculum dilué sur toute la surface de la boîte. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 à 48 heures (Ghazi *et al.*, 2011). Les *Staphylococcus aureus* donnent des colonies jaunâtres et provoquent le virage du milieu en jaune (Guiraud, 2003).

➤ **Tests de confirmation**

Réaliser une coloration de Gram et le test de la catalase sur les colonies isolées sur gélose Chapman.

- Réaliser également le test de la coagulation du plasma du lapin : les colonies bien caractéristiques sont prélevées et enrichies dans le bouillon BHIB. Après 18h d'incubation à 37°C, on mélange 0,5ml du plasma du lapin avec 0,5ml de la culture sur BHIB puis on incube les tubes à 37°C. Au cours de l'incubation, des observations sont effectuées chaque 2h (Bariz, 2009).

➤ **Lecture**

La confirmation de la présence de *Staphylococcus aureus* est obtenue par les résultats suivants: Cocci Gram positif, en chaîne et grappe de raisin, catalase positive et coagulase positive (Bariz, 2009, Guiraud, 2003).

III.2.2.1.6 Recherche de spores d'Anaérobies Sulfito-Réducteurs

Au moment de l'emploi faire fondre un flacon de gélose Viande foie, le refroidir dans un bain d'eau à 45°C puis ajouter une ampoule d'Alun de Fer et une ampoule de sulfite de sodium, mélanger soigneusement et aseptiquement. Le milieu est ainsi prêt à l'emploi, mais il faut le maintenir dans une étuve à 45°C jusqu'au moment de l'utilisation (Mouffok, 2006).

Les tubes contenant les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} seront soumis d'abord à un chauffage à 80°C pendant 8 à 10 minutes puis à un refroidissement immédiat sous l'eau de robinet, dans le but d'éliminer les formes végétatives et de garder uniquement les formes sporulées (Mouffok, 2006).

À partir de ces dilutions, porter aseptiquement 1 ml de chaque dilution en double dans deux tubes à vis stériles de 16 mm de diamètre, puis ajouter environ 15 ml de gélose Viande Foie prête à l'emploi, dans chaque tube (figure 13), Laisser solidifier sur paillasse pendant 30 minutes. Ces tubes seront ainsi incubés à 37°C pendant 16, 24 ou au plus tard 48 heures (Mouffok, 2006).

La première lecture doit se faire impérativement à 16 heures car d'une part les colonies de Clostridium Sulfito-réducteurs sont envahissantes auquel cas on se trouverait en face d'un tube complètement noir rendant alors l'interprétation difficile voire impossible et l'analyse est à refaire.

D'autre part, il faut absolument repérer toute colonie noire ayant poussé en masse et d'un diamètre supérieur à 0,5 mm.

Dans le cas où il n'y a pas de colonies caractéristiques ré-incuber les tubes et effectuer une deuxième lecture au bout de 24 heures voire 48 heures (Mouffok, 2006).

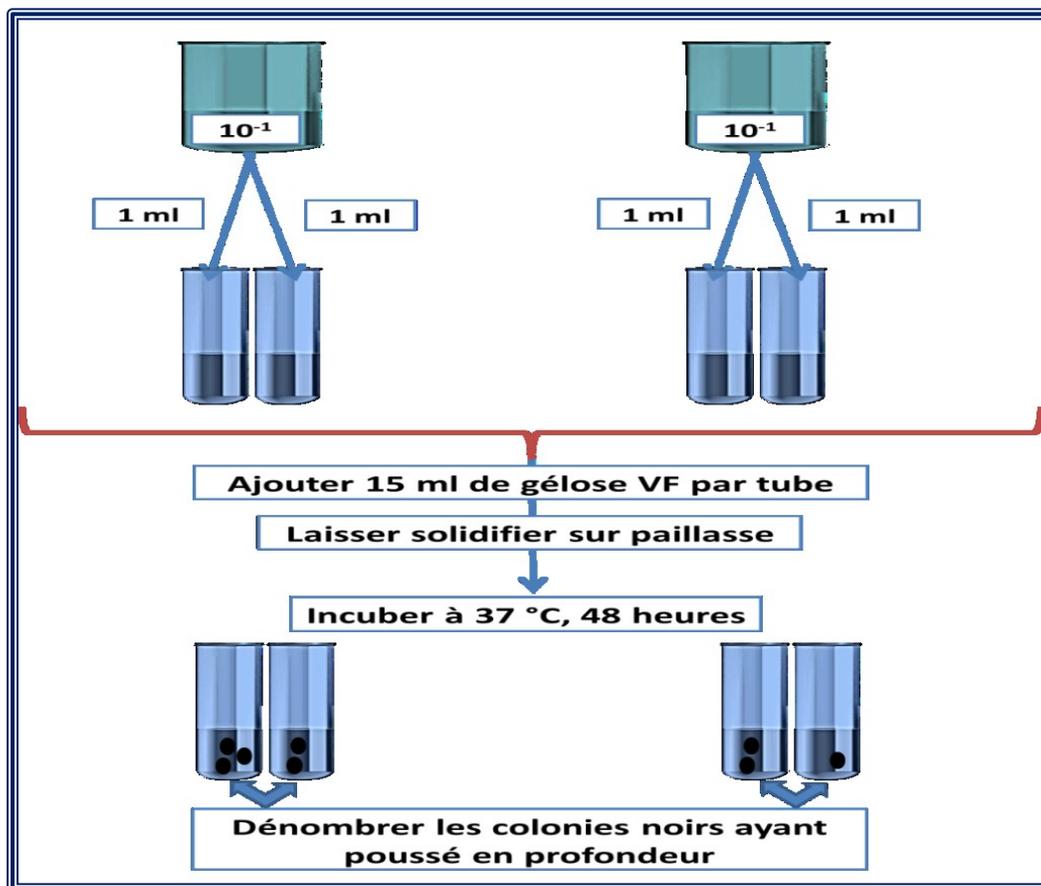


Figure 13 : Recherche et dénombrement de spores d'Anaérobies Sulfito-Réducteurs.

III.2.2.1.7 Recherche des Salmonelles

Ce sont des bactéries Gram (-), anaérobies facultatifs, mobiles grâce à des cils péritriches, elles sont des nitrates (+), fermentent le glucose avec production de gaz, H₂S +, lactose (-), se développent à une température entre 5 et 47°C ; pH optimal est de 6.5 ; se développent aussi à une activité d'eau entre 0.945 et 0.999 (Navoun, 2005).

Cette recherche comporte les étapes suivantes :

➤ **Le pré-enrichissement**

C'est une phase non sélective qui utilise un milieu riche dans lequel l'échantillon est dilué au (1/10) et pour laquelle l'incubation dure une vingtaine d'heure à 35°C ou 37°C. Le Pré-enrichissement permet aux bactéries sublétales de récupérer l'ensemble de leurs potentialités au terme de leur incubation (Navoun, 2005).

Les milieux utilisés sont des milieux liquides, le plus souvent on utilise l'eau peptonée tamponnée ou le bouillon lactosé. Pour les produits laitiers on peut utiliser la solution de Ringer ou la solution tampon phosphate (Navoun, 2005).

➤ **L'enrichissement**

L'enrichissement vise à minimiser la croissance des autres bactéries associées au prélèvement et de poursuivre la multiplication sélective des Salmonella (Navoun, 2005).

➤ **Technique**

Ensemencer un tube contenant 10 ml de bouillon d'enrichissement (SFB sélénite F Broth), avec 1ml du milieu du pré-enrichissement, bien mélanger, incuber à 37°C pendant 18 à 24 h (Bariz, 2009).

➤ **Isolement et identification**

Prélever avec l'anse de platine une goutte du milieu d'enrichissement qu'on ensemence par la technique de stries d'épuisement sur milieu sélectif (gélose Hektoen) puis incuber à 37°C/24h. Les salmonelles se développent sous forme de colonies vertes ou bleutées avec ou sans centre noir .

L'identification des souches de salmonelles fait appel à une sélection biochimiques des isolats analysés, en fonction de réactions biochimiques déterminantes et à une identification

sérologique. Cette identification est rendue possible, après avoir vérifié que les souches en question sont réellement des Entérobactéries.

➤ **Identification de la famille des Entérobactéries**

Un repiquage des colonies suspectes est réalisé sur de la gélose sélective (gélose Héktoen), dans le but d'obtenir des souches pures. Une coloration de Gram et une observation de l'état frais sont par la suite effectuées en vue d'obtenir les caractères majeurs des Entérobactéries.

L'état frais est une étape qui permet de mettre en évidence le type de mobilité et la forme des bactéries.

Pour cela, nous avons ensemencé un bouillon (bouillon Müller Hinton) puis incubé pendant 24 heures à 37°C.

Une goutte de ce bouillon est déposée à partir d'une anse de platine, sur une lame porte-objet et recouverte par une lamelle couvre-objet et l'observation est faite au microscope optique avec les objectifs (10 puis 40).

Les souches de Salmonella sont mobiles à ciliatures de type péritriche.

➤ **Identification du genre Salmonella**

La souche du genre Salmonella peut être confondue avec certaines Entérobactéries, de par la similitude de certains de leurs caractères biochimiques. Ce sont Citrobacter, Edwarsiella tarda, Proteus vulgaris et mirabilis. Pour éliminer donc ces souches proches des salmonelles des tests de présomption sont effectuées, dans le but d'identifier les caractères de genre des Salmonella sp.

Pour effectuer cette identification du genre nous avons ensemencé une mini galerie de 4 milieux d'identification, à savoir :

➤ **Le milieu urée-indole (orange)**

Nous avons introduit environ 1 ml de ce milieu dans un tube à hémolyse stérile. Par la suite nous l'avons ensemencé avec une souche pure, prélevée sur gélose Hektoen. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, une lecture est faite. La couleur du milieu reste inchangé pour les souches suspectes, et sont dites uréase négative (non productrices d'uréase). Dans le cas contraire, il vire au rose.

Pour la mise en évidence de la production d'indole, nous avons ajouté quelque goutte du réactif de Kovacs dans les tubes du milieu urée-indole. La dégradation du tryptophane est marquée par

l'apparition d'un anneau jaune, pour les salmonelles qui sont dites indole négatif. Dans le cas contraire, nous avons un anneau rouge.

➤ **Le milieu Kligler-Hajna**

Ensemencer la gélose à partir du milieu urée-indole, par piqûre centrale dans Le culot et par stries d'épuisement au niveau de la pente, avec une suspension de bactérie suspecte. Il est important de ne pas oublier de dévisser partiellement la capsule afin de permettre les échanges gazeux. Les tubes sont mis à incuber à 37°C pendant 24 heures.

➤ **Le milieu au glycérol (vert)**

Ensemencer ce milieu à partir du milieu kligler-Hajna. Après 24 heures d'incubation à 37°C, la coloration verte reste inchangée pour les souches de Salmonella qui sont dites glycérol négatif.

➤ **Le milieu «LDC» à la lysine de Taylor (violet)**

Ensemencer ce milieu, en anaérobiose dans des tubes à hémolyse, à partir des mêmes souches pures suspectées; et incuber à 37°C à l'étuve pendant 24 heures.

La coloration reste inchangée pour les souches de Salmonella, et sont dites Lysine décarboxylase positive (LDC+). En effet la bactérie fermente le glucose dans un premier temps, ce qui acidifie le milieu (virage du violet au jaune). Dans un second temps, la salmonelle qui possède une décarboxylase se met en action ; et les métabolites formés à partir des aminoacides alcalisent le milieu, qui fait virer l'indicateur de pH au violet (formation de la cadavérine à partir de la lysine).

Les résultats des caractères biochimiques vont nous permettre de confirmer si l'Entérobactérie analysée est une salmonelle ou pas

III.2.2.2 Étude de la flore lactique

III.2.2.2.1 Dénombrement, Isolement et Identification des bactéries lactiques

0.1 ml de chaque échantillon a été étalé sur les milieux solides MRS (PRONADIZA) et M17 (SIGMA ALDRICH). Après incubation, les colonies ont été comptées pour chaque dilution pour déterminer le nombre d'UFC/ml en utilisant la formule suivante (Ouahghiri, 2009, Zadi-Karam *et al.*, 2006).

$$UFC/ml = \text{nombre de colonies} \cdot \frac{1}{V_e} \cdot \frac{1}{D} \quad \text{Équation III-1}$$

V_e étant le volume d'ensemencement et D étant la dilution prise en compte.

III.2.2.2.1.1 Isolement et purification sur milieux solides

Les milieux et conditions de culture sont les suivants :

- Incubation à 37°C pendant 24h pour l'isolement des streptocoques lactiques (*Lactococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus*) sur milieu M17 (Guiraud, 2003, Bekhouche, 2006).
- Incubation à 30 °C et à 45 °C pendant 72h sur milieu MRS, pH=5,5 pour l'isolement des Lactobacilles mésophiles et thermophiles respectivement (Corrieu *et al.*, 2008, Doumandji *et al.*, 2008, Kerfouf *et al.*, 2010).
- Pour chaque échantillon, une observation macroscopique des colonies est effectuée : forme, aspect, contour, surface et couleur sur les milieux M17 et MRS dans le but de différencier les colonies suspectes (Tabak *et al.*, 2011).

La purification est effectuée par quatre repiquages successifs d'étalement en milieux MRS et M17 solides (Labioui *et al.*, 2005).

III.2.2.2.1.2 Caractérisation des isolats lactiques

Les bactéries isolées et purifiées étaient caractérisées à l'aide de méthodes classiques de microbiologie.

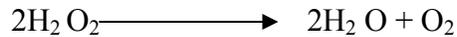
➤ Coloration de Gram

Ce type de coloration permet de séparer les bactéries en deux grandes catégories : Les bactéries Gram (+) et les bactéries Gram (-), celles qui retiennent le violet de gentiane après lavage sont dites Gram (+) et celles qui sont décolorées et prennent ensuite la coloration d'un second colorant, sont dites Gram (-). Cette méthode est basée sur la différence de la paroi chez les deux grands groupes des bactéries, forte proportion de lipides chez les Gram (-) et faible proportion chez les Gram (+).

Les cellules sont examinées au microscope optique pour différencier leur morphologie, leur disposition et leur type de Gram.

➤ Test de la catalase

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

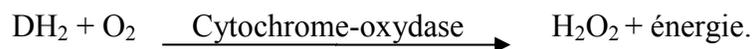


Chez les bacilles, elle permet de distinguer les bactéries sporulées, aérobies et catalase positive appartenant au genre *Bacillus* et les bacilles asporulées catalase négative du genre *Lactobacillus*. Chez les coques, elle permet de différencier les coques lactiques et les coques non lactiques. Les coques lactiques (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*) sont catalase négative alors que les coques non lactiques (*Staphylococcus* et *Micrococcus*) sont catalase positive (Bekhouché, 2006). Pour mettre en évidence cette enzyme, une partie de la colonie suspecte est diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase (Tabak *et al.*, 2011).

Il est conseillé de ne pas prélever la culture sur une gélose au sang car le sang possède une activité catalasique. Aussi, la présence de sang pourrait provoquer une réaction faussement positive.

➤ **Recherche d'une cytochrome oxydase**

La cytochrome oxydase est le dernier transporteur d'électron de 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 paraphinylène 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 est alors étalée sur ce disque. La présence d'oxydase se manifeste alors par le développement d'une coloration violette (Mechai, 2009).

➤ **Recherche d'une nitrate réductase**

Les bactéries possédant une nitrate-réductase peuvent réduire les nitrates en nitrites, d'autres peuvent les réduire jusqu'au stade azote gazeux, il s'agit de la nitrification.

La réduction des nitrates en nitrites est recherchée sur une culture en bouillon nitraté incubé à 37°C pendant 24 heures, la mise en évidence de l'apparition des nitrites se fait par addition de quelques gouttes de chacun des deux réactifs : Nitrate réductase I et nitrate réductase II.

Si la réaction est négative, deux éventualités sont possibles ; ou bien la réduction a dépassé le stade nitrite et s'est poursuivie jusqu'au stade NH₃ ou N₂ ou bien les nitrates non réduits sont encore présents (bactérie nitrate-réductase négative). On ajoute à la culture un peu de poudre de Zn, on mélange et on laisse reposer. Si les nitrates n'ont pas été utilisés, ils seront réduits chimiquement par la poudre de Zn et la réaction colorée des nitrites apparaît rouge. Par contre, si le milieu reste incolore les nitrates sont complètement réduits au-delà du stade nitrite et la présence de bulles gazeuses dans la culture témoigne de la réduction des nitrates en N₂ gazeux (Mechai, 2009).

➤ Étude de la mobilité

Les bouillons M17 et MRS additionnés de 4 g.L⁻¹ de gélose permettent d'évaluer la mobilité des bactéries après ensemencement par piqûre Centrale. Un développement après incubation dans toute la largeur du tube traduit une mobilité (Thi Nguyet Thu, 2008), Les bactéries immobiles se développent uniquement le long de la piqûre centrale .

➤ Test de production d'indole

Le tryptophane est dégradé en pyruvate, ammonium et indole par une tryptophanase (Yaakoubi *et al.*, 2006). Le test est réalisé sur le bouillon tryptone (Bourgeois *et al.*, 1996).

➤ Test d'homo-hétérofermentation

L'hétérofermentation est la capacité des bactéries à produire des molécules différentes du lactate telles que le CO₂, l'acétate, l'éthanol... à partir du sucre. Pour distinguer les bactéries lactiques homofermentaires des bactéries lactiques hétérofermentaires, des tests d'hétérofermentation sont réalisés. Ils consistent en le repiquage d'une colonie donnée dans des tubes de bouillon MRS et M17 contenant au préalable une cloche de Durham. Après ensemencement de la colonie, les bouillons sont recouverts de paraffine et l'ensemble est mis à incuber à 30°C. Les tubes sont observés pendant 3 à 5 jours en fonction de l'aspect du milieu (trouble), le décollement de la paraffine, et le dégagement gazeux dans la cloche (Coppet *et al.*, 2006).

➤ **Température de croissance**

Ce test est très important car il permet de différencier les bactéries mésophiles des bactéries thermophiles. D'autre part, ce test permet de distinguer entre les deux sous genres homofermentaires du genre *Lactobacillus* (De roissart, 1994). Les tubes à essai contenant les milieux MRS et M17 sont ensemencés à l'aide d'une anse de platine bouclée par les bactéries à tester. L'incubation est réalisée à des températures et des durées différentes.

- À 10 °C et 45 °C pour les coques lactiques sur milieu liquide (Bouillon M17). Le tube à 45 °C est examiné au bout de 24 à 48 heures et celui à 10 °C après 7 à 10 jours (Bourgeois et al., 1996).
- À 15 °C et 45 °C pour le genre *Lactobacillus*, les cultures sont réalisées sur le bouillon MRS pendant 24 à 48 heures, pour le tube à 45 °C et durant 1 à 2 semaines pour le tube à 10 °C.
- À 37 °C et 45 °C, pour le genre *Pediococcus* et seulement à 37 °C pour les *Leuconostocs* sur le milieu MRS (Bekhouché, 2006, Mechai, 2009).

➤ **Croissance sur bouillon hypersalé**

Ce test permet de voir l'aptitude des souches à se développer en présence de chlorure de sodium (NaCl). Il nous donne des renseignements précieux pour l'identification. Cette aptitude est vérifiée sur bouillon M17 à 4 % et 6,5% de NaCl pour les genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*. L'incubation est réalisée à 30 °C pendant 24 à 72 h. La présence d'un trouble indique la croissance bactérienne (Bekhouché, 2006, Mechai, 2009, Bourgeois *et al.*, 1996, Zadi-Karam *et al.*, 2005).

➤ **Croissance à différentes valeurs de pH**

Ce test permet d'apprécier l'aptitude des bactéries isolées à croître à différentes valeurs de pH

- A pH 9,6 pour les genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* sur bouillon M17.
- A pH=3,9 pour le genre *Lactobacillus* sur bouillon MRS (Mechai, 2009).

Le pH est ajusté par l'addition des solutions de NaOH et d'acide lactique (1N). L'incubation se fait à 30°C pendant 48 heures (Bekhouché, 2006, Bourgeois *et al.*, 1996).

➤ **La thermorésistance**

- à 60 °C durant 30 min pour *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* sur bouillon Naylor et Sharpe et à 60 °C pendant 90 minutes pour *Lactobacillus* sur bouillon MRS,

L'incubation est réalisée à 30 °C durant une période de 24 à 48 heures (Bekhouche, 2006, Bourgeois *et al.*, 1996).

➤ **Test d'acidification du lait**

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée chez les bactéries lactiques. Pour l'apprécier, les bactéries à tester sont inoculées dans des flacons contenant du lait écrémé stérile reconstitué à 10 % et incubés à 37 °C. Une fois le lait est coagulé, le pH est mesuré immédiatement (Branger *et al.*, 2007).

➤ **Test de production d'acétoïne**

La réaction de Voges-Proskauer est caractéristique de certaines bactéries. Elle consiste à révéler une étape intermédiaire de la transformation de l'acide pyruvique qui consiste en la production d'acetyl-méthyl-carbinol (acétoïne) qui intervient dans l'aromatisation. Le test concerne les souches appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*. La mise en évidence de l'acétoïne est obtenue après une culture de 7 h à 30 °C sur le bouillon lactosé citraté 1 mL de culture est additionné de 0,5 mL de réactif à l' α naphthol et 1 mL de NaOH à 16 % (Bekhouche, 2006).

Après agitation durant 10 min, une coloration rose indique la présence de l'acétoïne. Cette substance se transforme en diacétyl sous l'action de la soude et se combine avec l' α naphthol en complexe rouge.

➤ **Croissance sur Lait de Sherman**

Cette épreuve a pour but d'étudier l'aptitude des bactéries lactiques à pousser en présence de 0,1% et 0,3% du bleu de méthylène ainsi que leur capacité à le réduire. Seules certaines espèces appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus* sont capables de se développer (Bekhouche, 2006).

Le milieu utilisé est le lait écrémé contenu dans des tubes à essais de 9 ml. Après sa stérilisation par tyndallisation, 1mL des solutions de bleu de méthylène à 1 % et a 3% sont ajoutés dans chaque tube. Le milieu estensemencé avec les bactéries à tester et incubé à 30 °C durant 48 h.

La croissance bactérienne se traduit par une coagulation du lait, cependant la réduction du colorant se traduit par sa décoloration (Bourgeois *et al.*, 1991, Leveau *et al.*, 1993, Guiraud, 2003). Ce test est surtout intéressant pour différencier les streptocoques des *Lactococcus*. Ainsi,

Lactococcus lactis est capable de pousser à 0,3 % du bleu de méthylène. Les streptocoques fécaux se développent en présence de 0,1 % du bleu de méthylène. Quant à *Streptococcus thermophilus*, il est très sensible au colorant.

➤ Recherche de la Citratase

Cette activité enzymatique est recherchée chez les souches des genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Enterococcus*. Le milieu utilisé est la gélose semi solide au lait citraté contenue dans des tubes à essais. L'ensemencement est réalisé par piqûre centrale et l'incubation est faite à 30 °C pendant 3 à 5 jours (Bekhouché, 2006, Mechai, 2009).

La décomposition du citrate se manifeste par la production de gaz dans la masse du milieu ce qui a pour effet l'apparition de fissures au niveau de la gélose (Bourgeois *et al.*, 1991, Bariz, 2009).

➤ Explication

L'utilisation du citrate conduit à la production de CO₂ qui est piégé dans la gélose semi-solide sous bouchon de gélose. Le CO₂, normalement très soluble dans l'eau à pH voisin de la neutralité, l'est peu aux pH acides créés par les bactéries lactiques qui acidifient le milieu par la production d'acide lactique.

Le citrate est transporté par une citrate perméase puis coupé en acétate et oxaloacétate. L'oxaloacétate est converti en pyruvate avec libération de CO₂. De plus si le pyruvate est transformé en acétoïne, molécule aromatisante, deux molécules de CO₂ sont à nouveau libérées.

➤ Hydrolyse de la gélatine

L'hydrolyse de la gélatine donne un aperçu sur le système protéolytique des souches, sachant que la gélatine est une macromolécule protéique qui, à des températures inférieures à 23°C se prend en masse et devient solide, alors qu'à des températures supérieures à 25°C elle se liquéfie.

La technique consiste à ensemencer le milieu à la gélatine dans la masse par chaque souche test, incubé à 30°C pendant 7 jours puis placer les tubes au réfrigérateur aux environs 10°C pendant quelques heures.

A la sortie du réfrigérateur si la liquéfaction persiste cela traduit la présence d'une gélatinase donc l'hydrolyse de la gélatine (Guiraud, 2003).

III.2.2.2.1.3 Conservation des isolats

La conservation des souches à moyen terme est réalisée sur milieu à base de glycérol (glycérol stock). Une culture de la souche à conserver est effectuée en milieu liquide MRS/ M17.

Après croissance des bactéries jusqu'en phase exponentielle, un volume de glycérol stérile est ajouté à trois volumes de la culture, la suspension bactérienne à 25 % de glycérol est ensuite répartie dans des éppendorffs (à raison de 1ml) puis congelée à -20 °C (Nancib Djidel, 2007).

III.2.2.2.1.4 Identification des isolats lactiques

L'identification des isolats lactiques est réalisée par deux méthodes.

III.2.2.2.1.4.1 Caractérisation 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 (bioMerieux, Marcy l'étoile, France).

L'ensemencement et la lecture de la galerie ont été réalisés selon les instructions du fabricant. Ils se font de la façon suivante :

- Cultiver la souche pure sur milieu M17 gélosé 24h à 37°C.
- Ouvrir une ampoule de Suspension medium (2 ml), prélever toutes les colonies de la culture, à l'aide d'un écouvillon, 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 d'API 50 CHL Medium et inoculer avec deux fois le nombre de gouttes trouvées (2n), homogénéisé.
- Répartir API 50 CHL ainsi inoculé dans les tubules, et recouvrir avec de l'huile de paraffine stérile.
- Incuber à 37°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 de 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 est lu grâce à un logiciel d'identification APIweb version 1.2.1. (bioMérieux, Marcy l'étoile, France) (Ouadghiri, 2009, Koort et al., 2004, Ammor, 2004).

III.2.2.2.1.4.2 La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Microflex)

Le MALDI-TOF est un spectrophotomètre de masse, couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI= Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (Tof = Time-Of-Flight mass spectrometry) (Seng *et al.*, 2009).

La principale fonction de la spectrométrie de masse MALDI TOF (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) en microbiologie, est l'identification des micro-organismes par l'analyse de leurs protéines totales, elle permet de réaliser une identification en quelques minutes et avec une haute précision, ces atouts majeurs sont la fiabilité des résultats, la rapidité et le faible coût de l'analyse (Seng *et al.*, 2009).

Les isolats identifiées par api 50 CH et conservés à -20 °C sont revivifiés sur gélose Columbia au sang de mouton à 5 % (Biomérieux), dans des conditions aérobies pendant 24 h à 37 ° C.

Le protocole appliqué pour identifier les isolats lactiques est le suivant :

➤ **Nettoyage de la plaque-cible**

Consiste à rincer la plaque avec de l'eau chaude, et à verser de l'éthanol à 70 % que l'on frotte avec du papier. Ensuite, on plonge la plaque dans l'éthanol pendant 15 min, puis on frotte avec 500 µl de TFA (Acide TriFluoroacétique) à 80% et enfin, on la rince avec de l'eau utilisée pour l'HPLC et on la laisse sécher à l'air libre.

➤ **Préparation de la matrice**

La matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie des faisceaux laser incidents.

Le protocole de préparation de la matrice est le suivant :

Sous une hotte chimique et dans un tube à eppendorf, on dispose les éléments suivants en respectant la procédure suivante :

- 2 spatules d'alpha-cyano-4hydrocinnamic acide
- 500 µl d'acetonitril HPLC
- 250 µl de TFA à 10 % (acide trifluorocétique)
- 250 µl d'eau HPLC
- Soniquer pendant 10 minutes dans un bain à ultrasons
- Centrifuger 5 minutes à 13000 RPM
- Transférer le surnageant dans un tube à eppendorf propre

Ainsi la matrice est prête à être utilisée.

➤ Préparation des échantillons pour l'analyse spectrométrique

Sous une PSM (poste de protection microbiologique), on prélève les bactéries à identifier à partir d'une culture bactérienne de 24 heures, pour les déposer sous forme d'un fin frottis d'environ 5 mm sur les spots de la plaque métallique servant de cible aux tris de laser. Pour chaque bactérie, on fait 4 spots pour réduire le risque d'erreur.

- On dépose 2 µl de matrice sur chaque spot.
- On laisse sécher sous la hotte pendant 15 minutes pour permettre sa co-cristallisation avec l'échantillon bactérien.

➤ Insertion de la cible et lancement du Maldi-Tof

- La cible est ensuite introduite dans le spectromètre (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) et exposée sous vide aux tris du laser.
- Remplir la fiche du logiciel Maldi Biotyper Automation control.
- Lancer le spectromètre de Masse : Microflex.

➤ Interprétation des résultats de l'analyse spectrométrique

MALDI TOF identifie les micro-organismes en utilisant le logiciel Biotyper 2.0. La spectrométrie de masse permet de mesurer une unique empreinte moléculaire d'un organisme, plus précisément, le logiciel Biotyper MALDI mesure les protéines très abondantes qui se

trouvent dans tous les micro-organismes. Les motifs caractéristiques de ces protéines très abondantes sont utilisés pour identifier d'une manière fiable et précise un micro-organisme particulier, en faisant correspondre le model respectif a une base de donnée étendue, ouverte, pour déterminer l'identité du micro-organisme jusqu'au niveau d'espèce. L'identification est correcte lorsque la valeur du score identifié par le MALDI TOF est ≥ 1.9 (Seng *et al.*, 2009).

III.2.2.2.1.5 Criblage des bactéries lactiques à activité antimicrobienne

Les bactéries isolées sont testées pour leur activité antagoniste vis à vis des souches indicatrices par la méthode des puits de Tagg et McGiven (1971) avec utilisation d'une double couche constitué de deux géloses différentes (MRS et BHIB). Un bouillon MRS est inoculé par la bactérie à tester à partir d'une culture de 18h à 37 °C (fin de la phase exponentielle). La culture obtenue est centrifugée à 2700 g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant est ajustée à pH 6 avec de la soude 1M, puis filtré (filtre d'ester mixte de cellulose, 0.45 μm , coster) (Monteagudo-Mera *et al.*, 2012).

Le filtrat préparé constitue l'extrait de culture. Parallèlement, des boites de pétrie de gélose MRS (20ml) sont préparées, après solidification, des puits de 5mm de diamètre sont creusés à l'aide d'un tube stérile. Les boites sont ensuite séchées pendant 10 minutes à 55°C. L'extrait de culture est ajouté à chaque puit après adition d'une fine couche de gélose MRS. Puis incubées pendant 24h à 37 °C. Après incubation, ces boites sont recouvertes de 10 ml de gélose BHIBensemencé de *L.monoytogenes* ATCC 7644 et incubées une autre fois à 37°C pendant 24h puis examinées pour la présence des zones d'inhibition (Mechai, 2009, Moraes *et al.*, 2010).

III.2.2.2.1.6 Identification moléculaire par séquençage du gène de l'ARNr16S

Dans 30 μl de TE (tris-EDTA) prélever avec un embout stérile une colonie de la bactérie à identifier afin de créer un environnement trouble.

➤ Préparation du mix

- 8 μl de buffer
- 0.8 μl dNTP
- 0.4 μl ADN polymérase *Taq*

- 25.8 μ L H₂O
- 2 μ l amorce FD1
- 2 μ l Amorce Rp2
- Répartition du mix

Elle se fait dans une burette

- 19.5 μ l mix
- 0.5 μ l d'ADN

Les amorces utilisées dans l'amplification et le séquençage du gene d'ARN 16 S figurent au tableau 4.

Tableau 4: Les amorces utilisées dans l'amplification et le séquençage du gène de l'ARNr 16S (Khelili *et al.*, 2014).

Amorce	Utilisation	Localisation	Séquence oligonucleotidique 3' → 5'
Fd1	A	16S rRNA gene, forward	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'
Rp2	A	16S rRNA gene, reverse	5'AAGGAGGTGATCCAGCC3'
357 F	S	16S rRNA gene, forward	5'TACGGGAGGCAGCAG3'
357 R	S	16S rRNA gene, reverse	5'CTGCTGCCTCCCGTA3'
536 F	S	16S rRNA gene, forward	5'CAGCAGCCGCGGTAATAC3'
536 R	S	16S rRNA gene, reverse	5'GTATTACCGCGGCTGCTG3'
800 F	S	16S rRNA gene, forward	5'ATTAGATACCCTGGTAG3'
800R	S	16S rRNA gene, reverse	5'CTACCAGGGTATCTAAT3'
1050 F	S	16S rRNA gene, forward	5'TGTCGTCAGCTCGTG3'
1050 R	S	16S rRNA gene, reverse	5'CACGAGCTGACGACA3'

Avec : A : amplification ; S : séquençage.

➤ **Réalisation de la PCR**

- Programme PCR
 - 98 °C pendant 30s → 1 cycle
 - 98 °C pendant 10s
 - 64 °C pendant 30s
 - 72 °C pendant 30s
 - 72 °C pendant 10min → 1 cycle
- } 35 cycles
- } 37 cycles

Elle dure 2 heures

➤ **Électrophorèse sur gel d'agarose**

Pour vérifier la présence d'une bonne amplification du gène cible, les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1.5 % dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE (Tris, Borate, EDTA) à 0.5%. La migration se fait pendant 30 min sous un voltage de 135V.

➤ **Protocole de préparation du gel d'agarose**

- Dans une bouteille ou flacon en verre stérile, mélanger 6 g de poudre d'agarose avec 400 ml du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5x.
- Faire fondre le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement transparent.
- Laisser refroidir.
- Ajouter la solution du bromure d'éthidium TBE (3 fois 31.5 µl pour 50 ml) et mélanger bien.
- Couler le gel dans le support du gel après avoir mis le peigne.
- Laisser refroidir jusqu'à solidification du gel.

➤ **Électrophores des produits de PCR**

- Retirer les peignes après polymérisation du gel.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Remplir la cuve d'électrophorèse par le tampon TBE 0.5x (le gel doit être totalement émergé).

- Déposer 4µl du DNA marqueur de poids moléculaire [100 Base-paire Ladder (Gibco-BRL, 15 628-019)] dans le premier puits.
- Mélanger 4µl du produit amplifié (ADN) avec une goutte du Blue Juice.
- Déposé le produit amplifié avec un témoin négatif et un témoin positif.
- Fermer le couvercle de la cuve. Brancher la cuve au générateur. Mettre l'alimentation sous tension à 135V et régler la durée de migration (environ 30 min).
- Une fois la migration est finie, Placer le gel dans le système d'imagerie à UV pour la visualisation des bandes.

➤ **Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV**

Le gel d'agarose est ensuite exposé sous rayons ultra-violet pour visualiser les bandes d'ADN. La présence de la bande qui correspond au fragment amplifié a été comparée avec le marqueur de poids moléculaire (100 paires de base) en utilisant le témoin.

➤ **Séquençage**

Le séquençage a été réalisé selon la méthode de Sanger modifié (Sanger *et al.*, 1977), en utilisant le Kit BigDye Terminator v3.1 Matrix standard Kit (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) et le séquenceur Automate ABI 3730 (Applied Biosystems), selon les recommandations du constructeur.

➤ **Purification**

Après électrophorèse, on vérifie sur le système d'imagerie à UV, la présence des bandes d'ADN.

On ajoute au produit 100µl d'eau ultra pure, puis on transfère le tout dans une plaque à filtre pour faire la première purification. Ensuite on dépose cette plaque à filtre sur une pompe sous vide pendant 20 min sur (filtration sous vide). Enfin, on ajoute 50 µl d'eau ultra pure et agiter pendant 20 min sur un agitateur.

Le produit est purifié et prêt pour la PCR Big Dye.

➤ PCR Big Dye

Cette PCR consiste à amplifier le Forward et le reverse séparément pour les séquencer par la suite. Le protocole utilisé pour effectuer une PCR Big Dye est le suivant :

Dans une plaque de thermocycleur Bio-rad, on dépose 20 μ l du mélange réactionnel (décrit sur le tableau 5) dans chaque puit.

Tableau 5: Composition du mélange réactionnel pour la PCR Big Dye

Composition pour Forward	Composition pour Reverse	Quantité PCR Big Dye
Buffer	Buffer	3 μ l
Mix Big Dye	Mix Big Dye	2 μ l
Amorce F	Amorce R	1 μ l
ADN à amplifier	ADN à amplifier	4 μ l
H ₂ O UP	H ₂ O UP	10 μ l
Volume Total	Volume Total	20 μ l

Pour chaque amorce, on fait 2 mélanges réactionnels séparés, un pour le Forward et l'autre pour le reverse, exécuté selon le programme porté sur le tableau 5.

Tableau 6: Programme d'amplification de la PCR Big Dye

Température	96 °C	96 °C	50 °C	60 °C	4 °C
Temps	2 min	10 sec	5 secs	1 min 5 sec	∞

➤ Purification par Séphadex

Dans une plaque à filtre spécifique à la purification par Sephadex G 50 de la marque sigma, on met la poudre de sephadex dans les puits de la plaque auxquels on ajoute 300 μ l d'eau ultra pure et laisser reposer 2 à 3 heures. Après avoir mis la plaque à filtre au-dessous d'une plaque contenant des puits, on réalise une centrifugation à 12000 rpm pendant 10 min à 10 °C pour récupérer l'excédent d'eau dans les puits qui sera jeté.

On met par la suite, les produits PCR Big Dye dans la plaque à filtre qui sera placée sur une deuxième plaque à puits pour collecter après centrifugation (à 12000 rpm pendant 10 min à 10 °C) les produits PCR purifiés. Cette plaque est ensuite recouverte par un tapis de protection.

Le produit récupéré est alors prêt à être séquençé.

➤ Séquençage

Sur la machine du séquenceur Automate ABI 3730, remplir les fiches pour séquençage sur le logiciel. Mettre la plaque pour le séquençage sur le support et la déposer dans le séquenceur Automate ABI 3730. Lancer le séquençage.

➤ Analyse des séquences

Les séquences brutes obtenues par le séquençage a été analysée et corrigée par le logiciel ChromasPro. Les séquences obtenus sont soumises via internet à l'aide du logiciel Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), pour comparaison avec les séquences homologue contenues dans la banque informatique internationale dénommée «GenBank».

Les résultats sont exprimés en pourcentage de similarité de la souche à identifier avec les espèces les plus proches (Altschul *et al.*, 1997). Ensuite déterminer son affiliation génétique.

Après avoir aligné les séquences, l'arbre phylogénétique a été construit avec le programme Mega5 selon la Méthode de «neighbor-joining» (Tamura *et al.*, 2011).

III.2.2.2.1.7 Séquençage du génome complet de la souche *Lactococcus garvieae* M14

III.2.2.2.1.7.1 Conditions de croissance et préparation d'ADN génomique

La souche *L. garvieae* a été cultivée sur la gélose Columbia enrichie à 5% de sang de mouton (BioMérieux) à 37 ° C en atmosphère aérobie. Les bactéries cultivées dans trois boîtes de Pétri ont été récoltées et remises en suspension dans 4x100µL de tampon TE (Tris-EDTA). Ensuite, 200 ul de cette suspension a été diluée dans 1 ml de tampon TE pour le traitement de lyse. Après une incubation de 30 minutes à 37 °C avec les lysosymes, la lyse a été effectuée avec lauryl sarcosile à 1% et un traitement par une ARN ase a une concentration de 50 µG/µL pendant 1 h suivit d'une incubation pendant une nuit avec l'enzyme protéinase K à 37 °C. L'ADN extrait a été ensuite purifié en utilisant trois extraction successives au phénol chloroforme suivis par une précipitation durant toute la nuit dans l'éthanol à 20°C. Après centrifugation, l'ADN a été

mis en suspension dans un volume de 70 μL de solution TE. Le rendement et la concentration ont été mesurés avec le kit Quant-it PicoGreen (Invitrogen) par le fluoromètre Genios-Tecan à 113 ng/ μl .

III.2.2.2.1.7.2 Le séquençage et l'assemblage du génome

L'ADN génomique de *L. garviae* a été séquencé en utilisant le séquenceur MiSeq Technology® (Illumina Inc, USA) avec la stratégie de séquençage de grands fragments « mate pair ».

L'AND génomique (ADNg) a été répertorié, ensuite analysé par le kit « Nextera Mate Pair » (Illumina). Puis quantifié avec un kit de haute sensibilité Qubit® (Life technologies, USA) à 40.8/ μ . La collection de grands fragments a été préparé avec 1 μg d'ADN génomique en utilisant le guide Nextera (illumina). L'échantillon d'ADN génomique a été simultanément fragmenté et étiqueté avec des adaptateurs de jonction de grands fragments.

Le profil de fragmentation a été validé sur un bioanalyseur de puce d'ADN « Agilent 2100 bioanalyzer » (Agilent Technologies Inc, USA). Les fragments d'ADN montrent une taille moyenne de 4.5 kb (4.486 pb). Aucune sélection des fragments étiquetés en fonction de la taille et uniquement une quantité 308.6 ng de fragments a été circularisé. Dans un dispositif de microtubes, l'ADN circularisé a été mécaniquement fragmenté aux séquences de taille 652 pb en utilisant « Covaris device S2 » (Covaris, USA). Le profil de la collection a été visualisé sur un bioanalyseur de puce d'ADN « Agilent 2100 bioanalyzer » (Agilent Technologies Inc, USA). L'ensemble des collections a été normalisé à 2 nM et mélangé.

Après l'étape de la dénaturation et la dilution à 10 pM, le mélange des collections a été chargé dans un réactif cartouche, ensuite sur l'instrument avec la cellule de débit.

La génération de cluster et le séquençage automatisé ont été réalisées dans 42 h par un seul Run de 2 x 251 pb. Un Total d'information 8.6 Gb a été généré à partir d'une densité de cluster 950 K/mm² avec un cluster passage des filtres de contrôle de la qualité de 93.12% (18.182.000 clusters). Dans ce Run, la représentation d'index pour *L. garviae* était déterminée à 9.73%.

La stratégie de séquençage du génome complet « The whole-genome shotgun strategy » en utilisant la technologie de séquençage Illumina a fourni 3.294.808 read. Ceux-ci ont été traité

en utilisant Trimmomatic (Nurk *et al.*, 2013), ensuite assemblé par le logiciel thought Spades (Bankevich *et al.*, 2012, Boetzer *et al.*, 2011, Boetzer *et al.*, 2012). Les contigs obtenus ont été combiné ensemble par les logiciels : SSPACE (Gao *et al.*, 2011), Opera software v1.2 (Boetzer *et al.*, 2012), GapFiller V1.10 (Lagesen *et al.*, 2007) et CLC Genomics v7 software (CLC, Denmark).

III.2.2.2.1.8 Annotation du génome

Les gènes non-codants et diverses caractéristiques ont été prédits par l'outils RNAMmer (Lagesen *et al.*, 2007), ARAGORN (Laslett, 2004), Rfam (Nawrocki *et al.*, 2015), PFAM (Punta *et al.*, 2012), Infernal (Nawrocki *et al.*, 2009). Contrairement aux séquences d'ADN codantes (Coding DNA sequences: CDSs) qui ont été prédites par Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010) et leur annotation fonctionnelle ont été achevé par BLAST+ (Camacho *et al.*, 2009) (, HMMER3 (Eddy, 2011) contre la base de donnée UniProtKB (Consortium, 2011). Pour estimer le niveau significatif de similarité, d'une séquence de nucléotides au niveau du génome, entre *L. gaviae* M14 et 9 d'autres membres du genre *Lactococcus* et *Lactobacillus*, nous avons utilisé le logiciel : Average Genomic Identity d'orthologous gene Sequences (AGIOS). Brièvement, ce dernier combine le logiciel Proteinortho (Lechner *et al.*, 2011) pour supprimer les protéines orthologues entre les génomes comparés sur une base de deux à deux. Ensuite, il récupère les gènes correspondants et détermine le pourcentage moyen de l'identité de séquence nucléotidique entre les ORF orthologues à l'aide de l'algorithme d'alignement global de Needleman-Wunsch.

La base de donnée de l'URMITE, nommé BUR database, a été utilisé afin d'annoter les gènes codant pour des bactériocines (Drissi *et al.*, 2015). L'annotation KEGG orthology (Kanehisa *et al.*, 2000) a été achevé en ligne par le serveur KAAS (Moriya *et al.*, 2007). Les voies des gènes potentiellement impliquées ont été tirées de meilleur KO hit. Les fonctions des gènes ont été assigné par COGs (Clusters of Orthologous Groups)) (Tatusov, 1997, Tatusov *et al.*, 2000).

III.2.2.2.2 Approche protéomique

➤ Étude de la cinétique de croissance de *Lactococcus garvieae* M14

On a étudié la cinétique de croissance de la souche *Lactococcus garvieae* M14 (figure 14) pour déterminer à qu'elle heure elle va atteindre la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire, car selon la littérature la production des bactériocines se fait à cette étape- là. On a trouvé qu'après 8 h la bactérie atteint cette phase, alors on a lancé une nouvelle culture dans les mêmes conditions et on a récupéré à la fois le surnageant et le culot pour la recherche des bactériocines et l'identification des protéines totales selon les étapes montrées ci-dessous sur les tableaux 6, 7, 8 et 9 respectivement.

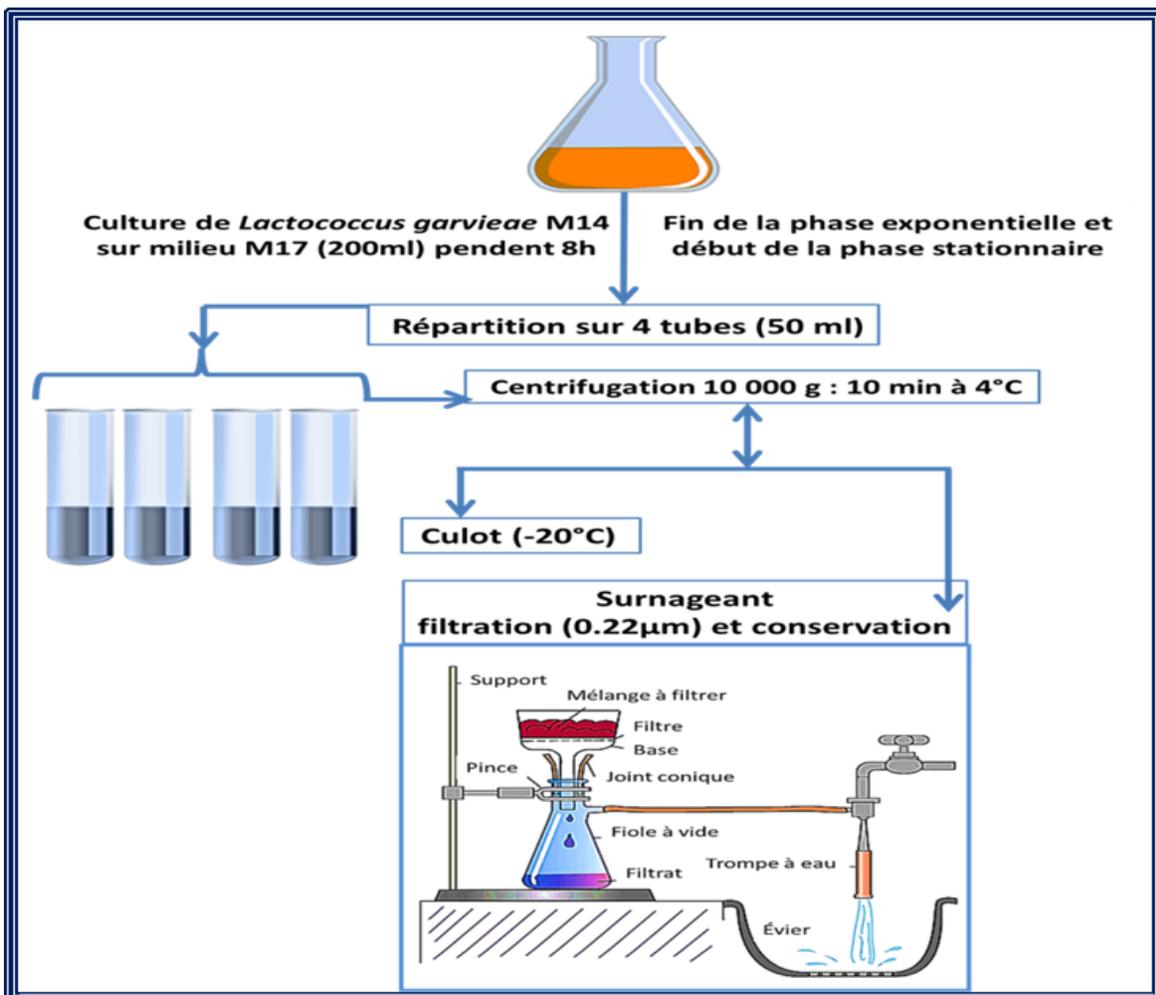


Figure 14 : Schéma illustrant la première étape de l'approche protéomique.

➤ Digestion trypsique

Traiter 500 μ l de protéines et compléter à 200 μ l le volume de cet échantillon avec le tampon de solubilisation (CHAPS 1 % dans 50 mM NH_4HCO_3). Le protocole est montré sur le tableau 7.

➤ SDS PAGE

Faire une électrophorèse pour s'assurer de la bonne digestion des protéines par la trypsine. Déposer pour cela, des quantités égales de protéines avant et après digestion. La composition du tampon d'électrophorèse est montrée au (tableau 8).

Tableau 7: Digestion trypsique des protéines.

Réduction	Ajouter 2 μ l de DTT (1M dans 50mM NH_4HCO_3) ,1heure à température			
Alkylation	Ajouter 10 μ l d'IAA (1 M dans 50 mM NH_4HCO_3) ,1heur à température			
Blocking alkylation	Ajouter 8 μ l de DTT (1Mdans 50mM NH_4HCO_3) ,1heur à température			
Dilution 2x	Ajouter 180 μ l de NH_4HCO_3 pour diluer			
250 μ g trypsinés	200.00	200.00	200.00	200.00
	Ajouter la trypsine en rapport approprié (1 :25)			
μ g de trypsine	10.00	10.00	10.00	10.00
	Digérer une nuit à 37 °C			
Concentration	1.19	1.19	1.19	1.19

Tableau 8: Composition du tampon d'électrophorèse.

Mini Protean	Stacking gel, qsp 30 ml	Resolving gels qsp50 ml			
		7.5%	10%	12.0%	15%
H ₂ O	16.96	24.1	19.9	16.6	11.6
Acrylamide-bis-Acrylamide 30 %	5.00	12.5	16.7	20.00	25.00
Tris-HbCL 1.5M, pH8.8, 0.5M,	7.5 ml	12.5 ml			
SDS 10%	300 μ l	500 μ l			
Ammonium Persulfate 10%	120 μ l	200 μ l			
TEMED	120 μ l	200 μ l			

Le tampon d'électrophorèse est le : Tris-Glycine-SDS (1L de TG-SDS10X dans 10l d'eau final).

Migration des échantillons sur gels SDS-PAGE (20mA et 30 mA /5 et 1h10min. Le voltage est fixé à 500V).

➤ Coloration des protéines à l'argent (silver staining)

- Pour préparer les différentes solutions pour la révélation, prendre une bouteille d'eau stérile et ajuster le contenu à exactement 1l, ajouter les différentes poudre et s'assurer qu'elles sont bien dissoutes.

- Pour changer les solutions entre chaque étape ou chaque lavage :

- Prendre un gan propre et le rincer avec l'ancienne solution.

- D'une main bloquer le gel et de l'autre vider la solution.

- Ajouter ensuite la nouvelle solution.

Le protocole de la coloration est montré au (tableau 9).

Tableau 9: Coloration des protéines à l'argent

Opération	Réactifs	Volume final = 1l	Temps
Fixation	40% éthanol	400 ml	60 min
	10 % acide acétique	100 ml	
Lavage	30% éthanol	300 ml	3x20min
Sensibilisation (Sol.2)	Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.2g/l	200 ml Frais, froid	2 min
Lavage	Mili -Q H_2O		3x30 sec
Réaction	Silver nitrate (AgNO_3) 2g/l	2g	20 min
	0.02%formaldehyde solution (37%)	200 μl	
Lavage	Mili -Q H_2O		3x60 sec
Révélation	Sodium carbonate (Na_2CO_3) 30g/l	30 g	2 à 10 min
	0.05%formaldehyde solution (37%)	500 μl	
Arrêt	Glycine 0.5 % 1	5g	10 min
Lavage	Mili -Q H_2O		

Le tableau 10 résume l'étape effectuée avant le passage à l'identification des protéines par spectrométrie de masse (Autoflex).

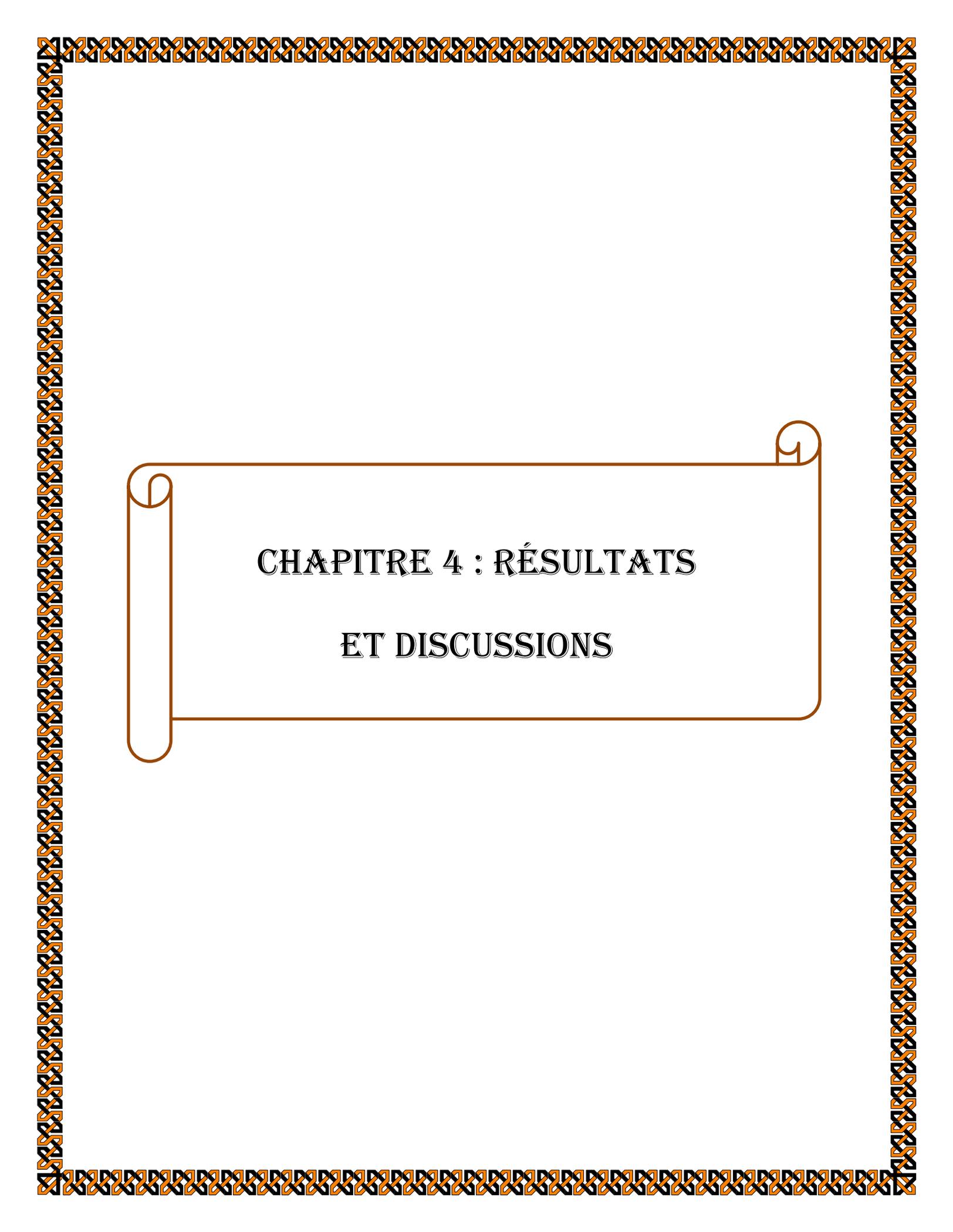
Tableau 10: L'étape avant le passage à la spectrométrie de Masse (autophlex)

4 d étergeant	<i>L. garvieae</i> M14			
	CHAPS 1% 50 mM NH ₄ HCO ₃	N-Lauroyl sarcosine 50 mM NH ₄ HCO ₃	Deoxycholate 50 mM NH ₄ HCO ₃	Laurate 50 mM NH ₄ HCO ₃
Concentration (µg/µl)	5.958	5.958	5.958	5.958
Traitée (500µg)	83.923	83.923	83.923	83.923
Reprise dans	Volume 200 µl final et Sonication 2 fois 1 minute			
Réduction	Ajouter 2 µl de DTT (1M dans 50mM NH ₄ HCO ₃), 1 heure à T ambiante			
Alkylation	Ajouter 10 µl d'IAA (1M dans 50mM NH ₄ HCO ₃), 1 heure à T ambiante			
Blocking alkylation	Ajouter 8 µl de DTT (1M dans 50mM NH ₄ HCO ₃), 1 heure à T ambiante			
Dilution 2 fois	Ajouter 180 µl			
Concentration (µg/µl)	1.25	1.25	1.25	1.25
100µg Trypsinés	80	80	80	80
	Ajouter la trypsine dans un rapport approprié			
µg de trypsine	4.00	4.00	4.00	4.00
	Digérer pendant une nuit à 37°C			
Concentration (µg/ µl)	1.19	1.19	1.19	1.19

➤ Western Blot

- Migration des échantillons sur gels SDS-PAGE (15 mA et 30 mA / 5 et 40 min. Le voltage est fixé à 500 V).
- Transfert sur membrane de nitrocellulose (100 V/70 min)
- Le tampon de transfert = Tris-Glycine-Méthanol 20%.

- Saturation en PBS- Tween 0.2% - lait 5% (1heure à température ambiante ou pendant une nuit à 4°C).
- Incubation avec le premier Ac dilué dans PBS-Tween 0.2 %- Lait 5%.
- 3 lavages x 10 min /PBS Tween 0.2 %.
- Incubation avec le 2eme Ac dilué dans PBS- Tween 0.2%- Lait 5% au millième.
- 3 lavages x 10 min /PBS-Tween 0.2%.
- Révélation ECL.



CHAPITRE 4 : RÉSULTATS
ET DISCUSSIONS

CAHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1 Résultats de l'analyse des échantillons

IV.1.1 Analyses physicochimiques

La composition physico-chimique des échantillons de lait varie selon les fermes. Pour tous les échantillons de lait analysés, les valeurs des pH se situent entre 6.3 et 6.9 avec une moyenne de 6.6. L'acidité Dornic varie entre 11.15 °D et 11.71°D (tableau 11).

Tableau 11: Composition physico-chimique des échantillons de lait

Échantillons	pH	Acidité Dornic
1	6.5	11.15
2	6.5	11.52
3	6.4	11.30
4	6.2	11.35
5	6.7	11.15
6	6.4	11.22
7	6.9	11.71
8	6.8	11.13
9	6.9	10.22
10	6.8	10.29
11	6.5	11.12
12	6.7	11.91
13	6.3	11.60
14	6.8	11.71

IV.1.2 Analyses microbiologiques

IV.1.2.1 Étude de la flore non lactique

Les résultats des analyses des échantillons de lait fermentés (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11) sont montrés aux tableaux : 11, 12 et 13.

Tableau 12: Résultats des analyses microbiologiques des échantillons E1, E2, E3, E4, E5.

Germes		Échantillons																			
		E1				E2				E3				E4				E5			
Flore Aérobie Mésophile (UFC/ml)		4.10 ³				26.10 ³				1.10 ³				15.10 ³				39.10 ³			
Coliformes (UFC/ml)	T (37 °C)	-1	-2	-3	M	-1	-2	-3	M	-1	-2	-3	M	-1	-2	-3	M	-1	-2	-3	M
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F (44 °C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85. 10 ⁻²	0	2833
Streptocoques fécaux (UFC/ml)		0				4				4				9				40			
Levures et moisissures (UFC/ml)		-1	-2	M	-1	-2	M	-1	-2	M	-1	-2	M	-1	-2	M	-1	-2	M		
		0	10. 10 ²	5. 10 ²	20.1 0 ¹	0	1. 10 ²	0	5. 10 ²	25.1 0 ¹	0	50	0	25	165. 10 ¹	0	825				
Staphylocoques (présence/absence)		Abs				Abs				Abs				Abs				Abs			
Spores d'anaérobies Sulfite-réducteurs (présence/absence)		-1	-1	-2	-2	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-2	-2
		abs	Ab s	Ab s	Ab s	Ab s	Ab s	ab s	Ab s	Ab s	Ab s	Ab s	Ab s	Ab s	Ab s	ab s	Ab s	a b s	a b s	a b s	a b s
Salmonelles (présence/absence)		Abs				Abs				Abs				Abs				Abs			

Tableau 13: Résultats des analyses microbiologiques des échantillons E6, E7, E8.

Germe		Échantillons											
		E6				E7				E8			
Flore Aérobie Mésophile		248.10 ³				298.10 ³				198.10 ³			
Coliformes (UFC/ml)	T (37°C)	-1	-2	-3	M	-1	-2	-3	M	-1	-2	-3	M
		0	247.10 ²	44.10 ³	229.10 ²	10	0	0	3.33	380	39.10 ²	36.10 ³	13426.6
	F (44°C)	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	3.33
Streptocoques fécaux (UFC/ml)		75				0							
Levures et moisissures (UFC/ml)		-1	-2	M		-1	-2	M		-1	-2	M	
		0	31500	15750		22350	47500	34925		666200	68.10 ⁴	6731.10 ²	
Staphylocoques (présence/absence)		Abs				Abs				Abs			
Spores d'anaérobie Sulfite-réducteurs (présence/absence)		-1	-1	-2	-2	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-2	-2
		Abs	Abs	Abs	Abs	1C	Abs	Abs	Abs	Abs	1C	abs	abs
Salmonelles (présence/absence)		Abs				Abs				Abs			

Tableau 14: Résultats des analyses microbiologiques des échantillons E9, E10, E11.

Germes		Échantillons											
		E9				E10				E11			
Flore Aérobie Mésophile (UFC/ml)		198.10³				3200.10³				105.10³			
Coliformes (UFC/ml)	T (37 °C)	-1	-2	-3	M	-1	-2	-3	M	-1	-2	-3	M
		0	0	48.10³	16.10³	0	0	12.10³	4.10³	0	0	0	16.10³
	F (44 °C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Streptocoques fécaux (UFC/ml)		9				0				0			
Levures et moisissures (UFC/ml)		-1	-2	M		-1	-2	M		-1	-2	M	
		210.10¹	15.10²	18.10²		120.10¹	60.10²	36.10²		30.10¹	62.10²	46.10²	
Staphylocoques (présence/absence)		Abs				Abs				Abs			
Spores d'anaérobie Sulfito-réducteurs (présence/absence)		-1	-1	-2	-2	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-2	-2
		Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	abs	Abs	abs
Salmonelles (présence/absence)		Abs				Abs				abs			

IV.1.2.2 Étude de la flore lactique

IV.1.2.2.1 Dénombrement des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont présentes dans tous les échantillons de lait analysés à des dénombrements de 10^6 à 10^7 ufc/ml. Cette observation est en accord avec celle déjà décrite.

IV.1.2.2.2 Isolement et caractérisation des bactéries lactiques par api 50 CHL

A partir des échantillons de lait collectés, on a isolé 50 bactéries lactiques qui ont été conservées sur des tubes à Cryobilles à -80 ° C.

Ces isolats ont été considérés comme LAB présomptif basé sur : le Gram positif, l'absence de la catalase, la non formation de gaz à partir du glucose et l'immobilité (croissance au long de la piqûre centrale sur milieu semi-solide (M17)). Ces isolats ont été par la suite identifiés par l'API 50CHL (Ouahghiri, 2009), mais dans certains cas, il y a des identifications inexactes ou des profils inexistant dans la base de données (données API) générant ainsi des profils inacceptables. Dans ce cas, ils ont été considérés comme des isolats non identifiés. Ainsi, on a obtenu à partir des 50 isolats testés par API 50CHL , 23 *Lactococcus lactis* spp *lactis1*, les hydrates de carbone fermentés étaient (RIB , DXYL , GAL , GLU , FRU , MNE , MAN , NAG , AMY , ARB , ESC , SAL , CEL , LAC , SAC , TRE , et GEN) et 3 *Lactococcus lactis* spp *lactis2* (RIB , GAL , GLU , FRU , MNE , NAG , ARB , ESC , SAL , CEL , BAC, TRE , AMD et GEN) , 16 isolats a bas profils de discrimination et 8 isolats non identifiés (profils inacceptables). Etant donné que le système API ne donne pas une identification précise, les 50 isolats obtenus ont tous été étudiés par MALDI-TOF MS.

IV.1.2.2.3 Identification par MALDI-TOF MS

Nous étudions la précision et la faisabilité de la spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) pour l'identification des bactéries lactiques au niveau de l'espèce dans le lait fermenté (LEBEN, RAIB), yaourts et fromages frais. Les résultats sont présentés sur le tableau 15. Les souches qui ont été identifiées comme *Lactococcus lactis* ssp *lactis1* et *Lactococcus lactis* ssp *lactis 2* (avec un bon pourcentage d'identification (Bonne identification) par le système api 50CHL ont donné les mêmes résultats par MALDI-TOF MS à l'exception de la souche B30, le genre était lui-même (*Lactococcus*) mais le MALDI a montré qu'il s'agit de l'espèce *Lactococcus garvieae* nommé avant *Enterococcus seriolicida* (synonyme junior de *Lactococcus*

garvieae) (Eldar *et al.*, 1999, Ammor, 2004). Pour confirmer ce résultat un séquençage du gène 16S a été lancé pour cette souche.

Pour les autres souches qui ont été identifiées comme appartenant à *Lactococcus lactis ssp lactis 1* avec un faible score de correspondance (faible discrimination), le MALDI les a identifiées comme appartenant au genre *Enterococcus*. Cette discordance dans les résultats peut probablement être expliquée par le fait que l'API50 CHL ne comprend pas ce genre dans sa base de données. Ainsi, nous avons identifié la présence d'*Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* dans le fromage frais.

Bien qu'ils soient utilisés dans l'industrie alimentaire et jouent un rôle essentiel dans la qualité bactériologique des aliments, l'utilisation des entérocoques dans l'industrie alimentaire est de plus en plus controversée, car ils sont aussi considérés comme des marqueurs de contamination fécale et sont impliqués dans le développement des infections nosocomiales (Aguilar-Galvez *et al.*, 2012). Cependant, leur capacité à produire diverses molécules antimicrobiennes tels que les bactériocines (Entérocoques), peut avoir une valeur en développant des méthodes de purification qui remplacent l'utilisation de ces souches par l'utilisation de leurs bactériocines dans les matrices alimentaires (Bhardwaj *et al.*, 2008, Aguilar-Galvez *et al.*, 2012). Aussi, nous avons identifié la souche *Lactobacillus fermentum* qui a été isolée à partir d'un échantillon de bière, *Lactococcus lactis* dans les yaourts Activia et Acti + et *Enterococcus faecium* dans Ramdy et Nature Sommam. Pour cette étude, nos résultats ont été validés par des méthodes indépendantes basées sur l'identification biochimique par (API 50 CHL) et moléculaire par (MALDI-TOF MS). Au cours des dernières années la spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) a révolutionné l'identification systématique des bactéries. L'identification rapide et fiable des bactéries associées à des aliments, en particulier, l'identification de LAB impliqué dans la production d'aliments fermentés est d'une importance cruciale pour la qualité du produit (Doan *et al.*, 2012, Pavlovic *et al.*, 2013). LAB alimentaire peuvent être identifiées en utilisant MALDI-TOF MS, et son application pourrait être étendue à d'autres matrices alimentaires (Angelakis *et al.*, 2011).

Tableau 15 : Comparaison entre l'identification des bactéries lactique par API 50CHL et spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS).

Souches	Nature de l'échantillon	Identification par API 50 CHL	Score	MALDI Biotyper	Score
B1	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Faible discrimination	<i>Enterococcus faecium</i>	2.431
B2	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Très bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.288
B4	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Faible discrimination	<i>Enterococcus faecium</i>	2.446
B5	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Faible discrimination	<i>Enterococcus faecium</i>	2.382
B6	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Faible discrimination	<i>Enterococcus faecium</i>	2.455
B7	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Faible discrimination	<i>Enterococcus faecium</i>	2.451
B8	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Très bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.496
B9	Rayeb	<i>Pediococcus pentosaceus2</i>	Profil douteux	<i>Enterococcus faecium</i>	2.462
B10	Yaourt (Activia)	<i>Lactococcus lactis ssp lactis2</i>	Bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.507
B11	Fromage frais	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Faible discrimination	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.319
B12	Yaourt (Acti+)	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.533
B13	Yaourt (Activia)	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Très bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.456
B14	Yaourt t (Activia)	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Très bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.417
B15	Fromage frais	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	faible discrimination	<i>Enterococcus faecium</i>	2.5
B16	Fromage frais	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	faible discrimination	<i>Enterococcus faecium</i>	2.523
B17	yaourt (Acti+)	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.278
B18	yaourt t (Ramdi)	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Très bonne identification	<i>Enterococcus faecium</i>	2.488
B19	yaourt (Nature sommam)	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Très bonne identification	<i>Enterococcus faecium</i>	2.529
B20	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Très bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.017
B21	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Très bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.13
B22	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Très bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.004
B23	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Très bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.222
B24	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis2</i>	Très bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.327
B25	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Très bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.188

Tableau 16 : Comparaison entre l'identification des bactéries lactique par API 50CHL et spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) - Suite.

B27	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Très bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.33
B28	Leben	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Très bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.406
B29	Leben	<i>Lactococcus lactis ssp lactis2</i>	Bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.237
B30	Leben	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Identification acceptable	<i>Lactococcus garvieae</i>	2,943
B36	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Très bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.324
B37	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.293
B38	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.141
B39	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.327
B40	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp cremoris1</i>	Bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.365
B41	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Très bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.231
B42	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp cremoris1</i>	Identification peu fiable	<i>Lactococcus lactis</i>	2.359
B43	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.311
B44	Rayeb	<i>Lactococcus lactis ssp cremoris1</i>	Identification peu fiable	<i>Lactococcus lactis</i>	2.352
B45	Rayeb	<i>Lactococcus lactisssp lactis1</i>	Bonne identification	<i>Lactococcus lactis</i>	2.317
B46	Leben	<i>lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Faible discrimination	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,315
B47	Leben	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Faible discrimination	<i>Enterococcus faecium</i>	2,433
B48	Leben	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Faible discrimination	<i>Enterococcus faecium</i>	2,558
B49	Leben	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Faible discrimination	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,381
B50	Leben	<i>Lactococcus lactis ssp lactis1</i>	Faible discrimination	<i>Lactococcus lactis</i>	2,1

IV.1.2.2.4 Criblage des bactéries lactiques à activité antibactérienne

Parmi les 50 souches isolées à partir de 44 produits laitiers fermentés traditionnellement, 10 ont montré une activité antagoniste vis-à-vis de la souche indicatrice *L. monocytogenes* ATCC 7644.

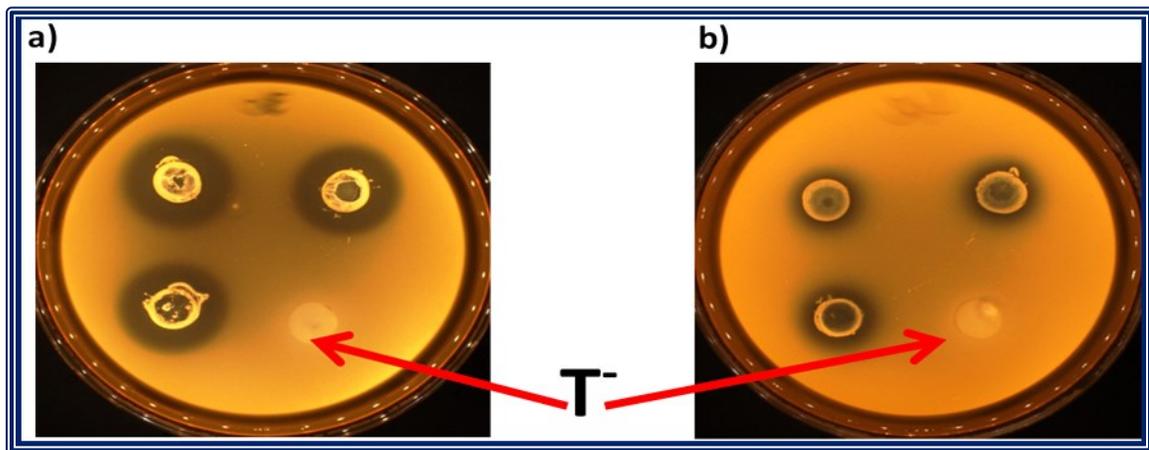


Figure 15 : Activité antibactérienne des souches lactiques à l'encontre de *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Méthode de double couche). a) *Lactococcus garvieae* M14, b) *Lactococcus lactis*.

Cependant, la recherche de l'activité antimicrobienne dans des conditions qui éliminent les effets de l'acide lactique et du peroxyde d'hydrogène et en utilisant la méthode de diffusion en puits nous a permis de cribler une seule souche *Lactococcus garvieae* M14 qui produit un facteur antimicrobien qui pourrait s'agir d'une bactériocine (figure 15) (Kaur *et al.*, 2012).

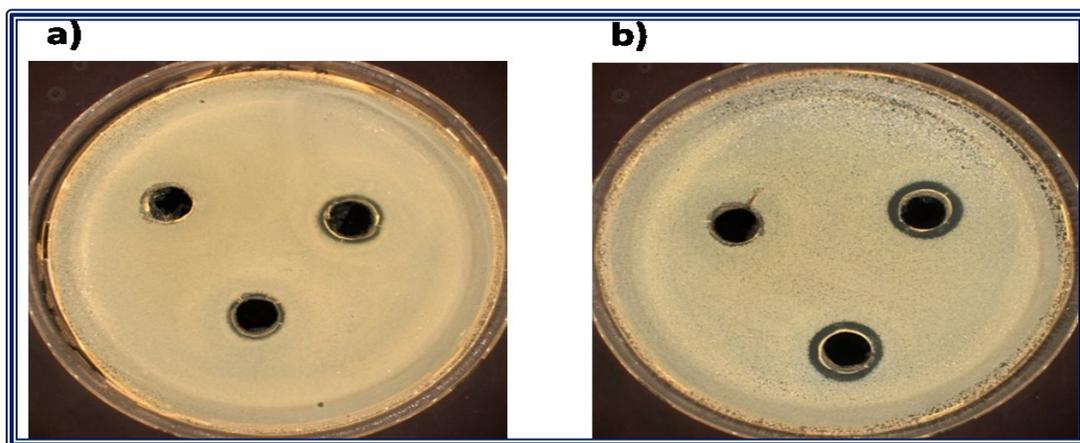


Figure 16 : Activité antibactérienne des souches lactiques à l'encontre de *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Méthode de diffusion en gélose). a) *Lactococcus lactis*, b) *Lactococcus garvieae* M14.

L'étude de l'activité antibactérienne des souches des genres *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Lactobacillus* est montré aux figures : 16, 17 et 18 respectivement.

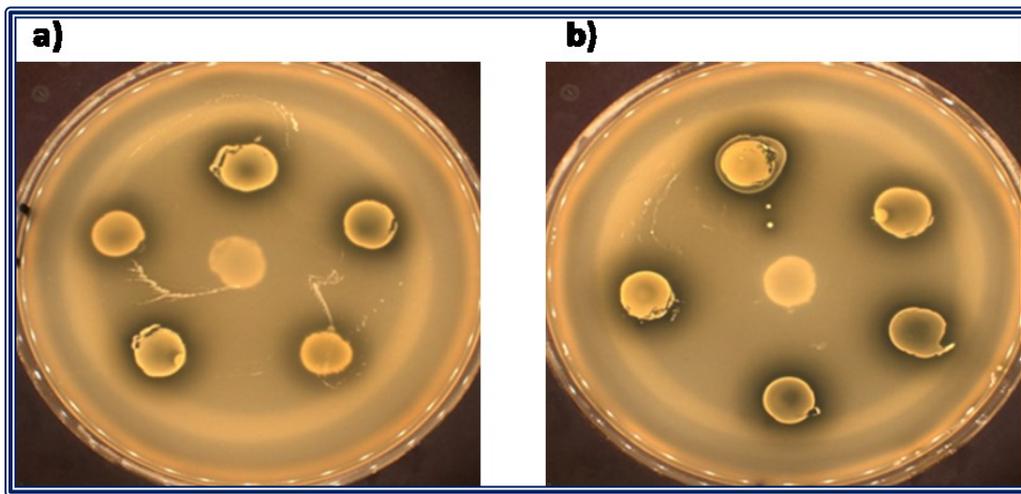


Figure 17 : Activité antibactérienne des souches lactiques à l'encontre de *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Méthode de double couche). a) Souches du genre *Lactococcus*, b) Souches du genre *Enterococcus*.



Figure 18 : Activité antibactérienne des souches lactiques à l'encontre de *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Méthode de double couche). Souches du genre *Lactobacillus*

Sur la figure 18, les numéros représentent respectivement : 1- *Lactobacillus fermentum*, 2- *Lactobacillus rhamnosus* CSUR P 567, 3- *Lactobacillus ingluviei* CSUR P 209, 4- *Lactobacillus plantarum* CSUR P 691, 5- *Lactobacillus casei*.

IV.1.2.2.5 *Lactococcus garvieae* M14 sur gélose Columbia au sang, en microscopie optique et électronique

La croissance a eu lieu à toutes les températures testées (28, 30, 37, et 45 ° C), mais la croissance optimale a été observée à 37 ° C. Les colonies étaient 1- 6 mm de diamètre et modérément opaques dans des conditions anaérobies facultatives sur gélose Columbia enrichi au sang (BioMérieux) (figure 19) et semblaient de couleur blanchâtre à 28 ° C. Le test de la motilité était négatif.



Figure 19 : *Lactococcus garvieae* M14 sur gélose Columbia au sang

La figure 19 montre le résultat de culture de la souche *L. garvieae* cultivée sur la gélose Columbia enrichie de sang, on peut constater des colonies modérément opaques avec des diamètres 1-6 mm. La coloration de Gram montre des cocci à Gram positif non sporulant (figure 20).

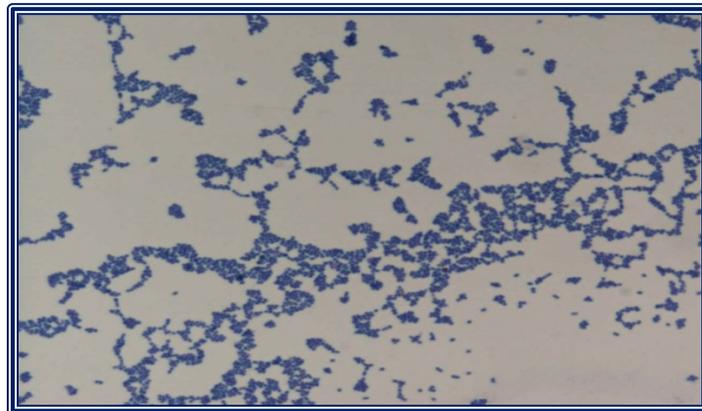


Figure 20: *Lactococcus garvieae* M14 en microscopie optique après coloration de Gram (grossissement x 100).

La microscopie électronique de transmission de la souche *L. garvieae* M14 a été réalisée en utilisant un spectromètre 268D Morgani (Philips) à une tension de fonctionnement de 60 kV. La barre d'échelle représente de gauche à droite : 200 nm, 1 μ m, 200 nm, 500 nm, 200 nm et 500 nm (figure 21).

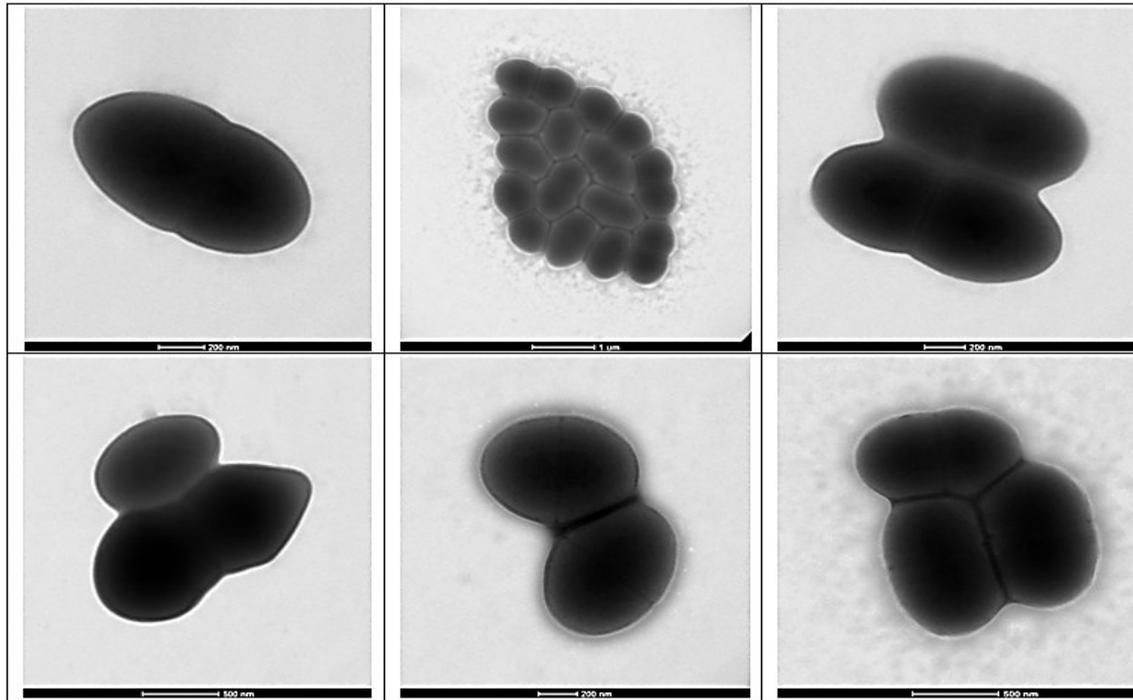


Figure 21: Micrographes MET de *Lactococcus garvieae* M14.

La souche *L. garvieae* se présente sous forme de coques caractéristiques de la morphologie du genre lactococcus. Sur le micrographe MET, on peut constater que les coques de *L. garvieae* s'associent en un amas. Les cellules cultivées sur gélose ont une longueur allant de 0.79 à 0.93 μ m (moyenne 0.86 μ m) et un diamètre allant de 0.59 à 0,63 μ m (moyenne 0.61 μ m) tel que déterminé par la coloration négative (micrographie MET) (figure 21).

IV.1.2.2.6 Classification et caractéristiques de la souche *Lactococcus garvieae* M14

L' utilisation du système API 50CH (figure 22- a) a montré des réactions positives pour le D-ribose, le D-glucose, le D-fructose, le D-mannose, le D-galactose, D-mannitol, l'amygdaline, arbutine, la N-acétylglucosamine, l'esculine, la salicine, D –cellobiose, D-lactose, D-saccharose et le D-tréhalose. Les réactions négatives ont été observées pour le glycérol, erythriol, le D-arabinose, le L-arabinose, D-xylose, L-xylose, D-adonitol, méthyl- β D-

xylopyranoside, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, l'inositol, D -sobitol, méthyl- α D-mannopyranoside, methyl- α D-glucopyranoside, D-maltose, D-mélibiose, inuline, D-mélézitose, D-raffinose, l'amidon, le glycogène, le xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose , D-tagatose, le D-fucose, L-fucose, le D-arabitol et le gluconate.

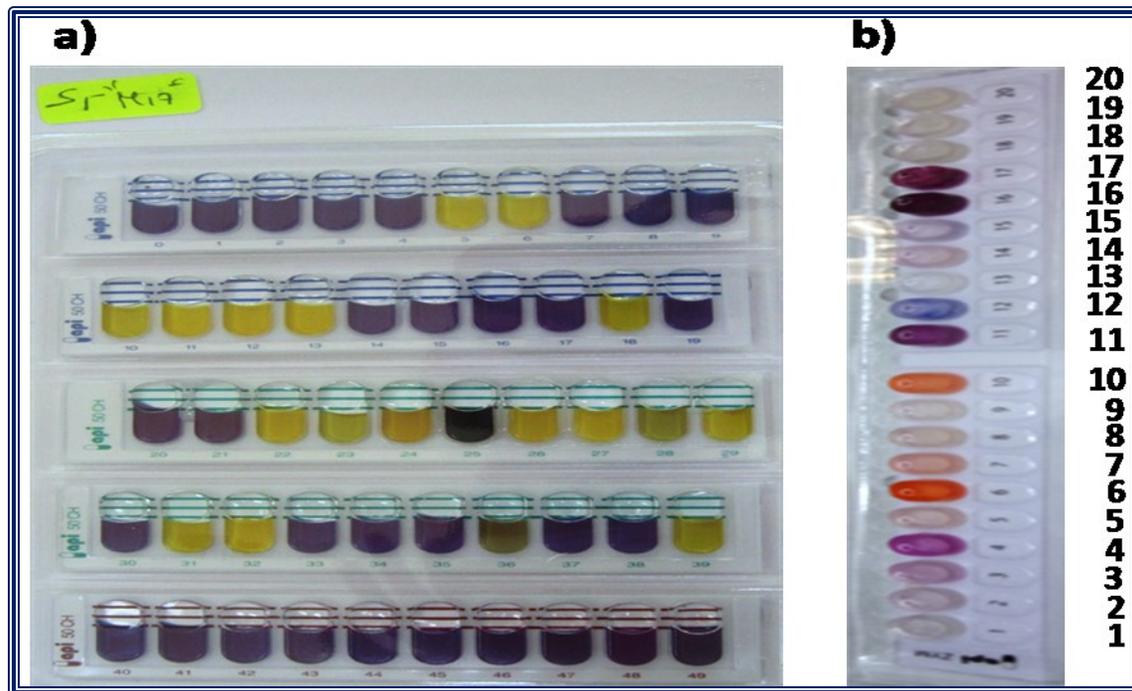


Figure 22 : Résultat des tests : a) test de fermentation des carbohydrates (api 50CHL) de la souche *Lactococcus garvieae* M14, b) test api zym de la souche *Lactococcus garvieae* M14.

Sur la figure 22-b, les chiffres représentent respectivement de bas en haut :

1. Temoin négatif,
2. Alkaline phosphatase
3. Esterase (C4)
4. Esterase lipase (C4)
5. Lipase (C14)
6. Leucine arylamidase
7. Va line arylamidase
8. Cystine arylamidase
9. Trypsin
10. α -chemotripsin
11. Acid phosphatase
12. Naphtal-AS-BI-phosphohydrolase

13. α -galactosidase
14. β -galactosidase
15. β -glucuronidase
16. α -glucosidase
17. β -glucosidase
18. N-acetyl- β -glucosaminidase
19. α -mannosidase
20. α -fucosidase

En utilisant le système API ZYM (figure 22-b), les réactions négatives ont été observées pour la phosphatase alcaline, la cystine arylamidase (protéases), la trypsine, l'alpha-galactosidase (mélibiase), bêta-glucosidase (cellulases), l'alpha-mannosidase, l'alpha-fucosidase, les réactions positives étaient observé pour estérase, estérase lipase, la lipase, la leucine et la valine arylamidase, l'alpha-chemotrypsine, la phosphatase acide, la bêta-galactosidase, la bêta-glucuronidase, alpha- et de bêta-glucosidase. La réaction de l'uréase, la réduction des nitrates et la production d'indole étaient négative.

Lorsque comparé à des espèces phylogénétiquement proches de *Lactococcus* et *Lactobacillus* (Morita *et al.*, 2011, Schleifer *et al.*, 1985), la souche *L. garvieae* M14 présentait les différences phénotypiques détaillées sur le tableau 17. *L. garvieae* était sensible à l'amoxicilline, l'imipénème, piperacilin, ciprofloxacine, ceftriaxone, l'érythromycine, la vancomycine, la nitrofurantoïne, le métronidazole, rifampicine mais résistant à la céfoxitine et cotrimoxazol.

Tableau 17 : Caractéristiques phénotypiques différentiels entre *L. garvieae* souche M14 et les espèces phylogénétiquement proches.

Caractéristiques	<i>L. garvieae</i> M14 DSM 29394	<i>L. garvieae</i> DSM 6783	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 20481	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> DSM 20069	<i>L. rhamnosus</i> DSM 20021	<i>L. sakei</i> subsp. <i>Sakei</i> DSM20017	<i>L. plantarum</i> DSM 20174	<i>L. fermentum</i> DSM 20052	<i>L. salivarius</i> DSM 20555
Coloration de Gram	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
Forme des cellules	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille	Bacille
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-ribose	+	+	+	-	+	+	+	+	-
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannitol	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Amygdalin	+	+	+	-	+	-	+	-	-
Arbutin	+	+	+	-	+	-	+	-	-
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	-	+	+	-
D-lactose	+	-	+	-	+	-	+	+	+
Inulin	-	-	+	-	-	-	+	-	-
D-Melezitose	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phosphatase alcaline	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Acid phosphatase	+	+	-	+	+	-	-	-	+
α -Glucosidase	+	+	+	-	+	-	-	+	+
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-	+	-	+	-	-	+	-
α -mannosidase	-	-	+	-	-	-	+	+	-

IV.1.2.2.7 Résultats du séquençage du gène de l'ARN 16S

IV.1.2.2.8 Position de la souche *L. garvieae* M14 par rapport à d'autres souches phylogénétiquement proches au sein du genre *Lactococcus* et *Lactobacillus*

Le gène de l'ARNr 16S de la souche M14 a été séquençé et déposé dans la base de données GenBank sous le numéro d'accèsion LK985397.

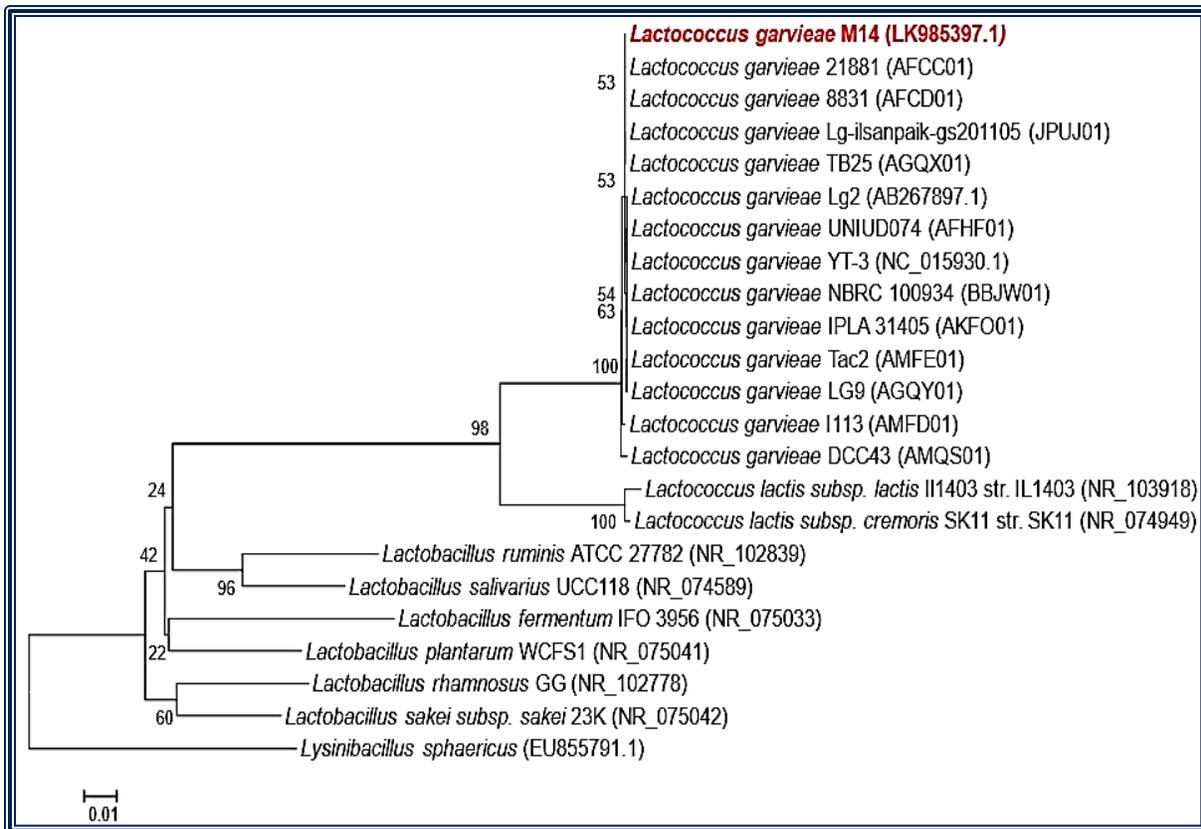


Figure 23: Arbre phylogénétique soulignant la position de la souche. *L. garvieae* M14 (LK985397) par rapport à d'autres souches phylogénétiquement proches au sein du genre *Lactococcus* et *Lactobacillus*, avec *Lysinibacillus sphaericus* comme outgroupe. Numéros aux nœuds sont des pourcentages de valeurs de bootstrap obtenues en répétant 500 fois l'analyse pour générer un arbre consensus majoritaire. La barre d'échelle représente 2 % de divergence de séquence nucléotidique.

Une recherche sur la base de données BLAST a révélé que la souche M14 était plus proche aux espèces *Lactococcus* avec une valeur d'identité de séquences des gènes de 99,7% avec *Lactococcus garvieae* YT-3. Basé sur l'analyse comparative des séquences du gène de l'ARNr 16S, la souche M14 appartient aux espèces déjà décrites *L. garvieae* (Fox et al., 1977a, Lagesen et al., 2007). L'arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène ARNr 16S avec

une longueur minimale de 1.517 nucléotides a été reconstruits en utilisant la matrice de distance (neighbor-joining) dans la version du logiciel MEGA 5 (figure 23),(Tamura *et al.*, 2011). Par conséquent, les séquences des souches des dix espèces les plus proches *L. garvieae* YT-3 (NR_102968), *Lactococcus garvieae* Lg2 (AP009333), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (NR_103918), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (NR_074949), *Lactobacillus rhamnosus* GG (NR_102778), *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 23K (NR_075042), *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (NR_075041), *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 (NR_075033), *Lactobacillus salivarius* UCC118 (NR_074589) et *Lactobacillus ruminis* ATCC 27782 (NR_102839) ont été alignées avec la séquence du gène ARNr 16S de la souche M14 en utilisant Clustal X version 2.0. (Larkin *et al.*, 2007). La souche M14 forme ensemble avec les souches YT-3 et Lg2 et les espèces de *L. lactis* une lignée commune soutenue par une haute valeur de bootstrap de 100% (figure 23).

IV.1.2.2.9 Descriptions étendues des fonctionnalités

Une analyse des protéines a été réalisée à l'aide d'un spectromètre Microflex (Bruker Daltonics, Leipzig, Allemagne) Laser-désorption / ionisation à temps de vol (MALDI-TOF) MS assistée par une matrice comme décrit avant (Seng *et al.*, 2009). Douze dépôts distincts ont été réalisés pour la souche M14 à partir de 12 colonies isolées. Les douze spectres ont été importés dans le logiciel du MALDI Biotyper (version 2.0, Bruker) et analysés par le modèle standard correspondant (avec les paramètres par défaut) contre 7 289 spectres bactérien dont 26 spectres de trois espèces de *L. garvieae*, utilisés comme données de références, dans la base de données de Biotyper. L'interprétation des scores établis par les Bruker Daltonics est la suivante: un score ≥ 1.9 pour une espèce validement publiée permis son identification au niveau de l'espèce, un score ≥ 1.7 mais ≤ 1.9 permis l'identification au niveau du genre; et un score ≤ 1.7 ne permet aucune identification. Pour la souche M14, les scores obtenus allaient de 2, 177 à 2, 343 avec *Lactococcus spp.*, suggérant que notre isolat est un membre des espèces *Lactococcus* pas encore membre de souches connues. Nous incrémentons notre base de données avec le spectre de la souche M14 (figure 24). Les différences de spectre avec d'autres espèces proches phylogénétiquement sont présentées sur la figure 25.

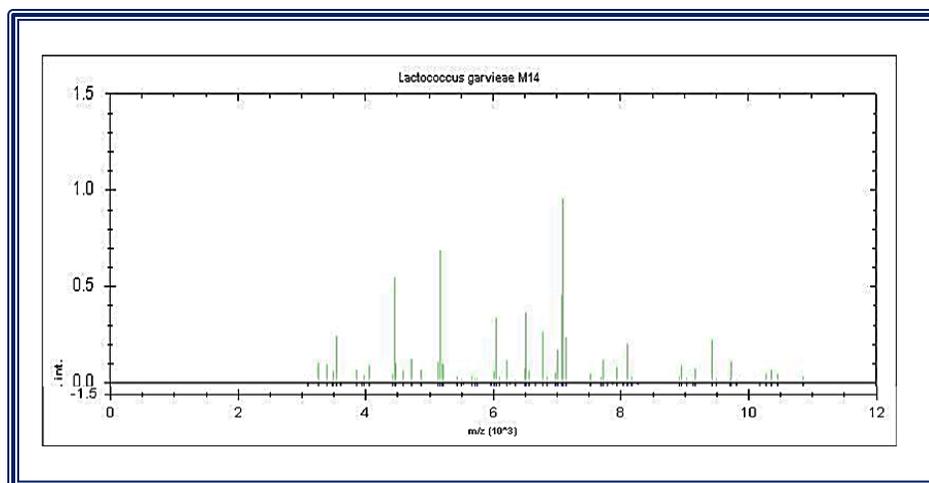


Figure 24 : Spectre de masse de référence de la souche *L. garvieae* M14. Les spectres à partir de 12 colonies individuelles ont été comparés et un spectre de référence a été généré.

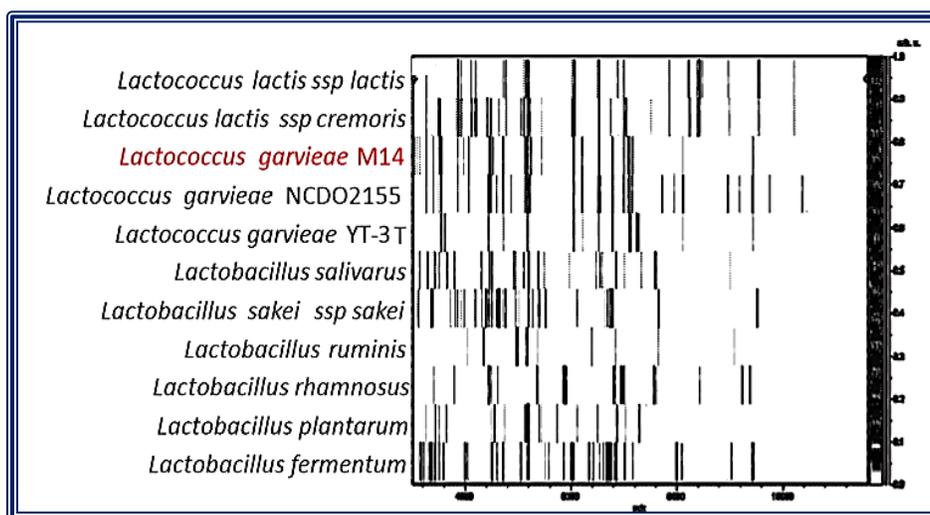


Figure 25 : Profil de spectrométrie de masse (gel view) comparant les spectres de *L. garvieae* M14 avec des espèces du genre *Lactococcus* (*Lactococcus lactis* ssp *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* et deux souches de *Lactococcus garvieae*) et avec des espèces de *Lactobacillus* (*Lactobacillus sakei* ssp *sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus fermentum*)

Le profil de spectrométrie de masse (gel view) montre un nombre variable de spectres, disposé et chargé dans un pseudo-gel comme le montre la figure 25. L'axe X enregistre la valeur de m/z . L'axe gauche Y affiche le nombre de spectre de fonctionnement provenant de la charge du spectre ultérieure. L'intensité de pic est exprimé par un code d'échelle de couleur grise. La couleur de la ligne et la droite de l'axe Y indique la relation entre la couleur du pic exposé avec l'intensité de pic en une unité arbitraire. Les espèces comparées sont indiquées à gauche.

IV.1.2.2.10 Résultats du séquençage du génome complet de la souche *Lactococcus garvieae* M14

IV.1.2.2.11 Historique du projet du Génome

Lactococcus garvieae est utilisé à plusieurs reprises dans l'industrie des produits laitiers fabriqués à partir de lait cru. En outre, la souche M14 a montré des effets bactéricides contre plusieurs bactéries, ce qui indique le rôle éventuel joué par cette souche dans l'industrie alimentaire. En effet, la souche *L. garvieae* M14 était le 46^{ème} génome du genre *Lactococcus* et le 16^{ème} génome de *L. garvieae* sp. Le numéro d'accèsion EMBL est CCXC01000001-CCXC01000013 et se compose de 13 contigs sans lacunes. Le tableau 18 montre l'ensemble des informations minimales du projet, de l'acronyme anglais : MIGS (minimum information about a genome sequence).

Tableau 18 : Informations sur le projet

MIGS ID	Property	Term
MIGS-31	Qualité de finition	projet de haute qualité
MIGS-28	Libraries utilisées	1 mate-paired
MIGS-29	Plateforme de séquençage	MiSeq Illumina
MIGS-31.2	couverture de séquençage	110
MIGS-30	Assembleurs	Spades
MIGS-32	Method d'appelation de Gène	Prodigal
	Identifiant Genbank	CCXC01000001-CCXC01000013
	Date de publication dans Genbank	Oct, 2014
MIGS-13	Source material identifier	M14
	Pertinence du projet	potentiel probiotique et biopreservation

IV.1.2.2.12 Propriétés du génome

Le projet du génome de *L. garvieae* M14 se compose de 13 contigs de tailles comprises entre 889 et 1, 512, 971pb. Le génome de M14 est composé d'un seul chromosome linéaire (2,188,835 pb ; 37.69% teneur en G + C), comme illustré sur la figure 26, les tableau 19 et tableau 20. Et quatre plasmides de taille allant de 1, 095 à 42, 306 pb, y compris un plasmide

circulaire (la taille totale du génome est basée soit sur la taille du génome en paires de bases ou le nombre total de gènes codant pour des protéines dans le génome annoté).

tableau 21). Le chromosome contient 91 ARN prédit dont 5 ARNr (un 16S, un 23S et trois 5S), 45 ARNt, 1 ARNtm, 40 Divers ARN et 2,281 gènes qui codent pour des protéines et qui représentent 1,977,228 pb (87.73% du génome) de codage. Un total de 1,731 gènes (75.88%) ont été affectés d'une fonction putative (par grappes de Orthologous Groupes COG) (Drissi *et al.*, 2015, Stackebrandt *et al.*, 2006) Nous avons constaté que 18.72% des gènes codent pour le stockage d'informations et pour le traitement (J, A, K, L et catégories B), 12.85% ont été impliqués dans les processus cellulaires et de signalisation (D, V, T, M, N, U et catégories O), 27.0% participent dans le métabolisme (C, G, E, F, H, I, P et Q catégories) et 41.39% étaient mal caractérisé (catégories R et S). La répartition des gènes dans les catégories fonctionnelles COGS est présenté sur le tableau 22 et la figure 27.

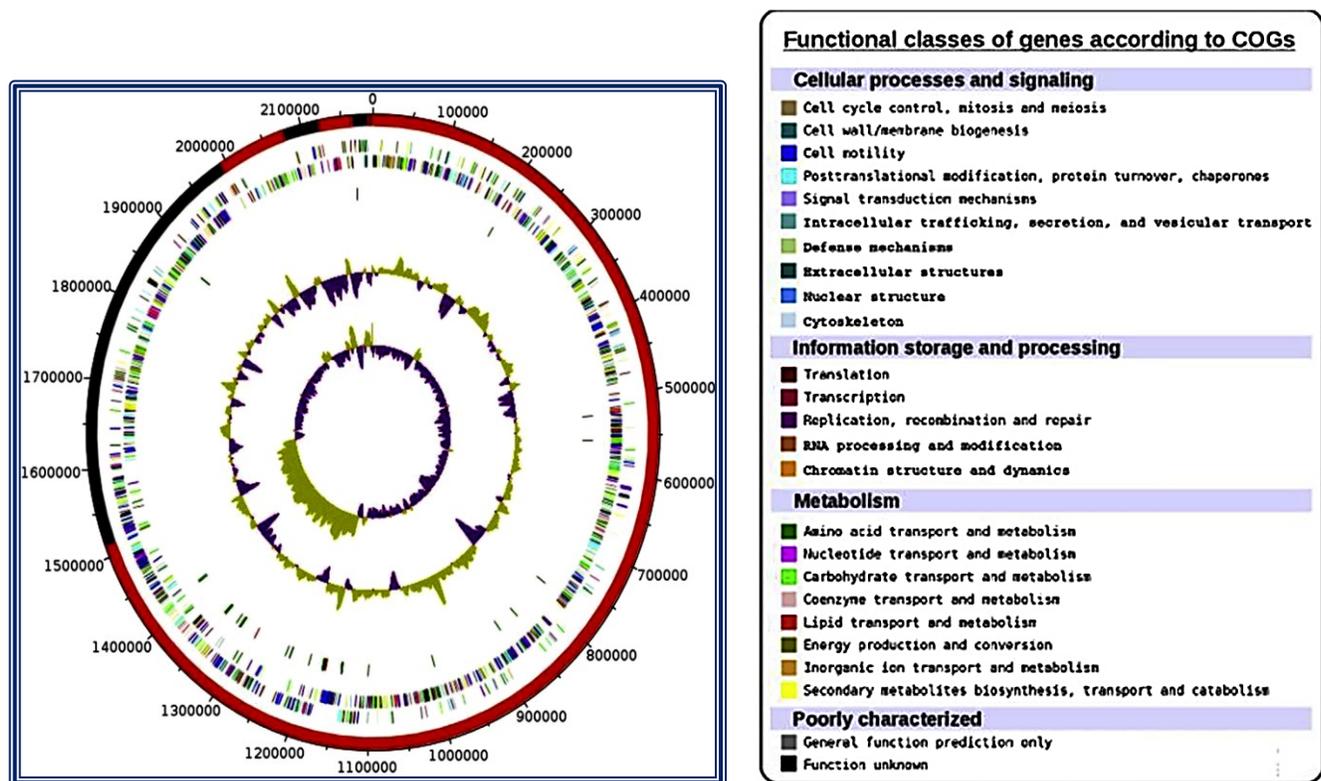


Figure 26: Représentation circulaire du génome de la souche *Lactococcus garvieae* M14. Les cercles de l'extérieur au centre : Les Contigs (rouge/gris), les gènes sont colorés en fonction des catégories déterminées en COGs sur le brin sens et antisens (2 cercles), les ARNr (rouge), l'ARNt (vert), le contenu en GC et le GC skew (vert/move).

Tableau 19: Résumé du génome : un chromosome et quatre plasmides comme indiqué par des astérisques.

Étiquette	Taille (pb)	Topologie	INSDC identifiant
Scaffold01	1,512,971	Inconnu	CCXC01000001
Scaffold02	479,324	Inconnu	CCXC01000002
Scaffold03	84,809	Inconnu	CCXC01000003
Scaffold04	44,684	Inconnu	CCXC01000004
Scaffold05*	42,306	Inconnu	CCXC01000005
Scaffold06	41,917	Inconnu	CCXC01000006
Scaffold07	19,395	Inconnu	CCXC01000007
Scaffold08*	16,485	Inconnu	CCXC01000008
Scaffold09*	4,983	Inconnu	CCXC01000009
Scaffold10	3,261	Inconnu	CCXC01000010
Scaffold11	1,585	Inconnu	CCXC01000011
Scaffold12*	1,095	Inconnu	CCXC01000012
Scaffold13	889	Inconnu	CCXC01000013

Tableau 20: Contenu en nucléotides et le nombre de gènes du génome

Caractère	Valeur	% du total*
Taille du génome (pb)	2,199,835	100.00
La région codante de l'ADN	1,934,957	88.40
Contenu en G+C de l'ADN	877,233	37.79
Total des gènes	2,264	100.00
ARNr	5	0.21
ARNt	45	1.90
ARNtm	1	0.04
ARNmisc	40	1.69
Gènes codants pour des protéines	2,214	97.79
Gènes avec prédiction de fonction	1,651	72.92
Gènes affectés à COGs	1,515	68.42

La taille totale du génome est basée soit sur la taille du génome en paires de bases ou le nombre total de gènes codant pour des protéines dans le génome annoté.

Tableau 21: Contenu en nucléotides et le nombre de gènes des plasmides

Caractère	Valeur	% du total
Taille (pb)	64 869 (42 306 ;16 485 ;4983 ;1095)	100
La region codante de l'ADN (pb)	55 608	85.72
Contenu en G+C de l'ADN (pb)	22 256	34.31
Total des gènes	75	100
ARNr	0	0
Gènes codants pour des protéines	75	100
Gènes ayant une fonction	20	35.09
Prédiction		
Gènes affectés à COGs	10	17.54

COGs : base de données des clusters de Groupes orthologues

La taille Totale du génome plasmidique se fonde soit sur la taille des plasmides (pb) ou le nombre total de gènes codant pour des protéines dans des séquences annotées, Les tailles sont indiquées entre parenthèses.

Tableau 22: Nombre de gènes de *Lactococcus garvieae* M14 associés aux catégories fonctionnelles COG générale et sa comparaison avec *Lactococcus garvieae* YT-3.

Code	Description	<i>L. garvieae</i> M14		<i>L. garvieae</i> YT-3 (% of total)	Différence (in %)
		Value	(% of total)		
J	Traduction , structure et biogenèse des ribosomes	141	6.18	7.27	1.09
A	Le traitement et modification d'ARN	0	0.00	0.00	0.00
K	Transcription	128	5.61	5.66	0.05
L	La réplication , la recombinaison et la réparation	158	6.94	6.00	3.13
B	Structure dynamique de la chromatine	0	0.00	0.00	0.00
D	Le contrôle du cycle cellulaire, la division cellulaire, la séparation des chromosomes	20	0.88	0.83	-0.05
V	Mécanismes de défense	50	2.19	1.56	-0.63
T	Mécanismes de transduction du signal	45	1.97	2.63	0.66
M	Paroi cellulaire / biogenèse de la membrane	106	4.65	4.59	-0.06
N	Motilité cellulaire	7	0.31	0.44	0.13
U	Le trafic, la sécrétion intracellulaire et le transport vésiculaire	19	0.83	1.22	0.39
O	Modification post-traductionnelle , le renouvellement des protéines	46	2.02	2.34	0.32
C	La production et la conversion de l'énergie	63	2.76	3.07	0.31
G	Transports et métabolisme des glucides	171	7.50	6.78	-0.72
E	Le transport et le métabolisme des acides aminés	119	5.22	5.27	0.05
F	Le transport et le métabolisme de nucléotide	69	3.02	3.41	0.39
H	Le transport et le métabolisme de coenzyme	51	2.23	2.63	0.40
I	Le transport et le métabolisme lipidique	44	1.93	2.15	0.22
P	Le transport et le métabolisme d'ions inorganiques	91	3.99	4.44	0.45
Q	Biosynthèse de métabolites secondaires , le transport et le catabolisme	9	0.39	0.88	0.49
R	Prédiction de la fonction générale seulement	196	8.59	9.56	0.97
S	Fonction inconnue	748	32.79	29.27	-3.52

IV.1.2.2.13 Comparaison des génomes

Lorsqu'on compare *L. garvieae* M14 avec neuf espèces de *Lactobacillus* et souches de *Lactococcus* qui ont des séquences d'ARNr 16S semblables, nous avons trouvé que la séquence du génome de *L. garvieae* M14 est inférieure à celle de *Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactococcus lactis* subsp. SK11 cremoris et *Lactococcus lactis* subsp. lactis IL1403 (3,35, 3,01, 2,60 et 2,37 Mb respectivement), mais plus grandes que celles de *Lactobacillus salivarius* UCC118, *Lactobacillus fermentum* IFO 3956, *Lactobacillus ruminis* ATCC 27782 et *Lactobacillus sakei* subsp. sakei 23K (2,13, 2,10, 2,07 et 1,88 Mb respectivement) (tableau 23). La teneur en G + C de *L. garvieae* M14 est plus petite que celles de *L. fermentum* IFO 3956, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* WCFS1, *L. ruminis* subsp ATCC 27782 et *L. sakei* 23K (51,47, 46,69, 44,42, 43,47, 41,26 et 37,69 %, respectivement), mais plus grandes que celles de *L. lactis* subsp. cremoris SK11, *L. lactis* subsp. lactis IL1403 et *L. salivarius* UCC118 (35,78, 35,33 et 33,04, et %, respectivement) (tableau 23). La teneur en gène de *L. garvieae* M14 est plus petite que celles de *L. plantarum* WCFS1, *L. rhamnosus* GG et *L. lactis* subsp. cremoris SK11 (3063, 2944 et 2504 respectivement), mais plus grandes que celles de *L. lactis* subsp. lactis IL1403, *L. salivarius* UCC118, *L. sakei* subsp. sakei 23K, *L. ruminis* ATCC 27782 et *L. fermentum* IFO 3956 (2277, 2014, 1885, 1862 et 1843 respectivement) (tableau 23).

Les dix génomes étudiés ont une moyenne de 2.187 gènes et partagent 478 gènes en commun. La distribution des gènes dans des catégories COG n'était pas tout à fait similaire dans tous les génomes comparés (figure 27). *L. rhamnosus* GG et *L. garvieae* M14 ont le plus grand nombre de gènes impliqués dans les mécanismes de défense (63 et 49 gènes, respectivement), comparativement aux autres génomes analysés (37 gènes en moyenne). *L. garvieae* M14 possède un nombre important de gènes intervenant dans le transport et le métabolisme des hydrates de carbone (170 gènes), mais moins important que ceux de *L. plantarum* WCFS1 et *L. rhamnosus* GG (267 et 263 gènes respectivement). En outre, *L. garvieae* M14 possède 124 gènes participant à la biogenèse de la paroi cellulaire, la membrane et l'enveloppe, alors que la moyenne est de 87 gènes dans les autres génomes étudiés.

Tableau 23: Caractéristiques générales des génomes.

Souches	Taille (Mb)	Pourcentage (G+C)	Contenu en gènes
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	3.35	44.42	3,063
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	3.01	46.69	2,44
<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i> SK11	2.60	35.78	2,504
<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> II 403	2.37	35.33	2,277
<i>Lactococcus garvieae</i> M14	2.17	37.79	2,214
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC 118	2.13	33.04	2,014
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO	2.10	51.47	1,943
<i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC 27782	2.07	43.47	1,862
<i>Lactococcus garvieae</i> Lg2	1.96	38.76	1, 968
<i>Lactococcus garvieae</i> YT-3	1.95	38.83	1,947
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. Sakei 23K	1.88	41.26	1,885

Sur la base de ces données génomiques, la séquence du génome du projet de *L. garvieae* YT-3 semble être la plus proche de la souche M14 entre tous les génomes comparés. *L. garvieae* YT-3 a une taille plus petite et une teneur légèrement plus élevée en G + C de *L. garvieae* M14 (1,095 Mb par rapport à 2,253 Mb et 38,83% par rapport à 37,69%, respectivement) (tableau 23). Le ratio de gènes par Mb était très semblable entre les génomes (1,025 par rapport à 1,013 gènes / Mo pour *L. garvieae* YT-3 et la souche M14, respectivement). La proportion de nombre de gènes (en pourcentage) liés à chacune des catégories COG était similaire entre *L. garvieae* M14 et *L. garvieae* YT-3 (tableau 22). Les principales disparités étaient liées à «fonction inconnue» avec 3,52% et «réplication, la recombinaison et la réparation" avec 3,13%. *L. garvieae* YT-3 et la souche M14 partagent le plus grand nombre de paires d'orthologues (1 213) et le plus haut score de similarité calculé au niveau nucléotidique (0,94) chez les génomes comparés (tableau 22). Ces données confirment que la souche M14 est une espèce de *Lactococcus garvieae*. Contrairement à *L. garvieae* YT-3, la souche *L. garvieae* M14 possèdent des plasmides dont les séquences ont été étroitement liés à la souche *L. garvieae* 21881 plasmide pGL5, la souche *L. garvieae* IPLA31405 plasmide pIG42, *L. lactis* plasmide pSRQ900 et *L. lactis* souche MJC15 plasmide pCD4.

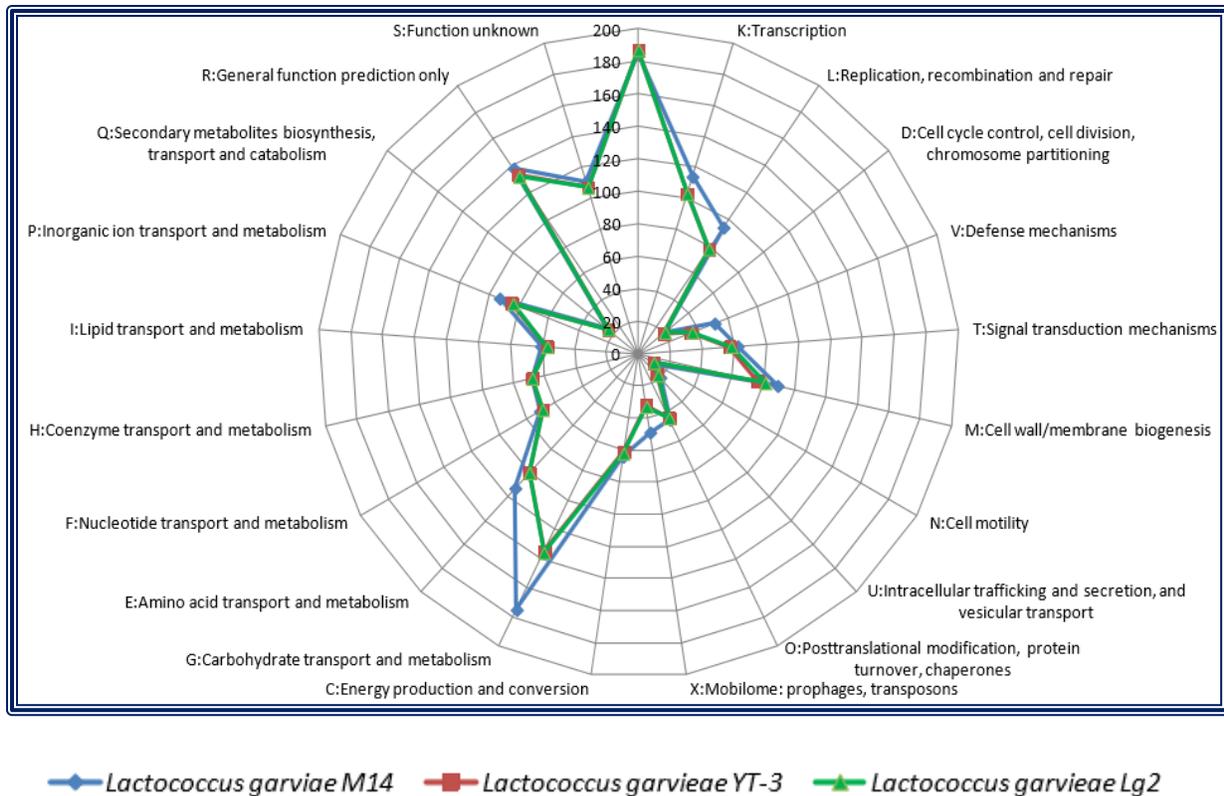


Figure 27: Classification fonctionnelle des gènes codés par *Lactococcus garvieae* M14 et sa comparaison avec *Lactococcus garvieae* YT-3 et *Lactococcus garvieae* Lg2. Les séquences codantes pour des protéines sont classées selon les catégories COGS.

IV.1.2.2.14 Connaissances étendues

IV.1.2.2.15 Métabolisme énergétique et transporteurs

Le CDS annoté par la base de données COG a révélé autant que 7,5% des génomes correspondant à des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des hydrates de carbone. Comme toutes les souches homofermentaires obligatoires, *L. garvieae* M14 a été jugé posséder la fructose-bisphosphate aldolase (CE 4.1.2.13) dans son génome, qui est une enzyme clé de la voie de la glycolyse, alors qu'il manque l'enzyme de phosphocétolase (EC 4.1.2.9) de la voie des pentoses phosphates, présente seulement dans les génomes des bactéries hétérofermentaires. Tous les gènes requis pour la dégradation du glucose en pyruvate sont présents dans le génome, de même que le gène du lactate déshydrogénase qui permet la conversion du pyruvate en acide lactique. Plusieurs enzymes qui agissent sur le pyruvate, y compris les α -acétolactate synthase, le pyruvate formiate -lyase, le lactate déshydrogénase et le pyruvate oxydase, ont également été identifiés dans le génome de la souche M14. En outre, l'examen du génome indique que certaines

enzymes nécessaires pour le cycle complet du citrate et pour la néoglucogenèse sont manquantes. PTS systèmes de fructose, le galactose, le mannose, le maltose, le lactose, le saccharose, le tréhalose, le mannitol et le cellobiose étaient présents dans le génome, alors que les systèmes PTS pour la xylose, le ribose et le gluconate étant absents. Basé sur son profil métabolique, *L. garvieae* M14 produit de l'acide lactique à partir principalement d'hexoses, en utilisant la glycolyse. Cette capacité de fermentation homolactique est très utile pour des applications industrielles.

IV.1.2.2.16 Résultats de l'approche protéomique

On a étudié la cinétique de croissance de la souche *Lactococcus garvieae* M14 pour déterminer à qu'elle heure elle va atteindre la fin de la phase exponentielle (phase de production des bactériocines) et on a trouvé qu'elle l'atteint après 6 h comme montré ci- dessous (tableau 24, figure 28).

Tableau 24: Densité optique (D.O) en fonction du temps de la souche *Lactococcus garvieae* M14.

	Temps (h)										
	0	2	4	6	20	22	24	26	28	30	46.3
D.O 1	0.04	0.17	1.50	2.47	2.62	2.90	2.87	2.86	2.69	2.43	2.15
D.O 2	0.08	0.56	1.05	1.13	1.25	1.42	1.36	1.35	1.28	1.19	0.96

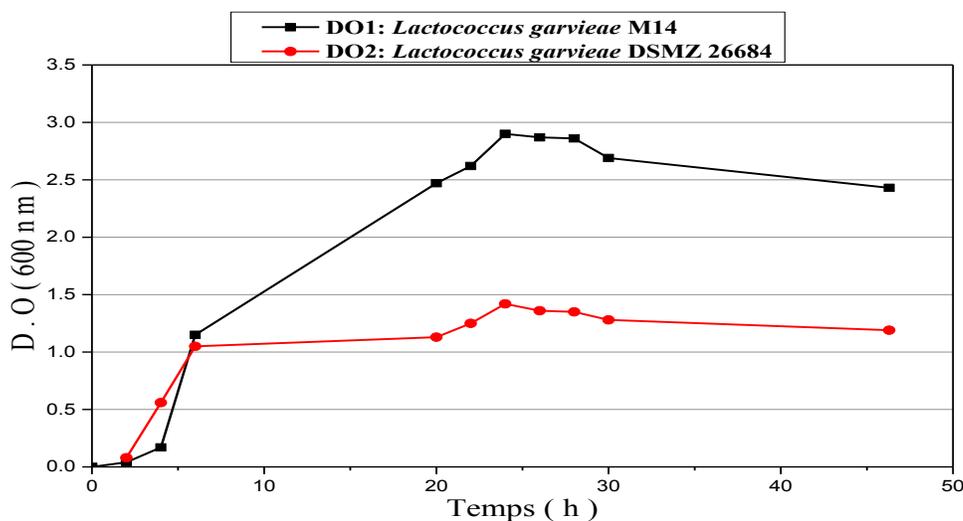


Figure28 : Courbe de croissance de la souche *L. garvieae* M14 en fonction du temps.

En plus de la souche *Lactococcus garvieae* M14, on a étudié la croissance d'une souche de référence qui est *Lactococcus garvieae* DSMZ 20684

IV.1.2.2.17 Résultat de l'électrophorèse SDS page

Suite à une migration des échantillons (culot et surnageant issus d'une culture de nuit de la souche *Lactococcus garvieae* M14 sur milieu de culture M17 (figure 14) et migration d'un échantillon de ce milieu de culture sans inoculum bactérien) sur gels SDS-PAGE, le résultat obtenu est présenté sur la figure 28.

On a constaté une présence abondante des protéines dans le culot, le surnageant contient quelques bandes de protéines et pour le milieu de culture (M17), la bande qui apparait correspond aux peptones (protéines) contenu dans ce milieu.

En utilisant la spectrométrie de masse (autoflex), on a pu identifier les protéines suivantes : la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, un régulateur transcriptionnel, une protéine hypothétique, une 50S protéine ribosomique L7/ L12, une rhamnose isomérase, une protéine de liaison à la chitine et une transglycosylase (tableau 25).

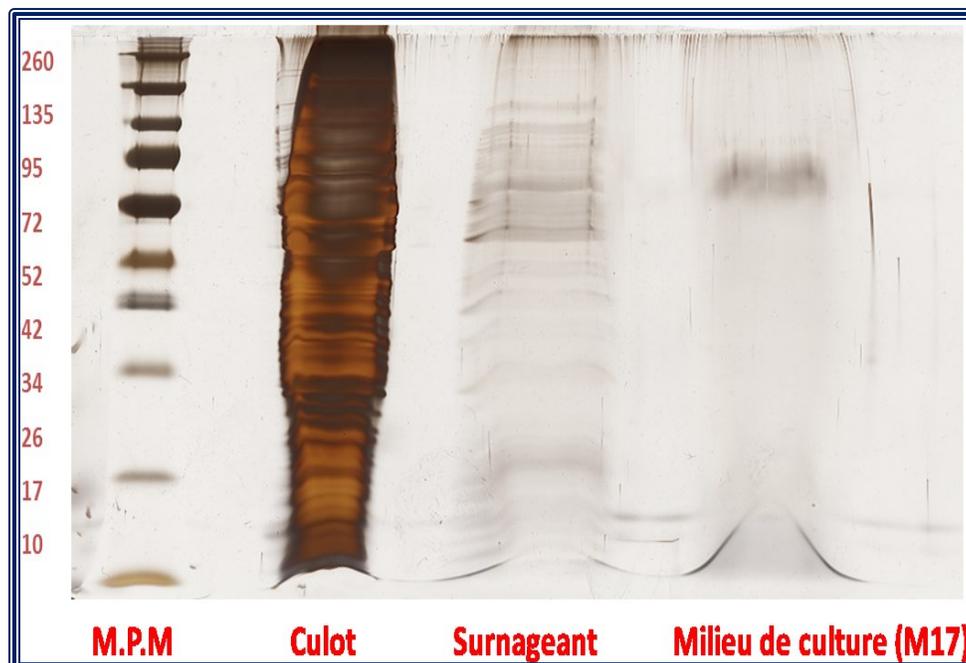


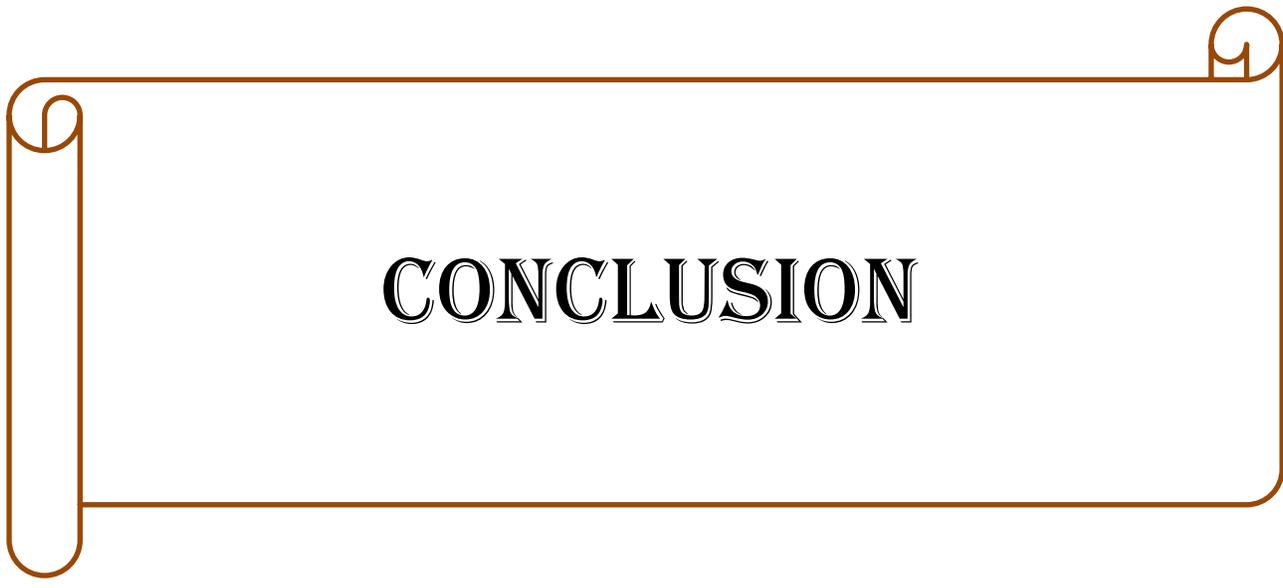
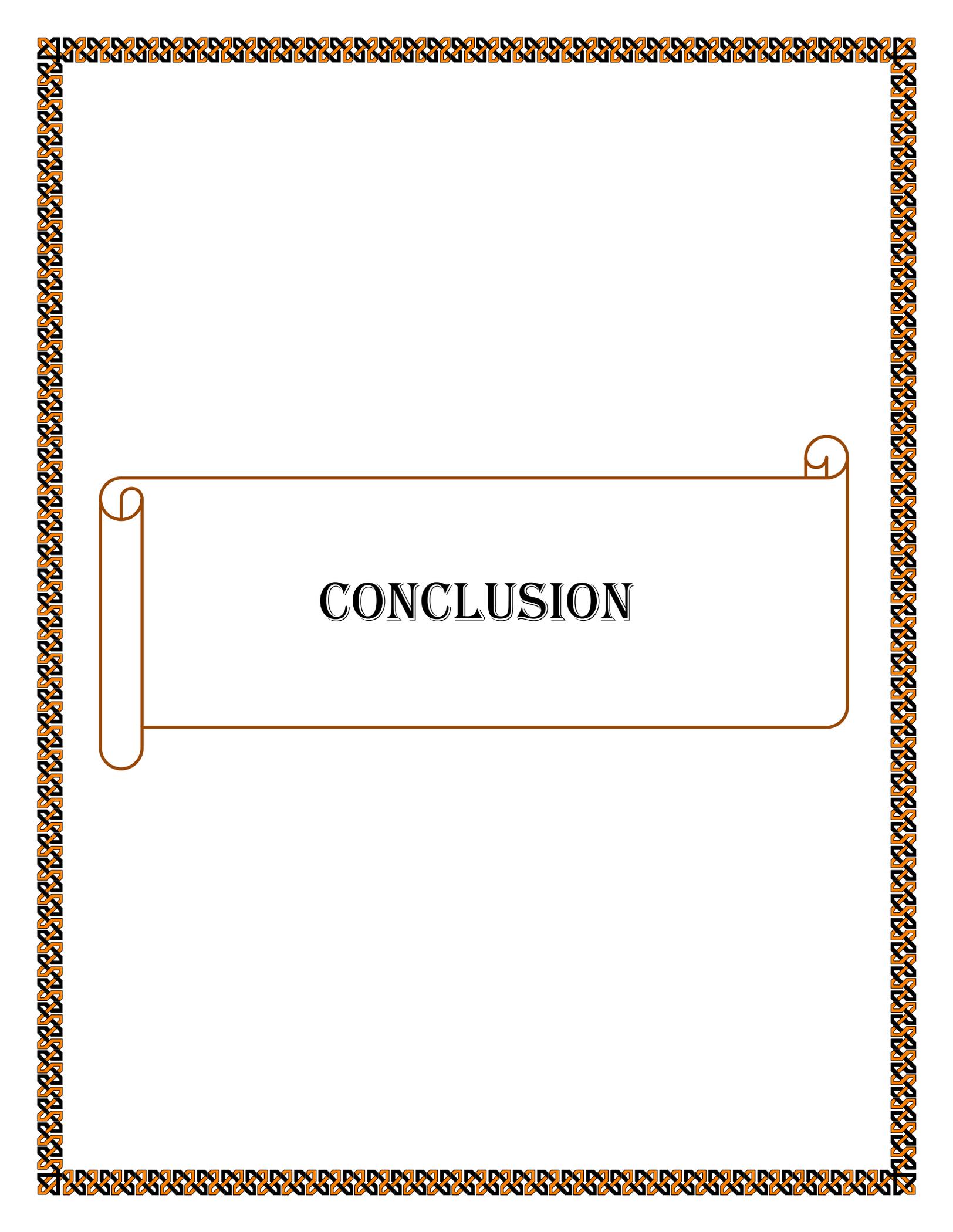
Figure 28: Résultat de l' SDS page de la souche *Lactococcus garvieae* M14.

IV.1.2.2.18 Mécanismes de défense de *Lactococcus garvieae* M14

Nous avons identifié dans le génome de *L. garvieae* M14 des protéines impliquées dans des caractéristiques de défense, y compris une protéine de résistance à des antibiotiques glycopeptidiques et deux bactériocines qui sont localisés dans le chromosome. La première bactériocine a une longueur de 64 aa et l'utilisation de la base de données BUR permis d'identifier une séquence très similaire dans les génomes de souches de *L. garvieae* YT-3, Lg2 et TRF1. Ces séquences ont déjà été annotées comme codantes pour des protéines hypothétiques dans les génomes de souches de *L. garvieae* YT-3 et Lg2. La deuxième bactériocine a une longueur de 184 aa et correspond à une colicine V, également trouvé dans le génome de la souche Lg2. La Garviecin L1-5 a été la première bactériocine détecté dans une souche de *Lactococcus garvieae* (Villani *et al.*, 2001). Elle a été montré pour inhiber la croissance d'espèces relativement étroitement apparentées à la souche productrice, mais aussi de l'agent pathogène humain *Listeria monocytogenes.*, la production de bactériocines donne aux souches *L. garvieae* un avantage concurrentiel au sein de leur environnement, leur permettant d'inhiber directement d'autres bactéries pathogènes et de prolifération.

Tableau 25: identification des protéines du culot de la souche *Lactococcus garvieae* M14 par la spectrométrie de masse (Autoflex)

Echantillon		Code d'accès	Description
23-07_dessalage	Yellow	WP_003133076.1	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_dessalage_2		WP_003133076.1	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07		WP_003133076.1	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_2		WP_003133076.1	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_dessalage	Orange	WP_003133973.1	Régulateur transcriptionnel [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_dessalage_2		WP_003133973.1	Régulateur transcriptionnel [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_2		WP_003133973.1	Régulateur transcriptionnel [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_2	Green	WP_003134436.1	Protéine hypothétique [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_dessalage	Grey	WP_003134887.1	Protéine hypothétique [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_dessalage_2		WP_003134887.1	Protéine hypothétique [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_dessalage_2	Pink	WP_003136137.1	Protéine hypothétique [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07	Orange	WP_004257497.1	50S Protéine ribosomique L7/L12 [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_2		WP_004257497.1	50S Protéine ribosomique L7/L12 [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_dessalage_2	Blue	WP_014024916.1	Protéine hypothétique [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_dessalage	Red	WP_014025170.1	Protéine hypothétique [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_dessalage_2		WP_014025170.1	Protéine hypothétique [<i>Lactococcus garvieae</i>]
30-07_2	Dark Blue	WP_017370317.1	Rhamnose isomérase [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_dessalage	Dark Red	WP_019291477.1	Protéine hypothétique [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_dessalage_2		WP_019291477.1	Protéine hypothétique [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07	Light Grey	WP_019291691.1	Protéine fixatrice à la chitine [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_2	Dark Purple	WP_019292725.1	Transglycosylase [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_dessalage	Light Green	WP_019335881.1	Protéine fixatrice à la chitine [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_dessalage_2		WP_019335881.1	Protéine fixatrice à la chitine [<i>Lactococcus garvieae</i>]
23-07_2		WP_019335881.1	Protéine fixatrice à la chitine [<i>Lactococcus garvieae</i>]



CONCLUSION

CONCLUSION

Les bactéries lactiques sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (Stiles *et al.*, 1997). Elles sont principalement utilisées dans les produits fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation des aliments. Le rôle de choix qu'occupent les bactéries lactiques dans la fermentation et dans la bio-préservation des aliments est la conséquence directe de leur capacité à produire au cours de leur croissance de l'acide lactique, qui réduit le pH de l'aliment et inhibe directement le développement de plusieurs microorganismes. En plus de l'acide lactique, ces bactéries produisent d'autres métabolites à action bactériostatique ou bactéricide. Ces métabolites regroupent l'acide acétique, le dioxyde de carbone, le diacétyle, la rutérine, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines.

Ce travail de thèse qui entre dans le cadre de la sélection des bactéries lactiques productrices de bactériocines isolées des échantillons de lait fermentés de façon artisanale collectés de la ville de Guelma avait plusieurs objectifs. Le premier était une étude physicochimique et microbiologique des différents échantillons de lait. Les résultats de l'analyse physicochimique ont montrés que pour tous les échantillons de lait analysés, le pH se situe entre 6.67 et 6.9 avec une moyenne de 6.65. L'acidité Dornic varie entre 11.60°D et 17.15°D. Pour l'analyse microbiologique et en ce qui concerne la flore non lactique, on a remarqué une absence totale des germes pathogènes et ceci peut être dû aux bonnes pratiques d'échantillonnage.

En ce qui concerne la flore lactique, on a isolé et identifié 47 souches (28 *Lactococcus lactis*, 15 *Enterococcus faecium*, 3 *Enterococcus faecalis* et une souche *Lactococcus garvieae* M14). Cette étude a montré que l'identification fiable des isolats lactiques a nécessité l'utilisation d'une approche poly-phasique incluant des techniques phénotypique, biochimique et moléculaires de pointes et des logiciels bio-informatiques utilisant de larges bases de données.

La recherche de l'activité antimicrobienne dans des conditions qui éliminent l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène a permis de cribler une seule souche bactériocinogène qui est *Lactococcus garvieae* M14. De plus, ont a étudié cette activité sur des souches du genre *Lactobacillus*, récupérées de la soucheterie du laboratoire de la timone, après

confirmation de leur pureté par Maldi Tof et ces dernières ont montré des activités antibactériennes.

L'importance de la souche M14 nous a poussée à étudier son génome et de passer par une approche protéomique pour identifier ces protéines totales et ses bactériocines.

Les résultats ont montré que le génome de *L. garvieae* M14 comporte deux bactériocines qui sont localisés dans le chromosome. La première bactériocine a une longueur de 64 aa et la deuxième de 184 aa

Pour la recherche des protéines totales, on a effectué les étapes suivantes : une digestion typique des protéines par le tampon CHAPS à 1 % suivit d'une électrophorèse SDS page pour s'assurer de la bonne digestion des protéines et une coloration par l'argent puis une révélation des protéines par le western Blot et finalement une identification des protéines totales par l'autoflex (MALDI-TOF).

Comme perspectives, L'étude des bactériocines dirigées contre des souches pathogènes, pourrait aboutir à leur utilisation comme agents naturels pour une meilleure conservation des produits alimentaires fermentés. Cette application, en cours avec la nisine, doit être développée par l'apport de nouvelles bactériocines. Une meilleure compréhension de leurs propriétés physiques et chimiques, de leur production et de leur mode d'action est nécessaire afin d'optimiser cette utilisation. C'est pour cette raison que nous recommandons :

- L'optimisation des conditions de production des deux Bactériocines identifiées chez la souche *Lactococcus garvieae* M14.
- La purification de ces biomolécules.
- Estimation de leurs poids moléculaire.
- Étudier leur spectre d'action sur une gamme beaucoup plus large de germes pathogènes.
- La détermination des caractéristiques biochimiques et microbiologiques des deux bactériocines produites par cette souche.

RÉSUMÉ

Les bactéries lactiques jouent un rôle de premier plan dans la fabrication de produits alimentaires fermentés. Elles contribuent à l'amélioration du goût, de l'aspect et de l'innocuité microbiologique de l'aliment. Ces bactéries produisent en effet une variété de composés à action antimicrobienne tels les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocines.

Dans le présent travail, une collection de souches lactiques a été établie, elle comprend 50 souches isolées à partir de 44 échantillons de produits laitiers fermentés de façon artisanale et identifiées sur la base d'un certain nombre de caractères phénotypique, physiologique, biochimique (API 50 CHL) et moléculaire (MALDI-TOF MS).

Sur un total de 50 souches testées pour leurs activités antimicrobienne par les deux méthodes ; de double couche et celles de diffusion en gélose, 10 sont confirmées productrices de substances antimicrobiennes. Cependant, la recherche de l'activité antimicrobienne dans des conditions qui éliminent l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène a permis de cribler une seule souche bactériocinogène qui est *Lactococcus garvieae* M14.

Le génome de *L. garvieae* M14 est constitué d'un seul chromosome linéaire (2, 188,835pb) avec une teneur en G + C % de 37.69 et quatre plasmides dont la taille varie de 1, 095 à 42, 306 pb, dont un plasmide circulaire.

D'autres analyses du génome de la souche M14 ont révélé une capacité métabolique pour former l'acide lactique au cours de la fermentation qui est très utile pour des applications industrielles, ainsi que la présence de deux bactériocines responsables d'éventuelles propriétés bio-protectrices, nous avons identifié dans le génome de *L. garvieae* M14 deux bactériocines qui sont localisés dans le chromosome. La première bactériocine a une longueur de 64 aa et la deuxième de 184 aa et correspond à une colicine V.

MOTS CLÉS : Lait fermenté, Bactéries lactiques, antagonisme, MALDI-TOFF MS, Séquençage du génome, Protéomique.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria play a leading role in the production of fermented food products. They contribute to improving the taste, appearance and the microbiological safety of the food. Indeed these bacteria produce a variety of antimicrobial compounds such as organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl and bacteriocins

In the present work, a collection of lactic strains has been established, it includes 50 strains isolated from 44 samples of fermented dairy products handcrafted and identified on the basis of a number of phenotypic characters, physiological, biochemical (API 50 CHL) and molecular (MALDI-TOF MS).

From 50 strains tested for their antimicrobial activities by the two methods; Double layer and those of agar diffusion, 10 are confirmed producing antimicrobial substances. However, research of the antimicrobial activity under conditions that eliminate the effect of organic acids and hydrogen peroxide allowed to screen one bacteriocinogène strain which is *Lactococcus garvieae* M14.

The genome of *L.garvieae* M14 consists of a single linear chromosome (2,188,835 bp) with a G + C content of 37.69% and four plasmids ranging in size from 1.095 to 42.306 bp, including a circular plasmid.

Further analysis of the genome of the M14 strain revealed a metabolic capacity to form the acid during the fermentation, which is very useful for industrial applications, as well as the presence of two bacteriocins responsible for eventual bio-protective properties. We have identified, in the genome of *L. garvieae* M14, two bacteriocins which are localized in the chromosome. The first bacteriocin has a length of 64 aa and 184 aa for the second one and corresponds to a colicin V.

KEY WORDS: FERMENTED MILK, LACTIC ACID BACTERIA, ANTAGONISM, MALDI-TOF MS, GENOME SEQUENCING, PROTEOMICS.

الملخص

تلعب بكتيريا حمض اللبن دورا اوليا في الحصول على المنتجات الغذائية المخمرة. لأنها تساهم في تحسين الطعم، المظهر والسلامة الميكروبيولوجية للأغذية. في الواقع، تنتج هذه البكتيريا مجموعة متنوعة من المركبات المضادة للجراثيم مثل الاحماض العضوية ، ثنائي اكسيد الهيدروجين ثنائي الأسيطيل والبكتيري وسينات.

في هذا العمل، تم تأسيس مجموعة من سلالات بكتيريا حمض اللبن وتتضمن 50 سلالة معزولة من 44 عينة من منتجات الالبان المخمرة بطريقة تقليدية والتي تم تحديدها بناء على عدد من الخصائص المورفولوجيا، الفيزيولوجية، البيوكيماوية (API50CHL) والجزئية (MALDI TOF) (MS).

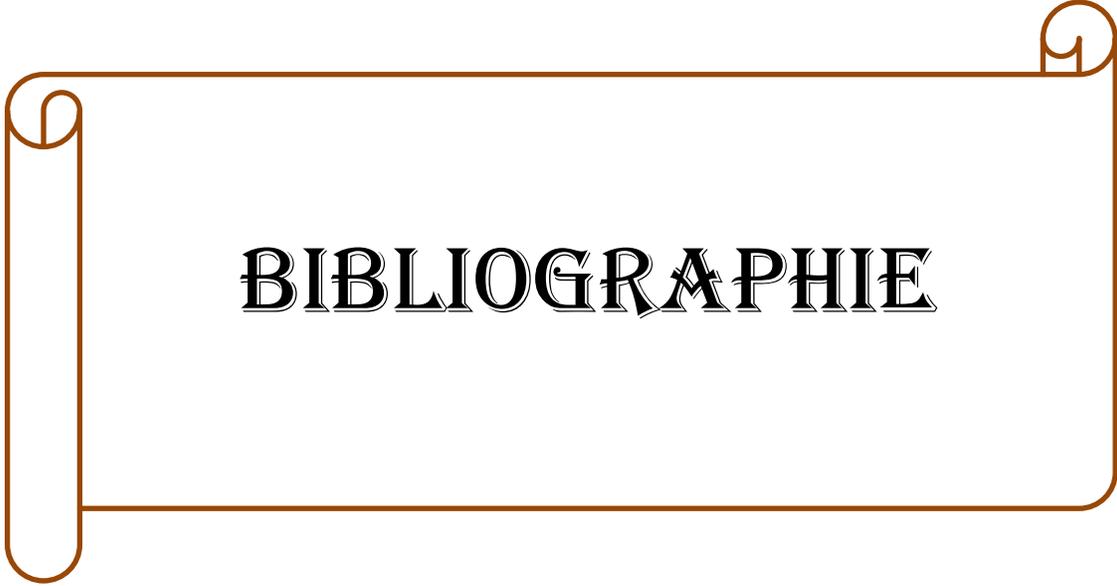
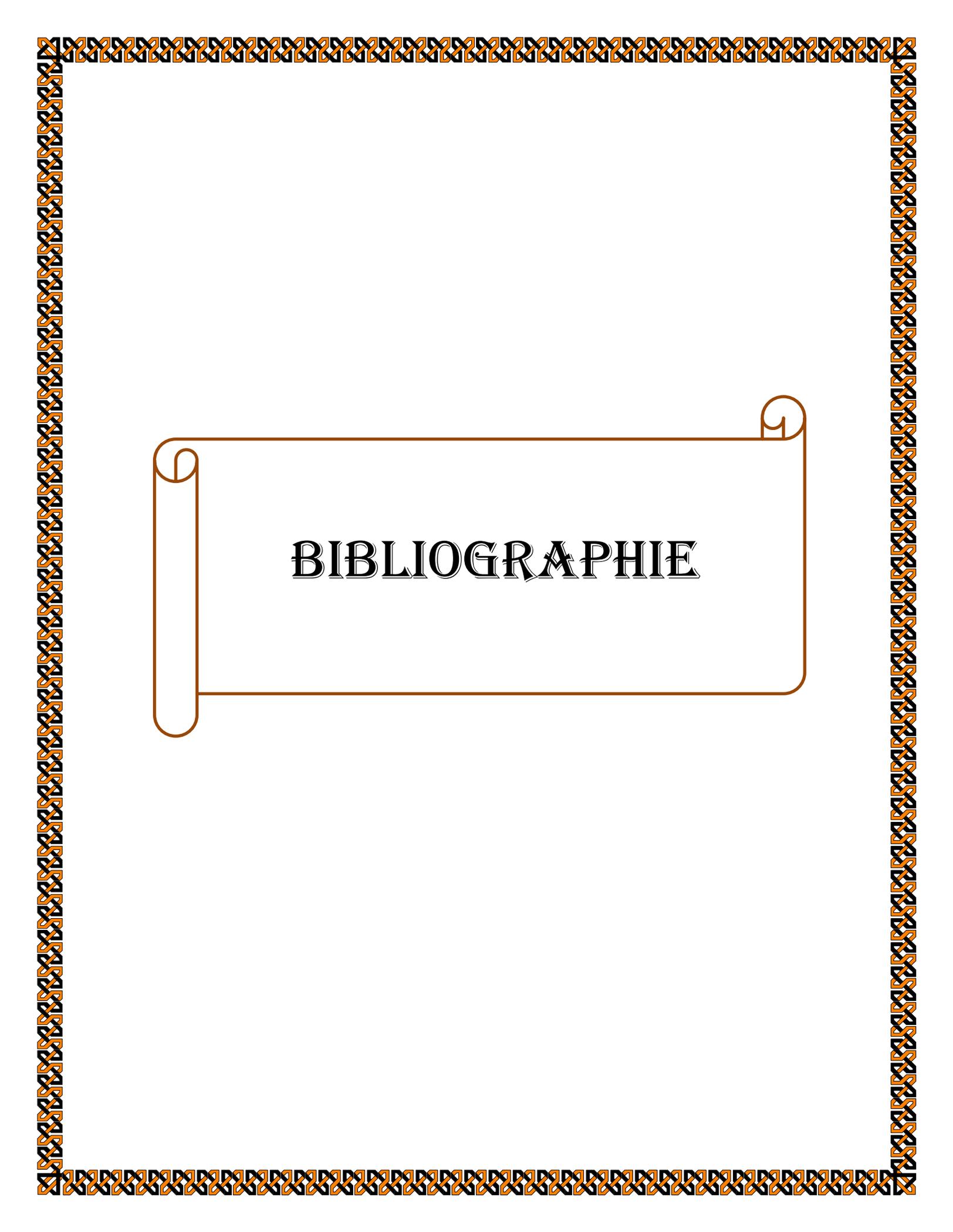
من مجموع 50 سلالة تم اختبارها بحثا عن النشاط المضاد للبكتيريا وباستعمال الطريقتين: ثنائية الطبقة والانتشار على الجلوز، 10 سلالات اثبتت انتاجها للمواد ذات التأثير الضدية على البكتيريا الضارة في حين، سمح البحث عن النشاط الضدية تحت شروط تخلو من تأثير الاحماض العضوية ثنائي اكسيد الهيدروجين، بانتقاء سلالة واحدة منتجة للبكتيري وسينات وهي: *Lactococcus garvieae* M14

يتكون المجموع المورثي لـ *Lactococcus garvieae* M14 من صبغي واحد خطي 2,188,835bp يضم على 37.69 % من محتوى G+C وعلى اربع بلاسميدات تتراوح احجامها من 1.095 إلى 42.306 bp ومنه بلاسميد دائري .

ولقد كشفت المزيد من تحاليل المجموع المورثي للسلالة M14 على القدرة الايضية لتشكيل الحمض خلال التخمير والذي يعتبرها جدا للتطبيقات الصناعية، فضلا عن وجود اثنين من البكتيريوسينات المسؤولة عن الخصائص الحيوية الواقية والمتواجدة في الصبغي. يبلغ طول البكتيريوسين الاولى 64 الف والثاني 184 الف وهو كوليسين V.

الكلمات المفتاحية: الالبان المخمرة، بكتيريا حمض اللبن، العداء، التحليل الطيفي الشامل،

تسلسل المجموع المورثي ، البروتيوميات.



BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- ABABSA A. 2012. *RECHERCHE DE BACTÉRIOCINES PRODUITES PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES DU LAIT*. MÉMOIRE DE MAGISTER, UNIVERSITÉ FERHAT ABBAS DE SÉTIF 1.
- AGUILAR-GALVEZ A., DUBOIS-DAUPHIN R., DESTAIN J., CAMPOS D., THONART P., 2012. *LES ENTÉROCOQUES : AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS EN BIOTECHNOLOGIE (SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE)*. BIOTECHNOL. AGRON. SOC. ENVIRON., 16(1): P. 67-76.
- ALTSCHUL S., MADDEN T., SCHÄFFER A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D., 1997. *GAPPED BLAST AND PSI-BLAST : A NEW GENERATION OF PROTEIN DATABASE SEARCH PROGRAMS*. NUCLEIC ACIDS RES. , 25(17): P. 3389-3402.
- AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, 1889. *BACTERIA IN MILK AND ITS PRODUCTS*. SCIENCE, 14(341): P. 116-118.
- AMMOR M.S. 2004. *ECOSYSTÈME MICROBIEN D'UN ATELIER FERMIER DE SALAISON : IDENTIFICATION ET PROPRIÉTÉS DES BACTÉRIES LACTIQUES*. THÈSE DE DOCTORAT, RENNES 1, 125.
- ANDRIAMAHERY É. 2010. *ANALYSE DU MICROBIOTE DU LAIT PAR LES MÉTHODES MOLÉCULAIRES*. THÈSE DE DOCTORAT, UNIVERSITÉ LAVAL 155.
- ANGELAKIS E., MILLION M., HENRY M., RAOUL D., 2011. *RAPID AND ACCURATE BACTERIAL IDENTIFICATION IN PROBIOTICS AND YOGHURTS BY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY*. JOURNAL OF FOOD SCIENCE, 76(8): P. M568-572.
- AQUILANTIA L., SANTARELLIA S., SILVESTRIA G., OSIMANIA A., PETRUZZELLIB A., 2007. *THE MICROBIAL ECOLOGY OF A TYPICAL ITALIAN SALAMI DURING ITS NATURAL FERMENTATION*. INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, 120(1-2): P. 136-45.
- AROUS S., DALET K., HÉCHARD Y., 2004. *INVOLVEMENT OF THE MPO OPERON IN RESISTANCE TO CLASS IIA BACTERIOCINS IN LISTERIA MONOCYTOGENES*. FEMS MICROBIOL LETT. , 238(1): P. 37-41.
- ASLIM B., YUKSEKDAG Z.N., SARIKAYA E., BEYATLI Y., 2005. *DETERMINATION OF THE BACTERIOCIN-LIKE SUBSTANCES PRODUCED BY SOME LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM TURKISH DAIRY PRODUCTS*. LWT - FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 38(6): P. 691-694.
- AXELSSON L. 2004. *LACTIC ACID BACTERIA: CLASSIFICATION AND PHYSIOLOGY*. . IN: S. SALMINEN, VON WRIGHT, A., OUWEHAND, A.C. (ED.) *LACTIC ACID BACTERIA MICROBIOLOGY AND FUNCTIONAL ASPECTS. 3RD EDITION*.: MARCEL DEKKER INC; NEW YORK.
- AYAD E.H.E., NASHAT S., EL-SADEK N., METWALY H., EL-SODA M., 2004. *SELECTION OF WILD LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM TRADITIONAL*

- EGYPTIAN DAIRY PRODUCTS ACCORDING TO PRODUCTION AND TECHNOLOGICAL CRITERIA*. FOOD MICROBIOLOGY, 21(6): P. 715-725.
- BAHLOUL A., DJABOU F.Z. 2012. *SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES MÉTHODES UTILISÉES POUR LA CONSERVATION DES SOUCHES LACTIQUES*. LICENCE, UNIVERSITÉ KASDI MERBAH OUERGLA, 30.
- BANKEVICH A., NURK S., ANTIPOV D, GUREVICH, A.A., DVORKIN, M., KULIKOV, A.S., LESIN, V.M., NIKOLENKO, S.I., PHAM, S., PRJIBELSKI, A.D., PYSHKIN, A.V., SIROTKIN, A.V., VYAHHI, N., TESLER, G., ALEKSEYEV, M.A., PEVZNER, P.A., 2012. *SPADES: A NEW GENOME ASSEMBLY ALGORITHM AND ITS APPLICATIONS TO SINGLE-CELL SEQUENCING*. J COMPUT BIOL., 19(5): P. 455-477.
- BARIZ K. 2009. *ETUDE DE LA MICROFLORE DU LAIT FERMENTÉ TRADITIONNEL (IGHI), RECHERCHE DE SOUCHES DE BACTÉRIES LACTIQUES PRODUCTRICES DE BACTÉRIOCINES*. MÉMOIRE DE MAGISTER, UNIVERSITÉ MOULOUD MAAMERI DE TIZI OUZOU, 82.
- BAUER R., DICKS L., 2005. *MODE OF ACTION OF LIPID II-TARGETING LANTIBIOTICS*. INT J FOOD MICROBIOL. , 101(2): P. 201-216.
- BÉAL C., SODINI I., 2016. *FABRICATION DES YAOURTS ET DES LAITS FERMENTÉS. TECHNIQUES DE L'INGÉNIEUR FILIÈRE DE PRODUCTION: PRODUITS D'ORIGINE ANIMALE, BASE DOCUMENTAIRE : TIB432DUO.(REF. ARTICLE : F6315): P.*
- BEKHOUCHE F. 2006. *BACTÉRIES LACTIQUES DU LAIT CRU DE VACHE ET MICROORGANISMES PECTINOLYTIQUES DES OLIVES NOIRES ET VERTES : 1. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE. 2. EVALUATION ET OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'ENZYME POLYGALACTURONASE* THÈSE DE DOCTORAT, UNIVERSITE DE MENTOURI CONSTANTINE 149.
- BENECH R.O., KHEADR E.E., LACROIX C., FLISS I., 2002. *ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF NISIN Z ENCAPSULATED IN LIPOSOMES OR PRODUCED IN SITU BY MIXED CULTURE DURING CHEDDAR CHEESE RIPENING*. APPL ENVIRON MICROBIOL., 68(11): P. 5607-5619.
- BENKERROUM N., TAMIME A.Y., 2004. *TECHNOLOGY TRANSFER OF SOME MOROCCAN TRADITIONAL DAIRY PRODUCTS (LBEN, JBEN AND SMEN) TO SMALL INDUSTRIAL SCALE*. FOOD MICROBIOLOGY, 21(4): P. 399-413.
- BERNBOM N., LICHT T.R., BROGREN C.H., JELLE B., JOHANSEN A.H., BADIOLA I., VOGENSEN F.K., NØRRUNG B., 2006. *EFFECTS OF LACTOCOCCUS LACTIS ON COMPOSITION OF INTESTINAL MICROBIOTA : ROLE OF NISIN*. APPL ENVIRON MICROBIOL. , 72(1): P. 239-244.
- BHARDWAJ A., MALIK R.K., CHAUHAN P., 2008. *FUNCTIONAL AND SAFETY ASPECTS OF ENTEROCOCCI IN DAIRY FOODS*. INDIAN J MICROBIOL. , 48(3): P. 317-325.
- BOETZER M., PIROVANO W., 2012. *TOWARD ALMOST CLOSED GENOMES WITH GAPFILLER*. GENOME BIOLOGY, 13(6): P. R56-R56.

- BOETZER M., HENKEL C.V., JANSEN H.J., BUTLER D., PIROVANO W., 2011. *SCAFFOLDING PRE-ASSEMBLED CONTIGS USING SSPACE*. *BIOINFORMATICS*, 27(4): P. 578-579.
- BOURGEOIS C.M., LEVEAU J.Y., 1980. *TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTROLE DANS LES INDUSTRIES AGRO-ALIMENTAIRES- LE CONTROLE MICROBIOLOGIQUE : TECHNIQUES ET DOCUMENTATIONS VOL. 3*. APRIA ED., ED. VOL. PARIS.
- BOURGEOIS C.M., LEVEAU J.Y., 1991. *TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLE DANS LES INDUSTRIES AGRO-ALIMENTAIRES : LE CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE*. 2ÈME ÉDITI ED. COLLECTION SCIENCES ET TECHNIQUES AGRO-ALIMENTAIRES, ED. VOL. 3. PARIS: LAVOISIER TEC & DOC.
- BOURGEOIS C.M., LARPENT J.P., 1996. *MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE TOME 2: ALIMENTS FERMENTÉS ET FERMENTATIONS ALIMENTAIRES*. ED. SCIENCES ET TECHNIQUES AGROALIMENTAIRES, ED. VOL.: ÉDITIONS TEC ET DOC / LAVOISIER.
- BRANGER A., RICHER M.M., ROUSTEL, S., 2007. *MICROCHIMIE ET ALIMENTATION*. EDIT EDUCA ED., ED. VOL. PARIS: EDUCAGRI EDITION.
- CAMACHO C., COULOURIS G., AVAGYAN V., MA N., PAPADOPOULOS J., BEALER K., MADDEN T.L., 2009. *BLAST+: ARCHITECTURE AND APPLICATIONS*. *BMC BIOINFORMATICS*, 10: P. 421-431.
- CASTELLANO P., VIGNOLO G., FARÍAS R.N., ARRONDO J.L., CHEHÍN R., 2007. *MOLECULAR VIEW BY FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN LACTOCIN 705 AND MEMBRANES: SPECULATIONS ON ANTIMICROBIAL MECHANISM*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 73(2): P. 415-420.
- CHAMPAGNE C.P., GAGNON D., ST-GELAIS D., VUILLEMARD J.C., 2009. *INTERACTIONS BETWEEN LACTOCOCCUS LACTIS AND STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS STRAINS IN CHEDDAR CHEESE PROCESSING CONDITIONS*. *INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL*, 19(11): P. 669-674.
- CINTAS L.M., CASAUS M.P., HERRANZ C., NES I.F., HERNÁNDEZ P.E., 2001. *REVIEW: BACTERIOCINS OF LACTIC ACID BACTERIA*. *FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY INTERNATIONAL*, 7(4): P. 281-305.
- COLLINS M.D., FARROW J.A., PHILLIPS B.A., KANDLER O., 1983. *STREPTOCOCCUS GMIEAE SP. NOV. AND STREPTOCOCCUS PLANTARUM SP. NOV.* . *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY*, 129: P. 3427-3431.
- CONSORTIUM U., 2011. *ONGOING AND FUTURE DEVELOPMENTS AT THE UNIVERSAL PROTEIN RESOURCE*. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 39(DATABASE ISSUE): P. D214-9.
- COPPET V., CHRISTIEANS S., 2006 *ALTERATIONS MICROBIENNES LIEES AUX BACTERIES LACTIQUES HETEROFERMENTAIRES DANS LE JAMBON CUIT SUPERIEUR*. 11ÈMES JSMTV - CLERMONT FD P. 173-174.

- CORRIEU G., LUQUET F.M., 2008. *BACTÉRIES LACTIQUES DE LA GÉNÉTIQUE AUX FERMENTS*. LAVOISIER ED., ED. VOL.: LAVOISIER. 872.
- CRANDALL A.D., MONTVILLE T.J., 1998. *NISIN RESISTANCE IN LISTERIA MONOCYTOGENES ATCC 700302 IS A COMPLEX PHENOTYPE*. APPL ENVIRON MICROBIOL, 64(1): P. 231-237.
- CUTTER C.N., SIRAGUSA G.R., 1998. *INCORPORATION OF NISIN INTO A MEAT BINDING SYSTEM TO INHIBIT BACTERIA ON BEEF SURFACES*. LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY 27(1): P. 19–23.
- DAGRY M.K. 1996. *ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE MUTANTS RÉSISTANTS À LA MUTACINE BNY266*. MÉMOIRE DE MAÎTRISE., UNIVERSITÉ LAVAL, 61.
- DALET K., BRIAND C., CENATIEMPO Y., HÉCHARD Y., 2000. *THE RPON GENE OF ENTEROCOCCUS FAECALIS DIRECTS SENSITIVITY TO SUBCLASS IIA BACTERIOCINS*. CURR MICROBIOL., 41(6): P. 441-443.
- DAW M.A., FALKINER F.R., 1996. *BACTERIOCINS: NATURE, FUNCTION AND STRUCTURE*. MICRON. , 27(6): P. 467-479.
- DE KEYZER J., VAN DER DOES C., DRIESSEN A.J., 2003. *THE BACTERIAL TRANSLOCASE: A DYNAMIC PROTEIN CHANNEL COMPLEX*. CELL MOL LIFE SCI., 60(10): P. 2034-2052.
- DE KWAADSTENIET M., FRASER T., VAN REENEN C.A., DICKS L.M., 2006. *BACTERIOCIN T8, A NOVEL CLASS IIA SEC-DEPENDENT BACTERIOCIN PRODUCED BY ENTEROCOCCUS FAECIUM T8, ISOLATED FROM VAGINAL SECRETIONS OF CHILDREN INFECTED WITH HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS*. APPL ENVIRON MICROBIOL. , 72(7): P. 4761-4766.
- DE MAN J.C., ROGOSA M., SHARPE M.E., 1980. *A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI*. JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, 23(1): P. 130–135.
- DE ROISSART H.B., 1994. *LES BACTERIES LACTIQUES*. ED. LAITS ET PRODUITS LAITIERS, ED. C.S.E.T. AGRO-ALIMENTAIRES. VOL. PARIS: TECHNIQUES ET DOCUMENTATION.
- DE VUYST L., LEROY F., 2007. *BACTERIOCINS FROM LACTIC ACID BACTERIA: PRODUCTION, PURIFICATION, AND FOOD APPLICATIONS*. J MOL MICROBIOL BIOTECHNOL 13(4): P. 194–199
- DE VUYST L., TSAKALIDOU E., 2008. *STREPTOCOCCUS MACEDONICUS, A MULTI-FUNCTIONAL AND PROMISING SPECIES FOR DAIRY FERMENTATIONS*. INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL, 18(5): P. 476–485.
- DELORME C., 2008. *SAFETY ASSESSMENT OF DAIRY MICROORGANISMS: STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, 126(3): P. 274-277.
- DELVES-BROUGHTON J., 1990. *NISIN AND ITS APPLICATION AS A FOOD PRESERVATIVE*. INTERNATIONAL JOURNAL OF DAIRY TECHNOLOGY, 43(3): P. 73-76.

- DELVES-BROUGHTON J., BLACKBURN P., EVANS R.J., HUGENHOLTZ J., 1996. *APPLICATIONS OF THE BACTERIOCIN , NISIN*. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK. , 69(2): P. 193-202.
- DENIS F., 2007. *BACTÉRIOLOGIE MÉDICALE: TECHNIQUES USUELLES*. ED., ED. VOL.: ELSEVIER MASSON.
- DIEP D.B., SKAUGEN M., SALEHIAN Z., HOLO H., NES I.F., 2007. *COMMON MECHANISMS OF TARGET CELL RECOGNITION AND IMMUNITY FOR CLASS II BACTERIOCINS*. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 104(7): P. 2384-2389.
- DOAN N.T., VAN HOORDE K., CNOCKAERT M., DE BRANDT E., AERTS M., LE THANH B., VANDAMME P., 2012. *VALIDATION OF MALDI-TOF MS FOR RAPID CLASSIFICATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA , WITH A FOCUS ON ISOLATES FROM TRADITIONAL FERMENTED FOODS IN NORTHERN VIETNAM*. LETT APPL MICROBIOL. , 55(5): P. 265-273.
- DOGUIET KOFFI- DENIS D. 2010. *BIOCONTRÔLE DES MOISSISSURES DU GENRE FUSARIUM PRODUCTRICES DE FUMONISINES PAR SÉLECTION DE BACTÉRIES LACTIQUES AUTOCHTONES DE MAÏS*. THÈSE DE DOCTORAT, UNIVERSITÉ BORDEAUX 1, 185.
- DORTU C., HUCH M., HOLZAPFEL W.H., FRANZ C.M.A.P., THONART P., 2008. *ANTI-LISTERIAL ACTIVITY OF BACTERIOCIN-PRODUCING LACTOBACILLUS CURVATUS CWBI-B28 AND LACTOBACILLUS SAKEI CWBI-B1365 ON RAW BEEF AND POULTRY MEAT*. LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, 47(6): P. 581–586.
- DORTU C.T., HONART P., 2009. *LES BACTÉRIOCINES DES BACTÉRIES LACTIQUES : CARACTÉRISTIQUES ET INTÉRÊTS POUR LA BIOCONSERVATION DES PRODUITS ALIMENTAIRES*. BIOTECHNOL. AGRON. SOC. ENVIRON. , 13(1): P. 143-154.
- DOUMANDJI A., NECHE L., 2008. *ACTIVITE ANTIMICROBIENNE INVITRO ET INVIVO DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS ENVERS ESCHERICHIA COLI ENTEROPATHOGENE*. RECHERCHE AGRONOMIQUE, 21: P. 101-111.
- DREWNOWSKI A., 2005. *CONCEPT OF A NUTRITIOUS FOOD : TOWARD A NUTRIENT DENSITY SCORE 1 – 3*. AM J CLIN NUTR., 82(4): P. 721-732.
- DRIDER D., FIMLAND G., HÉCHARD Y., MCMULLEN M.L., PRÉVOST H., 2006. *THE CONTINUING STORY OF CLASS IIA BACTERIOCINS*. MICROBIOL MOL BIOL REV. , 70(2): P. 564-582.
- DRISSI F., BUFFET S., RAOULT D., MERHEJ V., 2015. *COMMON OCCURRENCE OF ANTIBACTERIAL AGENTS IN HUMAN INTESTINAL MICROBIOTA*. FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, 6(MAY): P. 441-441.
- DUFFES F., JENOE P., BOYAVAL P., 2000. *USE OF TWO DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS TO STUDY DIFFERENTIAL PROTEIN EXPRESSION IN DIVERCIN V41-RESISTANT AND WILD-TYPE STRAINS OF LISTERIA MONOCYTOGENES*. APPL. ENIRON. MICROBIOL, 66(10): P. 4318-4324.

- EDDY S.R., 2011. *ACCELERATED PROFILE HMM SEARCHES*. PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY, 7(10): P. E1002195-E1002195.
- EIJSINK V.G.H., SKEIE M., HANS MIDDELHOVEN P., BENTE BRURBERG M., NES I.F., 1998. *COMPARATIVE STUDIES OF CLASS IIA BACTERIOCINS OF LACTIC ACID BACTERIA*. APPL ENVIRON MICROBIOL. , 64(9): P. 3275-3281.
- EIJSINK V.G.H., AXELSSON L., DIEP D.B., HÅVARSTEIN L.S., HOLO H., NES I.F., 2002. *PRODUCTION OF CLASS II BACTERIOCINS BY LACTIC ACID BACTERIA ; AN EXAMPLE OF BIOLOGICAL WARFARE AND COMMUNICATION*. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK, 81(1): P. 639-654.
- EL-BARADEI G., DELACROIX-BUCHET A., OGIER J.C., 2007. *BIODIVERSITY OF BACTERIAL ECOSYSTEMS IN TRADITIONAL EGYPTIAN DOMIATI CHEESE*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 73(4): P. 1248-55.
- EL-BARADEI G., DELACROIX-BUCHET A., OGIER J., 2008. *BACTERIAL BIODIVERSITY OF TRADITIONAL ZABADY FERMENTED MILK*. INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, 121(3): P. 295-301.
- ELDAR A., GORIA M., GHITTINO C., ZLOTKIN A., BERCOVIER H., 1999. *BIODIVERSITY OF LACTOCOCCUS GARVIEAE STRAINS ISOLATED FROM FISH IN EUROPE , ASIA , AND AUSTRALIA*. APPL ENVIRON MICROBIOL. , 65(3): P. 1005-1008.
- ENNAHAR S., DESCHAMPS N., RICHARD J., 2000. *NATURAL VARIATION IN SUSCEPTIBILITY OF LISTERIA STRAINS TO CLASS IIA BACTERIOCINS*. CURR. MICROBIOL., 41(1): P. 1-4.
- FICHES TECHNIQUES. *MILIEU KLIGLER HAJNA* [ONLINE]. ACADÉMIE DE LILLE, SITE DES BIOTECHNOLOGIES. AVAILABLE: [HTTP://BGB.DISCIPLINE.AC-LILLE.FR/FICHES-TECHNIQUES-STL/FC-MILIEU-KLIGLER-HAJNA.PDF/VIEW](http://BGB.DISCIPLINE.AC-LILLE.FR/FICHES-TECHNIQUES-STL/FC-MILIEU-KLIGLER-HAJNA.PDF/VIEW).
- FIMLAND G., JOHNSEN L., AXELSSON L., BRURBERG M.B., NES I.F., EIJSINK V.G.H., NISSEN-MEYER J., 2000. *A C-TERMINAL DISULFIDE BRIDGE IN PEDIOCIN-LIKE BACTERIOCINS RENDERS BACTERIOCIN ACTIVITY LESS TEMPERATURE DEPENDENT AND IS A MAJOR DETERMINANT OF THE ANTIMICROBIAL SPECTRUM*. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 182(9): P. 2643-2648.
- FLYNN S., VAN SINDEREN D., THORNTON G.M., HOLO H., NES I.F., COLLINS J.K., 2002. *CHARACTERIZATION OF THE GENETIC LOCUS RESPONSIBLE FOR THE PRODUCTION OF ABP-118, A NOVEL BACTERIOCIN PRODUCED BY THE PROBIOTIC BACTERIUM LACTOBACILLUS SALIVARIUS SUBSP. SALIVARIUS UCC118*. MICROBIOLOGY. , 148: P. 973-984.
- FOOD & AGRICULTURE ORG, 1995. *LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS DANS LA NUTRITION HUMAINE*. ED. ALIMENTATION ET NUTRITION, ED. VOL.: ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE. 271.
- FOX G.E., PECHMAN K.R., WOESE C.R., 1977A. *COMPARATIVE CATALOGING OF 16S RIBOSOMAL RIBONUCLEIC ACID: MOLECULAR APPROACH TO PROCARYOTIC SYSTEMATICS*. INT J SYST EVOL MICROBIOL., 27(1): P. 44-57.

- FOX G.E., MAGRUM L.J., BALCHT W.E., WOLFEB R.S., WOESE C.R., 1977B. *CLASSIFICATION OF METHANOGENIC BACTERIA BY 16S RIBOSOMAL RNA CHARACTERIZATION*. PROC NATL ACAD SCI U S A. , 74(10): P. 4537-4541.
- FOX P.F., MCSWEENEY P.L.H. 2004. *CHEESE: AN OVERVIEW*. IN: P.L.H.M.T.M.C. ATRICK F. FOX & TIMOTHY P.G. (EDS.) *CHEESE: CHEMISTRY, PHYSICS AND MICROBIOLOGY*. ACADEMIC PRESS.
- FRANKLIN W., BARBER B.S.M.S. 1962. *LE CONTROLE D'HYGIENE DU LAIT LIQUIDE. HYGIÈNE DU LAIT*. SUISSE: ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ.
- GAO S., SUNG W.K., NAGARAJAN N., 2011. *OPERA: RECONSTRUCTING OPTIMAL GENOMIC SCAFFOLDS WITH HIGH-THROUGHPUT PAIRED-END SEQUENCES*. J COMPUT BIOL. , 18(11): P. 1681-1691.
- GARRITY G., BRENNER D., KRIEG N., STALEY J., 2008. *BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*. ED., ED. VOL.
- GARRITY G.M., HOLT J.G., 2004. *TAXONOMIC OUTLINE OF THE ARCHAEA AND BACTERIA BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*. 2 EME ED. TAXONOMIC OUTLINE OF THE ARCHAEA AND BACTERIA BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, ED. VOL.: SPRINGER.
- GARTIA A., 1925. *SUR UN EXEMPLE D'ANTAGONISME ENTRE DEUX SOUCHES DE COLIBACILLES*. C. R. SOC. BIOL., 93: P. 1040–1042.
- GHAZI K., NIAR A., 2011. *ARTICLES ORIGINAUX QUALITÉ HYGIÉNIQUE DU LAIT CRU DE VACHE DANS LES DIFFÉRENTS ÉLEVAGES DE LA WILAYA DE TIARET (ALGÉRIE)*. TROPICULTURA, 29(4): P. 193-196.
- GRAVESEN A., SØRENSEN K., AARESTRUP F.M., KNØCHEL S., 2001. *SPONTANEOUS NISIN-RESISTANT LISTERIA MONOCYTOGENES MUTANTS WITH INCREASED EXPRESSION OF A PUTATIVE PENICILIN-BINDING PROTEIN AND THEIR SENSITIVITY TO VARIOUS ANTIBIOTICS*. MICROB . DRUG RESIST., 7(2): P. 127-135.
- GRAVESEN A., RAMNATH M., RECHINGER K.B., ANDERSEN N., JÄNSCH L., HÉCHARD Y., HASTINGS J.W., KNØCHEL S., 2002. *HIGH-LEVEL RESISTANCE TO CLASS IIA BACTERIOCINS IS ASSOCIATED WITH ONE GENERAL MECHANISM IN LISTERIA MONOCYTOGENES*. MICROBIOLOGY. , 148: P. 2361-2369.
- GUILLET F., BONNEFOY C., LEYRAL G., VERNE-BOURDAIS É., 2002. *MICROBIOLOGIE ET QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES AGROALIMENTAIRES*. ED. BIOSCIENCES ET TECHNIQUES, ED. VOL.: DOIN. 245.
- GUINANE C.M., COTTER P.D., HILL C., ROSS R.P., 2006. *SPONTANEOUS RESISTANCE IN LACTOCOCCUS LACTIS IL1403 TO THE LANTIBIOTIC LACTICIN 3147*. FEMS MICROBIOL LETT. , 260(1): P. 77-83.
- GUIRAUD J.P., 2003. *MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE*. 2 ED., ED. VOL. PARIS DUNOD. 651.
- HAMON Y., PERON Y., 1963. *QUELQUES REMARQUES SUR LES BACT'ERIOCINES PRODUITES PAR LES MICROBES GRAM-POSITIFS*. C R HEBD SEANCES ACAD SCI., 257: P. 1191–1193.

- HANLIN R.T., 1992. *ILLUSTRATED GENERA OF ASCOMYCETES*. ED., ED. VOL. 1. APS PRESS. 263.
- HAUBEN K.J.A., WUYTACK E.Y., SOONTJENS C.F.C., MICHIELS C.W., 1996. *HIGH PRESSURE TRANSIENT SENSITIZATION OF ESCHERICHIA COLI TO LYSOZYME AND NISIN BY DISRUPTION OUTER MEMBRANE PERMEABILITY*. J.FOOD.PROT., 59: P. 350-355.
- HÉCHARD Y., PELLETIER C., CENATIEMPO Y., FRÈRE J., 2001. *ANALYSIS OF R54-DEPENDENT GENES IN ENTEROCOCCUS FAECALIS: A MANNOSE PTS PERMEASE (EIIMAN) IS INVOLVED IN SENSITIVITY TO A BACTERIOCIN, MESENTERICIN Y105*. MICROBIOLOGY 147: P. 1575-1580.
- HERVE-JIMENEZ L., GUILLOUARD I., GUEDON E., BOUDEBBOUZE S., HOLS P., MONNET V., MAGUIN E., RUL, F., 2009. *POSTGENOMIC ANALYSIS OF STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS COCULTIVATED IN MILK WITH LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS: INVOLVEMENT OF NITROGEN, PURINE, AND IRON METABOLISM*. APPL ENVIRON MICROBIOL. , 75 (7): P. 2062-2073.
- HIRSCH A., GRINSTED E., CHAPMAN H.R., MATTICK A.T.R., 1951. *A NOTE ON THE INHIBITION OF AN ANAEROBIC SPOREFORMER IN SWISS-TYPE CHEESE BY A NISIN-PRODUCING STREPTOCOCCUS*. JOURNAL OF DAIRY RESEARCH, 18(2): P. 205-207.
- HOLS P., HANCY F., FONTAINE L., GROSSIORD B., PROZZI D., LEBLOND-BOURGET N., DECARIS B., BOLOTIN A., DELORME C., EHRLICH S.D., GUÉDON E., MONNET V., RENAULT P., KLEEREBEZEM M., 2005. *NEW INSIGHTS IN THE MOLECULAR BIOLOGY AND PHYSIOLOGY OF STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS REVEALED BY COMPARATIVE GENOMICS*. FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS, 29(3): P. 435-63.
- HOLZAPFEL W.H., HABERER P., GEISEN R., BJÖRKROTH J., SCHILLINGER U., 2001. *TAXONOMY AND IMPORTANT FEATURES OF PROBIOTIC MICROORGANISMS IN FOOD AND NUTRITION*. AM J CLIN NUTR., 73(2): P. 365S-373S.
- HOUALI K. 1999. *IDENTIFICATION DE BACTÉRIES LACTIQUES ISOLÉES DE LAIT CRU (RÉGION D'ANNABA), ETUDE DE LEURS APTITUDES TECHNOLOGIQUES ET DE L'EFFET ANTAGONISTE DES LACTOBACILLUS SUR STAPHYLOCOCCUS SP, PSEUDOMONAS AEROGENOSA, ESCHERCHIA COLI, SACCHAROMYCES CEREVISIAE ET ASPERGILLUS CLAVATUS*. THÈSE DE DOCTORAT, UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR D'ANNABA, 261.
- HUI Y.H., 1993. *DAIRY SCIENCE AND TECHNOLOGY HANDBOOK*. P. 1150 P.-1150 P.
- HYATT D., CHEN G.L., LOCASCIO P.F., LAND M.L., LARIMER F.W., HAUSER L.J., 2010. *PRODIGAL: PROKARYOTIC GENE RECOGNITION AND TRANSLATION INITIATION SITE IDENTIFICATION*. BMC BIOINFORMATICS, 11(1): P. 1-11.
- JACOB F., LWOFF A., SIMINOVITCH A., WOLLMAN E., 1953. *DÉFINITION DE QUELQUES TERMES RELATIFS A LA LYSOGÉNIE*. ANN INST PASTEUR (PARIS), 84(1): P. 222-224.

- JARVIS B., FARR J., 1971. *PARTIAL PURIFICATION, SPECIFICITY AND MECHANISM OF ACTION OF THE NISINE-INACTIVATING ENZYME FROM BACILLUS CEREUS*. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA.*, 227(2): P. 232-240.
- JELÉN P., 1994. *DAIRY SCIENCE AND TECHNOLOGY HANDBOOK*. *FOOD RESEARCH INTERNATIONAL*, 27(6): P. 576-577.
- KANEHISA M., GOTO S., 2000. *KEGG : KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES*. *NUCLEIC ACIDS RES.* , 28(1): P. 27-30.
- KATIKOU P., AMBROSIADIS I., GEORGANTELIS D., KOIDIS P., GEORGAKIS S.A., 2007. *EFFECT OF LACTOBACILLUS CULTURES ON MICROBIOLOGICAL , CHEMICAL AND ODOUR CHANGES DURING STORAGE OF RAINBOW TROUT FILLETS*. *JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE*, 87(3): P. 477-484.
- KAUR S., KUMAR P., 2012. *SCREENING OF BACTERIOCIN PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA FOR PROBIOTIC PROPERTIES*. 5(2): P. 6-11.
- KERFOUF A., ANAS M., RIZK H.A., KIHAL M., 2010. *ACTIVITÉ ANTI-BACTÉRIENNE DE LACTOBACILLUS PLANTARUM ISOLÉE DU LAIT CRU DE CHÈVRE D; ALGÉRIE VIS À VIS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. *TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE*, 5(21): P. 26-33.
- KHELILI K., HAMIDECHI M., 2014. *MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY : AN EFFICIENT TOOL FOR RAPID AND RELIABLE IDENTIFICATION OF BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM FOREST SOIL MATERIALS AND METHODS*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH* 2(4): P. 1073-1081.
- KLAENHAMMER T.R., 1993. *GENETICS OF BACTERIOCINS PRODUCED BY LACTIC ACID BACTERIA*. *FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS*, 12(1-3): P. 39-85.
- KLEEREBEZEM M., 2004. *QUORUM SENSING CONTROL OF LANTIBIOTIC PRODUCTION; NISIN AND SUBTILIN AUTOREGULATE THEIR OWN BIOSYNTHESIS*. *PEPTIDES*, 25(9): P. 1405-1414.
- KLEIN G., PACK A., BONAPARTE C., REUTER G., 1998. *TAXONOMY AND PHYSIOLOGY OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA*. *INT. J. FOOD MICROBIOL.*, 41(2): P. 103-125.
- KOORT J., VANDAMME P., SCHILLINGER U., HOLZAPFEL W., BJÖRKROTH J., 2004. *LACTOBACILLUS CURVATUS SUBSP. MELIBIOSUS IS A LATER SYNONYM OF LACTOBACILLUS SAKEI SUBSP. CARNOSUS*. *INT. J. SYST. EVOL. MICROBIOL.*, 54 P. 1621-1626.
- KRÖCKEL L., SCHILLINGER U., FRANZ C.M., BANTLEON A., LUDWIG W., 2003. *LACTOBACILLUS VERSMOLDENSIS SP. NOV., ISOLATED FROM RAW FERMENTED SAUSAGE*. *INT J SYST EVOL MICROBIOL.* , 53: P. 513-517.
- LABIOUI H., LAAROUSSI E., EL YACHIOUI M., MOHAMMED. O., 2005. *SÉLECTION DE SOUCHES DE BACTÉRIES LACTIQUES ANTIBACTÉRIENNES*. *BULL. SOC. PHARM.* , 144(1): P. 237-250.

- LAGESEN K., HALLIN P., RØDLAND E.A., STAERFELDT H.H., ROGNES T., USSERY D.W., 2007. *RNAMMER: CONSISTENT AND RAPID ANNOTATION OF RIBOSOMAL RNA GENES*. NUCLEIC ACIDS RES., 35(9): P. 3100-3108.
- LANCEFIELD R.C., 1933. *A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND OTHER GROUPS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI*. J EXP MED. , 75(4): P. 571-595.
- LARKIN M.A., BLACKSHIELDS G., BROWN N.P., CHENNA R., MCGETTIGAN P.A., MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I.M., WILM A., LOPEZ, R., , THOMPSON J.D., GIBSON T.J., HIGGINS D.G., 2007. *CLUSTAL W AND CLUSTAL X VERSION 2.0*. BIOINFORMATICS. , 23(21): P. 2947-2948.
- LARSEN A.G., NØRRUNG B., 1993. *INHIBITION OF LISTERIA MONOCYTOGENES BY BAVARICIN A, A BACTERIOCIN PRODUCED BY LACTOBACILLUS BAVARICUS MI401*. LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, 17(3): P. 132-134.
- LASLETT D., 2004. *ARAGORN, A PROGRAM TO DETECT TRNA GENES AND TMRNA GENES IN NUCLEOTIDE SEQUENCES*. NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 32(1): P. 11-16.
- LEAH A., MARTIN-VISSCHER L.A., XIANDI GONG X., DUSZYK M., VEDERAS J.C., 2009. *THE THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF CARNOCYCLIN A REVEALS THAT MANY CIRCULAR BACTERIOCINS SHARE A COMMON STRUCTURAL MOTIF*. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 284(42): P. 28674-28681.
- LECHNER M., FINDEISS S., STEINER L., MARZ M., STADLER P.F., PROHASKA S.J., 2011. *PROTEINORTHO: DETECTION OF (CO-)ORTHOLOGS IN LARGE-SCALE ANALYSIS*. BMC BIOINFORMATICS, 12(1): P. 124-124.
- LEISNER J.J., VANCANNEYT M., GORIS J., CHRISTENSEN H., RUSUL G., 2000. *DESCRIPTION OF PARALACTOBACILLUS SELANGORENSIS GEN. NOV., SP. NOV., A NEW LACTIC ACID BACTERIUM ISOLATED FROM CHILI BO, A MALAYSIAN FOOD INGREDIENT*. INT J SYST EVOL MICROBIOL., 50(1): P. 19-24.
- LEVEAU J.Y., BOUX M. 1980. *BACTÉRIE. TECHNIQUE D'ANALYSE ET DE CONTRÔLE DANS LES INDUSTRIES AGRO-ALIMENTAIRES. 3EME. ÉDITION*. TEC & DOC, LAVOISIER. PARIS.
- LEVEAU J.Y., BOUX M., 1993. *MICROBIOLOGIE INDUSTRIELLE : LES MICROORGANISMES D'INTÉRÊT INDUSTRIEL*. ED. COLL. SCIENCES ET TECHNIQUES AGROALIMENTAIRES, ED. VOL.: TEC & DOC LAVOISIER.
- LISTER J., 1873. *A FURTHER CONTRIBUTION TO THE NATURAL HISTORY OF BACTERIA AND THE GERM THEORY OF THE FERMENTATIVE CHANGES*. THE MICROSCOPICAL JOURNAL S2-13: P. 380-408.
- LUBELSKI J., RINK R., KHUSAINOV R., MOLL G., KUIPERS O.P., 2007. *BIOSYNTHESIS, IMMUNITY, REGULATION, MODE OF ACTION AND ENGINEERING OF THE MODEL LANTIBIOTIC NISIN*. CELL MOL LIFE SCI., 65(3): P. 455-476.
- LÜDERS T., BIRKEMO G.A., FIMLAND G., NISSEN-MEYER J., NES I.F., 2003. *STRONG SYNERGY BETWEEN A EUKARYOTIC ANTIMICROBIAL PEPTIDE AND BACTERIOCINS FROM LACTIC ACID BACTERIA*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY., 69(3): P. 1797-1799.

- MARTIN-VISSCHER L.A., GONG X., DUSZYK M., VEDERAS J.C., 2009. *THE THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF CARNOCYCLIN A REVEALS THAT MANY CIRCULAR BACTERIOCINS SHARE A COMMON STRUCTURAL MOTIF*. J BIOL CHEM, 284(42): P. 28674-81.
- MC AULIFFE O., HILL C., 2001. *LANTIBIOTICS: STRUCTURE, BIOSYNTHESIS AND MODE OF ACTION*. FEMS MICROBIOL. REV, 25: P. 285-308.
- MC ENTIRE J.C., CARMAN G.M., MONTVILLE T.J., 2004. *INCREASED ATPASE ACTIVITY IS RESPONSIBLE FOR ACID SENSITIVITY OF NISIN-RESISTANT LISTERIA MONOCYTOGENES ATCC 700302*. APPL ENVIRON MICROBIOL, 70(5): P. 2717-21.
- MECHAI A. 2009. *ISOLEMENT, CARACTÉRISATION ET PURIFICATION DE BACTÉRIOCINES PRODUITES PAR DES BACTÉRIES LACTIQUES AUTOCHTONES: ÉTUDES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES*. UNIVERSITÉ BADJI-MOKHTAR-ANNABA, 160.
- METCHNIKOFF I.I., 2004. *THE PROLONGATION OF LIFE: OPTIMISTIC STUDIES*. ED., ED. VOL.: SPRINGER PUBLISHING COMPANY.
- MICHAYLOVA M., MINKOVA S., KIMURA K., SASAKI T., ISAWA K., 2007. *ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LACTOBACILLUS DELBRUECKII SSP. BULGARICUS AND STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS FROM PLANTS IN BULGARIA*. FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 269(1): P. 160-169.
- MONTEAGUDO-MERA A., RODRÍGUEZ -APARICIO L., RÚA J., MARTÍNEZ-BLANCOA H., NAVASA N.S., GARCÍA-ARMESTO M.R., FERRERO M.A., 2012. *IN VITRO EVALUATION OF PHYSIOLOGICAL PROBIOTIC PROPERTIES OF DIFFERENT LACTIC ACID BACTERIA STRAINS OF DAIRY AND HUMAN ORIGIN*. JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS, 4(2): P. 531-541.
- MORA D., SCARPELLINI M., FRANZETTI L., COLOMBO S., GALLI A., 2003. *RECLASSIFICATION OF LACTOBACILLUS MALTAROMICUS (MILLER ET AL. 1974) DSM 20342(T) AND DSM 20344 AND CARNOBACTERIUM PISCICOLA (COLLINS ET AL. 1987) DSM 20730(T) AND DSM 20722 AS CARNOBACTERIUM MALTAROMATICUM COMB. NOV*. INT J SYST EVOL MICROBIOL., 53: P. 675-678.
- MORAES P.M., PERIN L.M., TASSINARI ORTOLANI M.B., YAMAZI A.K., VIÇOSA G.N., NERO L.A., 2010. *PROTOCOLS FOR THE ISOLATION AND DETECTION OF LACTIC ACID BACTERIA WITH BACTERIOCIINOGENIC POTENTIAL*. LWT - FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 43(9): P. 1320-1324.
- MORENCY H., MOTA-MEIRA M., LAPOINTE G., LACROIX C., LAVOIE M., 2001. *COMPARISON OF THE ACTIVITY SPECTRA AGAINST PATHOGENS OF BACTERIALS STRAINS PRODUCING MUTACIN OR A LANTIBIOTIC*. CAN.J. MICROBIOL., 47(4): P. 322-331.
- MORGAN S.M., O'CONNOR P.M., COTTER P.D., ROSS R.P., HILL C., 2005. *SEQUENTIAL ACTIONS OF THE TWO COMPONENT PEPTIDES OF THE LANTIBIOTIC LACTICIN 3147 EXPLAIN ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY AT NANOMOLAR CONCENTRATIONS*. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 49(7): P. 2606-2611.

- MORITA H., TOH H., OSHIMA K., YOSHIKAZI M., KAWANISHI M., NAKAYA K., SUZUKI T., MIYAUCHI E., ISHII Y., TANABE S., MURAKAMI M., HATTORI M., 2011. *COMPLETE GENOME SEQUENCE AND COMPARATIVE ANALYSIS OF THE FISH PATHOGEN LACTOCOCCUS GARVIEAE*. PLOS ONE, 6(8): P. E23184.
- MORIYA Y., ITOH M., OKUDA S., YOSHIKAZI A.C., KANEHISA M., 2007. *KAAS: AN AUTOMATIC GENOME ANNOTATION AND PATHWAY RECONSTRUCTION SERVER*. NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 35: P. W182-185.
- MOTA-MEIRA M., LAPOINTE G., LACROIX C., LAVOIE M.C., 2000. *MICS OF MUTACIN B-NY266, NISIN A, VANCOMYCIN, AND OXACILLIN AGAINST BACTERIAL PATHOGENS*. ANTIMICRO. AGENTS CHEMOTHER., 44(1): P. 24-29.
- MOUFFOK F., 2006. *MICROBIOLOGIE DES LAITS ET PRODUITS LAITIERS*. INSTITUT PASTEUR MICROBIOLOGIE DES LAITS ET PRODUITS LAITIERS, (PREPARATION DE S): P.
- MULET-POWELL N., LACOSTE-ARMYNOT A.M., VIÑAS M., SIMEON DE BUOCHBERG M., 1998. *INTERACTIONS BETWEEN PAIRS OF BACTERIOCINS FROM LACTIC BACTERIA*. J FOOD PROT. , 61(9): P. 1210-1212.
- NAGHMOUCHI K. 2007. *DIVERGICINE M35 , UNE NOUVELLE BACTÉRIOCINE PRODUITE PAR CARNOBACTERIUM DIVERGENS M35 : CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DU MÉCANISME D ' ACTION ANTI-MICROBIEN ET DU PHÉNOMÈNE DE RÉSISTANCE*. THÈSE DE DOCTORAT, UNIVERSITÉ LAVAL, 161.
- NANCIB DJIDEL A. 2007. *PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE PAR LACTOBACILLUS CASEI SUBSP. RHAMNOSUS SUR JUS DE DATTE : CINÉTIQUE ET OPTIMISATION EN CULTURES DISCONTINUES, SEMI-CONTINUES ET CONTINUES*. THÈSE DE DOCTORAT, INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, 219.
- NAVOUN S. 2005. *THERMORÉSISTANCE DE TROIS SEROTYPES DE SALMONELLA DANS L'OEUF ET LES GESIERS DE POULETS*. DEA, UNIVERSITÉ COCODY
- NAWROCKI E.P., KOLBE D.L., EDDY S., 2009. *INFERNAL 1.0: INFERENCE OF RNA ALIGNMENTS*. BIOINFORMATICS 25(10): P. 1335-1337.
- NAWROCKI E.P., BURGE S.W., BATEMAN A., DAUB J., EBERHARDT R.Y., EDDY S.R., FLODEN E., GARDNER P.P., JONES T.A., TATE J., FINN R.D., 2015. *RFAM 12.0: UPDATES TO THE RNA FAMILIES DATABASE*. NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 43: P. D130-137.
- NIGUTOVA K., MOROVSKY M., PRISTAS P., TEATHER R.M., HOLO H., JAVORSKY P., 2007. *PRODUCTION OF ENTEROLYSIN A BY RUMEN ENTEROCOCCUS FAECALIS STRAIN AND OCCURRENCE OF ENLA HOMOLOGUES AMONG RUMINAL GRAM+ COCCI*. J. APPL. MICROBIOL., 102(2): P. 563-569.
- NILSEN T., NES I.F., HOLO H., 2003. *ENTEROLYSIN A, A CELL WALL-DEGRADING BACTERIOCIN FROM ENTEROCOCCUS FAECALIS LMG 2333*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 69(5): P. 2975-2984.

- NILSSON L., GRAM L., HUSS H.H., 1999. *GROWTH CONTROL OF LISTERIA MONOCYTOGENES ON COLD-SMOKED SALMON USING A COMPETITIVE LACTIC ACID BACTERIA FLORA*. JOURNAL OF FOOD PROTECTION®, 62(4): P. 336-342.
- NINANE V.L. 2008. *CARACTÉRISATION DU CONSORTIUM MICROBIEN D'UN GRAIN DE KÉFIR*. THÈSE DE DOCTORAT, FACULTÉ UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBLoux, 197.
- NISSEN-MEYER J., ROGNE P., OPPEGÅRD C., HAUGEN H.S., KRISTIANSEN P.E., 2009. *STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS OF THE NON-LANTHIONINE-CONTAINING PEPTIDE (CLASS II) BACTERIOCINS PRODUCED BY GRAM-POSITIVE BACTERIA*. CURRENT PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY, 10: P. 19-37.
- NOONPAKDEE W., SANTIVARANGKNA C., JUMRIANGRIT P., SONOMOTO K., PANYIM S., 2003. *ISOLATION OF NISIN-PRODUCING LACTOCOCCUS LACTIS WNC 20 STRAIN FROM NHAM, A TRADITIONAL THAI FERMENTED SAUSAGE*. INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, 81(2): P. 137-145.
- NURK S., BANKEVICH A., ANTIPOV D., GUREVICH A.A., KOROBENNIKOV A., LAPIDUS A., PRJIBELSKI A.D., PYSHKIN A., SIROTKIN A., SIROTKIN Y., STEPANAUSKAS R., CLINGENPEEL S.R., WOYKE T., MCLEAN J.S., LASKEN R., TESLER G., ALEKSEYEV M.A., PEVZNER P., 2013. *ASSEMBLING SINGLE-CELL GENOMES AND MINI-METAGENOMES FROM CHIMERIC MDA PRODUCTS*. J COMPUT BIOL. , 20(10): P. 714-737.
- NYKÄNEN A., WECKMAN K., LAPVETELÄINEN A., 2000. *SYNERGISTIC INHIBITION OF LISTERIA MONOCYTOGENES ON COLD-SMOKED RAINBOW TROUT BY NISIN AND SODIUM LACTATE*. INT J FOOD MICROBIOL. , 61: P. 63-72.
- OH S., KIM, , S.H. K., Y., , SIM J.H., KIM K.S., LEE S.H., PARK S., KIM Y.J., 2006. *EFFECT OF BACTERIOCIN PRODUCED BY LACTOCOCCUS SP. HY 449 ON SKIN-INFLAMMATORY BACTERIA*. FOOD CHEM TOXICOL., 44(8): P. 1184-1190.
- OPPEGÅRD C., ROGNE P., EMANUELSEN L., KRISTIANSEN P.E., FIMLAND G., NISSEN-MEYER J., 2007. *THE TWO-PEPTIDE CLASS II BACTERIOCINS: STRUCTURE, PRODUCTION, AND MODE OF ACTION*. JOURNAL OF MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 13(4): P. 210-219.
- ORLA-JENSEN S., 1919. *THE LACTIC ACID BACTERIA* ED., ED. VOL.: MEM. ACAD. ROY. SCI. , SECT. SCI., 8 S6R., 5.
- ØSTERGAARD A., EMBAREK P.K.B., WEDELL-NEERGAARD C., HUSS H.H., GRAM L., 1998. *CHARACTERIZATION OF ANTI-LISTERIAL LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM THAI FERMENTED FISH PRODUCTS*. FOOD MICROBIOLOGY, 15(2): P. 223-233.
- OUADGHIRI M. 2009. *BIODIVERSITÉ DES BACTÉRIES LACTIQUES DANS LE LAIT CRU ET SES DÉRIVÉS « LBEN » ET « JBEN » D ' ORIGINE MAROCAINE* THÈSE DE DOCTORAT, UNIVERSITÉ MOHAMMED V – AGDAL 132.
- OXFORD A.E., 1944. *DIPLOCOCCIN, AN ANTI-BACTERIAL PROTEIN ELABORATED BY CERTAIN MILK STREPTOCOCCI*. BIOCHEM. J., 38(2): P. 178-182.

- PANISSET J.C., DEWAILLY É., DOUCET-LEDUC H. 2003. *CONTAMINATION ALIMENTAIRE IN: P.G. MICHEL GÉRIN, SYLVAINÉ CORDIER, CLAUDE VIAU, PHILIPPE QUÉNEL, ÉRIC DEWAILLY (ED.) ENVIRONNEMENT ET SANTÉ PUBLIQUE : FONDEMENTS ET PRATIQUES*. PARIS: EDISEN-ÉDITIONS TEC & DOC.
- PAPAGIANNI M., 2003. *RIBOSOMALLY SYNTHESIZED PEPTIDES WITH ANTIMICROBIAL PROPERTIES: BIOSYNTHESIS, STRUCTURE, FUNCTION, AND APPLICATIONS*. BIOTECHNOLOGY ADVANCES, 21(6): P. 465-499.
- PATNAIK P., GROVER S., VIRENDER K B., 2005. *EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON PRODUCTION OF LICHENIN, A CHROMOSOMALLY ENCODED BACTERIOCIN-LIKE COMPOUND PRODUCED BY BACILLUS LICHENIFORMIS 26L-10/3RA*. MICROBIOLOGICAL RESEARCH, 160(2): P. 213-218.
- PATTON G.C., VAN DER DONK W.A., 2005. *NEW DEVELOPMENTS IN LANTIBIOTIC BIOSYNTHESIS AND MODE OF ACTION*. CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY, 8(5): P. 543-51.
- PAVLOVIC M., HUBER I., KONRAD R., BUSCH U., 2013. *APPLICATION OF MALDI-TOF MS FOR THE IDENTIFICATION OF FOOD BORNE BACTERIA*. OPEN MICROBIOL J., 7: P. 135-41.
- PENAUD S. 2006. *ANALYSE DE LA SÉQUENCE GÉNOMIQUE ET ETUDE DE L'ADAPTATION À L'ACIDITÉ DE L. DELBRUECKII SSP. BULGARICUS ATCC11842*. THÈSE DE DOCTORAT, INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE DE PARIS-GRIGNON, 215.
- PFEILER E.A., KLAENHAMMER T.R., 2007. *THE GENOMICS OF LACTIC ACID BACTERIA*. TRENDS IN MICROBIOLOGY, 15(12): P. 546-553.
- PUNTA M., COGILL P.C., EBERHARDT R.Y., MISTRY J., TATE J., BOURSNELL C., PANG N., FORSLUND K., CERIC G., LEMENTS J., HEGER A., HOLM L., SONNHAMMER E.L.L., EDY S.R., BATEMAN R.D., 2012. *THE PFAM PROTEIN FAMILIES DATABASE*. NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 40: P. D290-301.
- QUIBERONI A., MOINEAU S., ROUSSEAU G.M., REINHEIMER J., ACKERMANN H.W., 2010. *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS BACTERIOPHAGES*. . INT. DAIRY J. , 20(657-664): P.
- RAVIN V., SASAKI T., RÄISÄNEN L., RIIPINEN K.A., ALATOSSAVA T., 2006. *EFFECTIVE PLASMID PX3 TRANSDUCTION IN LACTOBACILLUS DELBRUECKII BY BACTERIOPHAGE LL-H*. PLASMID. , 55(3): P. 184-193.
- RAY B., DAESCHEL M.A. 1994. *BACTERIOCINS OF STARTER CULTURE BACTERIA*. IN: R.G.B. V. M. DILLON (ED.) *NATURAL ANTIMICROBIAL SYSTEMS AND FOOD PRESERVATION*. UK: CAB INTERNATIONAL.
- RICHARD C., CAÑÓN R., NAGHMOUCHI K., BERTRAND D., PRÉVOST H., DRIDER D., 2006. *EVIDENCE ON CORRELATION BETWEEN NUMBER OF DISULFIDE BRIDGE AND TOXICITY OF CLASS IIA BACTERIOCINS*. FOOD MICROBIOL, 23(2): P. 175-183.
- RICHARD C., LEROI F., BRILLET-VIEL A., RACHMAN C., CONNIL N., DRIDER D., PILET M.F., ONNO B., DOUSSET X., PRÉVOST H., 2004. *MAÎTRISE DU*

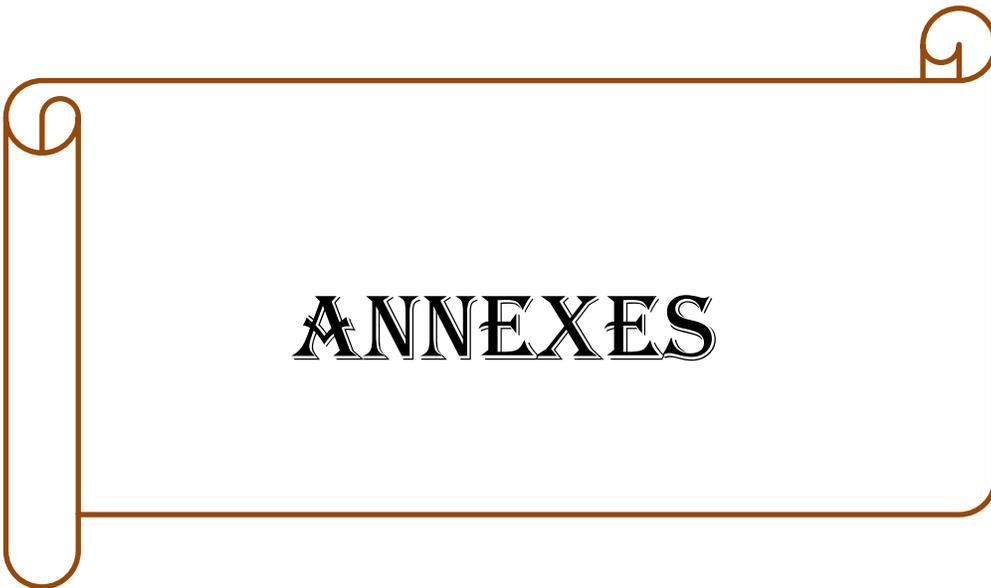
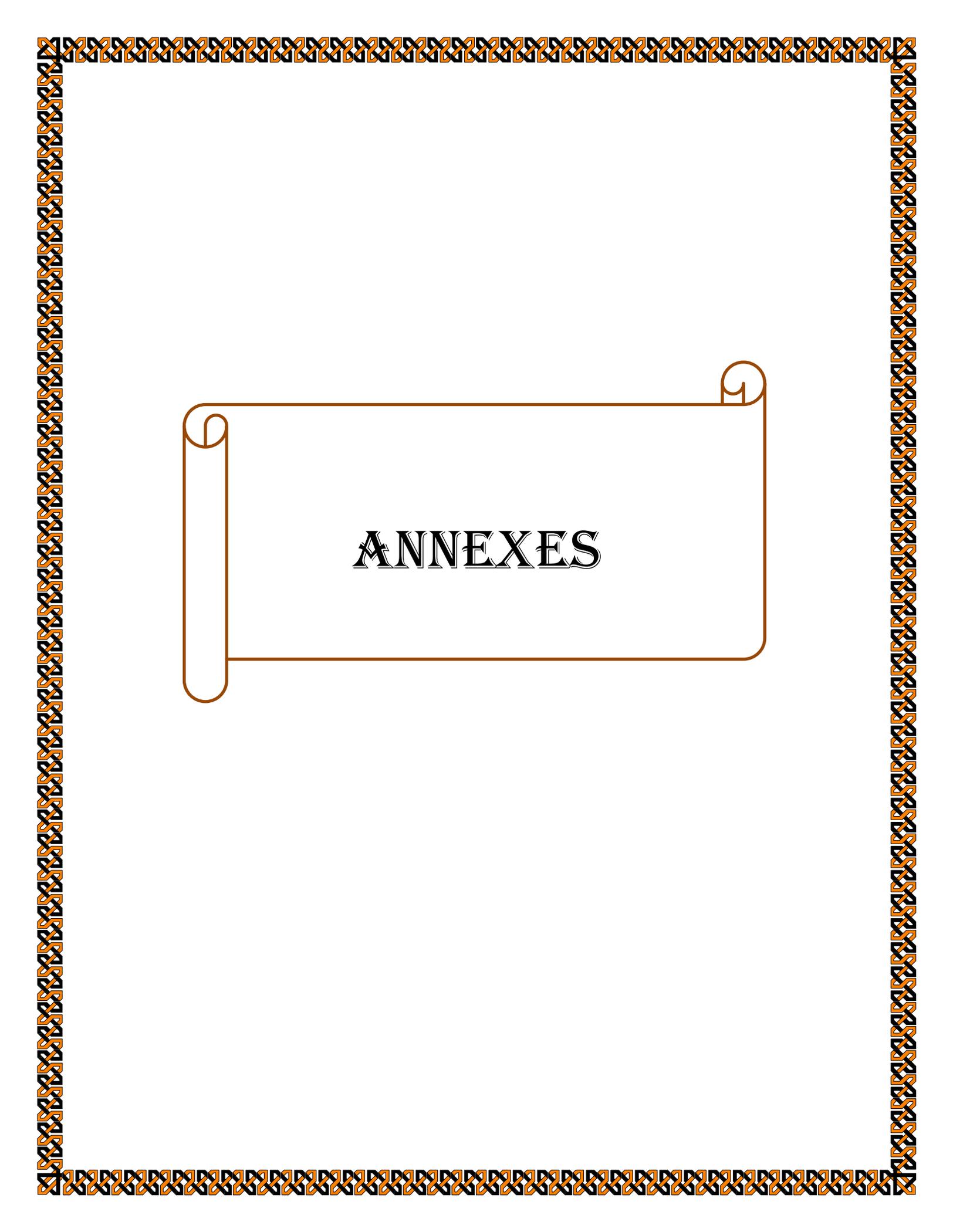
- DÉVELOPPEMENT DE LISTERIA MONOCYTOGENES DANS LE SAUMON FUMÉ : INTÉRÊT DE LA BIOPRÉSERVATION PAR DES BACTÉRIES LACTIQUES*. LAIT 84: P. 135-144.
- RODGERS S., 2002. *REFRIGERATED FOODS WITH MICROBIAL CULTURES TRENDS IN FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY*, 12(2001): P. 276-284.
- ROUDJ S., BELKHEIR K., ZADI-KARAM H., KARAM N.E., 2009. *PROTÉOLYSE ET AUTOLYSE CHEZ DEUX LACTOBACILLES ISOLÉS DE LAIT CAMELIN DU SUD OUEST ALGÉRIEN*. EUROPEAN JOURNAL OF SCIENTIFIC RESEARCH, 34(2): P. 218-227.
- RUSCH S.L., KENDALL D.A., 2007. *INTERACTIONS THAT DRIVE SEC-DEPENDENT BACTERIAL PROTEIN TRANSPORT*. BIOCHEMISTRY. , 46(34): P. 9666-9673.
- SALMINEN S., VON WRIGHT A., 2004. *LACTIC ACID BACTERIA: MICROBIOLOGICAL AND FUNCTIONAL ASPECTS, THIRD EDITION*. ED., ED. VOL.: CRC PRESS.
- SÁNCHEZ J., DIEP D.B., HERRANZ C., NES I.F., CINTAS L.M., HERNÁNDEZ P.E., 2007. *AMINO ACID AND NUCLEOTIDE SEQUENCE, ADJACENT GENES, AND HETEROLOGOUS EXPRESSION OF HIRACIN JM79, A SEC-DEPENDENT BACTERIOCIN PRODUCED BY ENTEROCOCCUS HIRAE DCH5, ISOLATED FROM MALLARD DUCKS (ANAS PLATYRHYNCHOS)*. FEMS MICROBIOL LETT., 270(2): P. 227-236.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R., 1977. *DNA SEQUENCING WITH CHAIN-TERMINATING*. PROC NATL ACAD SCI U S A. , 74(12): P. 5463-5467.
- SCHLEIFER K.H., KRAUS J., DVORAK C., KILPPER-BÄLZ R., COLLINS M.D., FISCHER W., 1985. *TRANSFER OF STREPTOCOCCUS LACTIS AND RELATED STREPTOCOCCI TO THE GENUS LACTOCOCCUS GEN. NOV.* SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY, 6(2): P. 183-195.
- SCHOSTER A., KOKOTOVIC B., PERMIN A., PEDERSEN P.D., DAL BELLO F., GUARDABASSI L., 2013. *IN VITRO INHIBITION OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE AND CLOSTRIDIUM PERFRINGENS BY COMMERCIAL PROBIOTIC STRAINS*. ANAEROBE, 20: P. 36-41.
- SENG P., DRANCOURT M., GOURIET F., LA SCOLA B., FOURNIER P.E., ROLAIN J.M., RAOULT D., 2009. *ONGOING REVOLUTION IN BACTERIOLOGY: ROUTINE IDENTIFICATION OF BACTERIA BY MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY*. CLIN INFECT DIS. , 49(4): P. 543-551.
- SHERMAN J.M., 1937. *THE STREPTOCOCCI*. BACTERIOL REV. , 1(1): P. 3-97.
- SHEWMAKER P., STEIGERWALT A.G., MOREY R.E., CARVALHO, MDA. G., ELLIOTT J.A., JOYCE K., BARRETT T.J., TEIXEIRA L.M., FACKLAM R.R., 2004. *VAGOCOCCUS CARNIPHILUS SP. NOV., ISOLATED FROM GROUND BEEF*. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, 54: P. 1505-1510.

- SMITH L., ZACHARIAH C., THIRUMOORTHY R., ROCCA J., NOVÁK J., HILLMAN J.D., EDISON A.S., 2003. *STRUCTURE AND DYNAMICS OF THE LANTIBIOTIC MUTACIN 1140*. *BIOCHEMISTRY*, 42(35): P. 10372-10384.
- STACKEBRANDT E., EBERS J., 2006. *TAXONOMIC PARAMETERS REVISITED: TARNISHED GOLD STANDARDS*. *MICROBIOLOGY TODAY*, 33(4): P. 152-155.
- STEIJNS J.M., 2006. *NUTRITIONAL AND TECHNOLOGICAL ASPECTS OF MINOR BIOACTIVE COMPONENTS IN MILK AND WHEY : GROWTH FACTORS, VITAMINS AND NUCLEOTIDES*. *INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL*, 18(5): P. 425-435.
- STEIN T., HEINZMANN S., SOLOVIEVA I., ENTIAN K.D., 2003. *FUNCTION OF LACTOCOCCUS LACTIS NISIN IMMUNITY GENES NISI AND NISFEG AFTER COORDINATED EXPRESSION IN THE SURROGATE HOST BACILLUS SUBTILIS*. *J BIOL CHEM.*, 278(1): P. 89-94.
- STEVENS K.A., SHELDON B.W., KLAPES N.A., KLAENHAMMER T.R., 1991. *NISIN TREATMENT FOR INACTIVATION OF SALMONELLA SPECIES AND OTHER GRAM-NEGATIVE BACTERIA*. *APPL ENVIRON MICROBIOL.*, 57(12): P. 3613-3615.
- STILE M.E., HOLZAPFEL E.H., 1997. *LACTIC ACID BACTERIA OF FOOD AND THEIR CURRENT APPLICATIONS AND EFFECTS*. *MEAT SCI.*, 65: P. 953-948.
- STILES M.E., 1996. *BIOPRESERVATION BY LACTIC ACID BACTERIA*. *ANTONIE VAN LEEUWENHOEK*, 70(2-4): P. 331-345.
- STILES M.E., HOLZAPFEL W.H., 1997. *LACTIC ACID BACTERIA OF FOODS AND THEIR CURRENT TAXONOMY*. *JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY*, 36(1): P. 1-29.
- STORCH V., 1980. *NOGLE UNDERSØGELSER OVER FLØDENS*. EIGHTEENTH REPORT FROM THE ROYAL VETERINARY AND AGRICULTURAL UNIVERSITY, LABORATORY FOR AGRICULTURAL EXPERIMENTS, COPENHAGEN., 18 P.
- STRAUME D., KJOS M., NES I.F., DIEP D.B., 2007. *QUORUM-SENSING BASED BACTERIOCIN PRODUCTION IS DOWN-REGULATED BY N-TERMINALLY TRUNCATED SPECIES OF GENE ACTIVATORS*. *MOL GENET GENOMICS.*, 278(3): P. 283-293.
- STRÖM K., SCHNÜRER J., MELIN P., 2005. *COCULTIVATION OF ANTIFUNGAL LACTOBACILLUS PLANTARUM MILAB 393 AND ASPERGILLUS NIDULANS, EVALUATION OF EFFECTS ON FUNGAL GROWTH AND PROTEIN EXPRESSION*. *FEMS MICROBIOL LETT.* , 1(246): P. 119-124.
- SULLIVAN L.O., ROSS R.P., HILL C., 2002. *POTENTIAL OF BACTERIOCIN-PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA FOR IMPROVEMENTS IN FOOD SAFETY AND QUALITY*. *BIOCHIMIE*, 84: P. 593-604.
- TABAK S., BENSOLTANE A., 2011. *L'ACTIVITÉ ANTAGONISTE DES BACTÉRIES LACTIQUES (STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS, BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM ET LACTOBACILLUS BULGARICUS) VIS-À-VIS DE LA SOUCHE HELICOBACTER PYLORI RESPONSABLE DES MALADIES GASTRODUODÉNALES*. *NATURE & TECHNOLOGIE* 6: P. 71-79.

- TAGG J.R., DAJANI A.S., WANNAMAKER, L.W., 1976. *BACTERIOCINS OF GRAM-POSITIVE BACTERIA*. BACTERIOL REV, 40(3): P. 722-756.
- TAHIRI I. 2007. *ISOLEMENT, CARACTERISATION ET ÉTUDE DU POTENTIEL DE LA DIVERGICINE M35, POUR LA BIO-CONSERVATION DES PRODUITS MARINS PRÊTS À CONSOMMER*. PH.D, UNIVERSITÉ LAVAL, 168.
- TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M., KUMAR S., 2011. *MEGA5: MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS USING MAXIMUM LIKELIHOOD, EVOLUTIONARY DISTANCE, AND MAXIMUM PARSIMONY METHODS*. MOL BIOL EVOL. , 28(10): P. 2731-2739.
- TATUSOV R.L., 1997. *A GENOMIC PERSPECTIVE ON PROTEIN FAMILIES*. SCIENCE, 278(5338): P. 631-637.
- TATUSOV R.L., GALPERIN M.Y., NATALE D.A., KOONIN E.V., 2000. *THE COG DATABASE : A TOOL FOR GENOME-SCALE ANALYSIS OF PROTEIN FUNCTIONS AND EVOLUTION*. NUCLEIC ACIDS RES., 28(1): P. 33-36.
- TAYLOR J.I., HIRSCH A., MATTICK A.T.R., 1949. *THE TREATMENT OF BOVINE STREPTOCOCCAL AND STAPHYLOCOCCAL MASTITIS WITH NISIN*. VET. RES., 61: P. 197-198.
- TERZAGHI B.E., SANDINE W.E., 1975. *IMPROVED MEDIUM FOR LACTIC STREPTOCOCCI AND THEIR BACTERIOPHAGES*. . APPL MICROBIOL. , 29(6): P. 807-813.
- THI NGUYET THU H. 2008. *ÉTUDE DE LA FLORE LACTIQUE DU NEM CHUA, PRODUIT CARNÉ FERMENTÉ CRU TRADITIONNEL DU SUD VIETNAM ET MAÎTRISE DU PROCESSUS DE FERMENTATION PAR AJOUT DE SOUCHES LACTIQUES SÉLECTIONNÉES SPÉCIFIQUES DU PRODUIT*. THÈSE DE DOCTORAT, L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1, 182.
- TWOMEY D., ROSS R.P., RYAN M., MEANEY B., HILL C., 2002. *LANTIBIOTICS PRODUCED BY LACTIC ACID BACTERIA : STRUCTURE , FUNCTION AND APPLICATIONS*. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK. , 32(1-4): P. 165-185.
- UBI. 2010. *TRANSACTION D'ALGIE* [ONLINE]. AVAILABLE: [HTTP://TRANSACTIONDALGERIE.COM/](http://transactiondalgerie.com/).
- UHLMAN L., SCHILLINGER U., RUPNOW J.R., HOLZAPFEL W.H., 1992. *IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TWO BACTERIOCIN-PRODUCING STRAINS OF LACTOCOCCUS LACTIS ISOLATED FROM VEGETABLES*. INT J FOOD MICROBIOL. , 16(2): P. 141-151.
- US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1988. *NISIN PREPARATION: AFFIRMATION OF GRAS STATUS AS A DIRECT HUMAN FOOD INGREDIENT*. . FEDERAL REGISTER., 53: P. 11247–1125.
- VADYVALOO V., SNOEP J.L., HASTINGS J.W., RAUTENBACH M., 2004. *PHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS OF CLASS IIA BACTERIOCIN RESISTANCE IN LISTERIA MONOCYTOGENES STRAINS*. MICROBIOLOGY, 150(2): P. 335-340.

- VAN WELY K.H., SWAVING J., FREUDL R., DRIESSEN A.J., 2001. *TRANSLOCATION OF PROTEINS ACROSS THE CELL ENVELOPE OF GRAM-POSITIVE BACTERIA*. FEMS MICROBIOL REV., 25(4): P. 437-454.
- VANDAMME P., POT B., GILLIS M., DE VOS P., KERSTERS K., SWINGS J., 1996. *POLYPHASIC TAXONOMY, A CONSENSUS APPROACH TO BACTERIAL SYSTEMATICS*. MICROBIOL REV., 60(2): P. 407-438.
- VAZ-VELHO M., TODOROV S., RIBEIRO J., GIBBS P., 2005. *GROWTH CONTROL OF LISTERIA INNOCUA 2030C DURING PROCESSING AND STORAGE OF COLD-SMOKED SALMON-TROUT BY CARNOBACTERIUM DIVERGENS V41 CULTURE AND SUPERNATANT*. FOOD CONTROL, 16(6): P. 540-548.
- VENDRELL D., BALCÁZAR J.L., RUIZ-ZARZUELA I., DE BLAS I., GIRONÉS O., MÚZQUIZ J.L., 2006. *LACTOCOCCUS GARVIEAE IN FISH: A REVIEW*. COMPARATIVE IMMUNOLOGY, MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES, 29(4): P. 177-98.
- VESCOVO M., SCOLARI G., ZACCONI C., 2006. *INHIBITION OF LISTERIA INNOCUA GROWTH BY ANTIMICROBIAL-PRODUCING LACTIC ACID CULTURES IN VACUUM-PACKED COLD-SMOKED SALMON*. FOOD MICROBIOLOGY, 23(7): P. 689-93.
- VILLANI F., APONTE M., BLAIOTTA G., MAURIELLO G., PEPE O., MOSCHETTI G., 2001. *DETECTION AND CHARACTERIZATION OF A BACTERIOCIN, GARVIECIN LI-5, PRODUCED BY LACTOCOCCUS GARVIEAE ISOLATED FROM RAW COW'S MILK*. J APPL MICROBIOL., 90(3): P. 430-439.
- VLAEMYNCK G., HERMAN L., COUDIJZER K., 1994. *ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TWO BACTERIOCINS PRODUCED BY ENTEROCOCCUS FAECIU STRAINS INHIBITORY TO LISTERIA MONOCYTOGENES*. INT J FOOD MICROBIOL., 24(1-2): P. 211-225.
- VOS P., GARRITY G., JONES D., KRIEG N.R., LUDWIG W., RAINEY F.A., SCHLEIFER K.-H., WHITMAN W., 2009. *BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY: THE FIRMICUTES*. 2 ED., ED. VOL.: SPRINGER-VERLAG NEW YORK. 1450.
- WACHSMAN M., KULKA M., SMITH C.C., AURELIAN L., 2003. *A GROWTH AND LATENCY COMPROMISED HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 MUTANT (ICP10DELTA PK) HAS PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC PROTECTIVE ACTIVITY IN GUINEA PIGS*. VACCINE., 19(15-16): P. 1879-1890.
- WEIGMANN H., 1908. *PURE FERMENTS IN THE MANUFACTURE OF BUTTER*. INDUSTR. LAIT., 33: P. 18-19.
- WESSELS S., HUSS H.H., 1996. *SUITABILITY OF LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS ATCC 11454 AS A PROTECTIVE CULTURE FOR LIGHTLY PRESERVED FISH PRODUCTS*. FOOD MICROBIOLOGY., 13(4): P. 323-332.
- WHITEHEAD H.R., 1993. *A SUBSTANCE INHIBITING BACTERIAL GROWTH, PRODUCED BY CERTAIN STRAINS OF LACTIC STREPTOCOCCI*. BIOCHEM.J., 24(2): P. 1793-1800.
- WIEDEMANN I., BÖTTIGER T., BONELLI R.R., WIESE A., HAGGE S.O., GUTSMANN T., SEYDEL U., DEEGAN L., HILL C., ROSS P., SAHL H.G., 2006. *THE MODE OF ACTION*

- OF THE LANTIBIOTIC LACTICIN 3147 – A COMPLEX MECHANISM INVOLVING SPECIFIC INTERACTION OF TWO PEPTIDES AND THE CELL WALL PRECURSOR LIPID II.* MOL MICROBIOL. , 61(2): P. 285-296.
- WILLEY J.M., VAN DER DONK W.A., 2007. *LANTIBIOTICS: PEPTIDES OF DIVERSE STRUCTURE AND FUNCTION.* ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY, 61: P. 477-501.
- XIE L., VAN DER DONK W.A., 2004. *POT-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS DURING LANTIBIOTIC BIOSYNTHESIS.* CHEM. BIOL., 8((5)): P. 498-507.
- YAAKOUBI K., AMMOR S., HAYDERSAH J., CHEVALLIER I., 2006. *ACTIVITES ANTI-BACTERIENNES DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES D'ATELIERS FERMIERS DE SALAISON 11ÈMES JSMTV - CLERMONT FD:* P. 175-176.
- YILDIZ F., 2010. *DEVELOPMENT AND MANUFACTURE OF YOGURT AND OTHER FUNCTIONAL DAIRY PRODUCTS* ED., ED. VOL.: CRC PRESS, TAYLOR AND FRANCIS GROUP. USA. 451.
- YIU K.H., SIU C.W., KAI-WANG TO K., JIM M.H., LEE K.L.F., KLAU C.P., TSE H.F., 2007. *A RARE CAUSE OF INFECTIVE ENDOCARDITIS; LACTOCOCCUS GARVIEAE.* INTERNATIONAL JOURNAL OF CARDIOLOGY, 114(2): P. 286-287.
- YUN X., HU J., CHEN Q., 2006. *SCREENING, ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NISIN RESISTANCE DETERMINANT GENE IN STRAINS OF LACTOCOCCUS LACTIS.* NAN FANG YI KE DA XUE XUE BAO. , 26(6): P. 839-842.
- ZADI-KARAM H., KARAM N.E., 2005. *BACTÉRIES LACTIQUES DU LAIT DE CHAMELLE LACTIC ACID BACTERIA FROM CAMEL MILK.* RENC. RÉCH. RUMINANTS, 12: P. 399.
- ZADI-KARAM H., KARAM N.E., 2006. *BACTÉRIES LACTIQUES DU LAIT DE CHAMELLE D ' ALGÉRIE : MISE EN ÉVIDENCE DE SOUCHES DE LACTOCOCCUS RÉSISTANTES AU SEL.* TROPICULTURA. , 24(3): P. 153-156.
- ZUILY S., MAMI Z., MEUNE C., 2011. *LACTOCOCCUS GARVIEAE ENDOCARDITIS.* ARCHIVES OF CARDIOVASCULAR DISEASES, 104(2): P. 138-139.



ANNEXES

ANNEXES

Annexe I

Matériel utilisé

1- Appareillage :

- Étuve ;
- Bain marie agitateur ;
- Autoclave ;
- Réfrigérateur ;
- Congélateur ;
- Vortex ;
- Balance ;
- Centrifugeuse réfrigérée ;
- Agitateur et barreau magnétique ;
- Cuve d'électrophorèse ;
- Microscope optique (objectif à immersion).
- Microscope électronique.
- Spectrophotomètre de masse.
- Hôte à flux laminaire.
- Hôte chimique.

2- Autre matériel :

- Bec bunsen ;
- Anse de platine ;
- Boîte de pétri ;
- Ependorffs ;
- Portoirs ;
- Micropipettes et cônes ;
- Lampe à UV ;

Annexe II

II- 1- Milieux de culture de la flore non lactique : la composition est en g/L

- Gélose PCA (Guiraud, 2003).

Composé	Composition en g/l
Peptone	05
Extrait de levure	2.5
Glucose	01
Ajuster le pH à 7.2 et stériliser 20 min à 120°C	

- Gélose désoxycholate (Guiraud, 2003).

Composé	Composition en g/l
Peptone	10
Lactose	10
Désoxycholate de sodium	0.5
Chlorure de sodium	05
Rouge neutre	0.03
Agar	12
1000 ml d'eau distillée	
Ajuster le pH à 7.1 puis stériliser à 115°C pendant 20min	

- Bouillon Rothe (Guiraud, 2003).

Composé	Composition en g/l
Peptone	20
Glucose	5
Azide de sodium	0.2

Annexe II

Chlorure de sodium	5
Phosphate bi potassique	2.7
Phosphate mono potassique	2.7
Ajuster le pH à 7	

➤ **Bouillon Litsky**

Composé	Composition en g/l
Peptone	20
Glucose	5
Azide	0.2
Ethyl-violet	0.5
NaCl	5
Hydrogénophosphate de potassium	2.7
Dihydrogénophosphate de potassium	2.7
Ajuster le pH à 6.8	

➤ **Gélose Sabouraud**

Composé	Composition en g/l
Peptone	10
Glucose massé	20
Agar-agar	15
Eau distillée (qsp)	1000 ml
Vitamines et facteurs de croissance	
Ajuster le pH à 6.	

➤ Gélose Chapman (Guiraud, 2003).

Composé	Composition en g/l
Extrait de viande	01

Annexe II

Peptone	10
Chlorure de sodium	05
Mannitol	10
Rouge de phénol	0.025
Agar	15
1000 ml d'eau distillée qsp	
Ajuster le pH à 7.4 et stériliser 15min à 120°C.	

➤ Brain heart infusion (BHI) (Guiraud, 2003).

Composé	Composition en g/l
Protéose peptone	10
Infusion de cervelle de veau	12.5
Infusion de cœur de boeuf	5
Chlorure de sodium	5
Phosphate disodique	2.5
Glucose	2
1000 ml d'eau distillée qsp	
Ajuster le pH à 7.4 et stériliser à 120° C pendant 15min.	

➤ **Gélose Viande foie :**

Composé	Composition en g/l
Base viande foie	30
Glucose	2
Agar	6
Pour 1 L de milieu viande foie, ajuster le pH à 7.4	

Annexe II

- Solution tampon phosphate (MA700PA10)

Dissoudre 34 g de KH_2PO_4 anhydre dans environ 500 ml d'eau

Ajuster le pH à 7.2 avec une solution de NaOH 1N

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à 4 °C

Bouillon sélénite.

Composé	Composition en g/l
Tryptone	5
Lactose	4
Sélénite	4
Hydrogénosélénite de sodium	4
1000 ml d'eau distillé	

- Gélose Hektoen (Guiraud, 2003).

Composé	Composition en g/l
Protéose-peptone	12
Extrait de levure	3
Chlorure de sodium	5
Thiosulfate de sodium	5
Sels biliaires	9
Citrate de fer ammoniacal	1.5
Salicine	2
Lactose	12
Saccharose	12
Fuschine acide	0.01
Bleu de bromothymol	0.065

Annexe II

Agar	13
1000 ml d'eau distillée	
Ajuster le pH à 7.6, Stériliser 5min à ébullition.	

➤ Bouillon Muler Hinton

Composé	Composition en g/l
Peptone de caséine	17.5
Amidon de maïs	1.5
Infusion de viande de bœuf	300 ml
Agar	17
Ajuster le pH à 7.4	

Milieu Urée Indole

Composé	Composition en g/L
Tryptophane	3
Urée	20
KH ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	1
NaCl	5
Alcool à 95°C	10 ml
Rouge de phénol	2.5 ml
1000 ml d'eau	

Annexe II

- Milieu de Kligler-Hajna (Denis, 2007, Fiches Techniques).

Composé	Composition en g/L
Peptone	15
Extrait de viande	3
Extrait de levure	3
Peptone pepsique de viande	5
Glucose	1
Lactose	10
Rouge de phénol	0.025
Chlorure de sodium	5
Sulfate ferreux	0.2
Thiosulfate de sodium	0.3
Agar-agar	11
Ajuster le pH à 7,5.	

II- 2- Milieux de culture des bactéries lactiques :

- Bouillon nitraté (Guiraud, 2003).

Composé	Composition en g/l
Bouillon nutritif	1000 ml
Nitrate de potassium	1
Ajuster le pH à 7 en tubes à essais (7 à 10ml). Stériliser 15 min à 121°C.	

- Bouillon hyper salé (Bourgeois *et al.*, 1991).

Composé	Composition en g/l
Bouillon nutritif	1000 ml

Annexe II

Glucose	05
Extrait de viande	05
Peptone	15
NaCl	65
1000 ml d'eau distillée	
Ajuster le pH à 7.5. Stériliser 20 min à 121°C.	

Pour le bouillon hyper salé à 4%, peser respectivement 40 g et au lieu de 65 g.

➤ Lait citraté

Répartir le lait écrémé à 10 % en tubes à essais (10,5 ml par tube) et stériliser par tyndallisation trois fois à 100°C pendant 30min à 24h d'intervalle. Rajouter aseptiquement dans chaque tube 0,5 ml d'une solution de citrate de sodium à 10% stérile (20 ml à 120 °C). Le milieu inoculé est versé dans des tubes contenant 4 ml de gélose blanche à 2 % stérile et maintenu à 45 °C, puis solidifier en culot avant d'incuber.

➤ Gélose blanche

Composé	Composition en g/l
Agar- Agar	20
Eau distillée q.s.p	1000 ml

➤ Lait de Sherman (Leveau *et al.*, 1980).

Composé	Composition en g/l
lait écrémé à 10 % stérilisé	9 ml
Bleu de méthylène à 1 % stérilisé	1 ml

Au moment de l'emploi, on mélange le lait écrémé avec le bleu de méthylène pour obtenir du lait à 0.1 % de bleu de méthylène.

➤ Milieu MRS (De MAN *et al.*, 1980).

Composé	Composition en g/l
Peptone	10

Annexe II

Extrait de viande	8
Extrait de levure déshydraté	4
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	20
Tween 80 (sorbitane monoléate)	1ml
Hydrogène -orthophosphate dipotassique K ₂ HPO ₄	2
Acétate de sodium tri hydraté (H ₂ CO ₂ , 3 H ₂ O)	5
Citrate de diammonique (C ₆ H ₆ O ₇ (NH ₄) ₂)	2
Sulfate de magnésium hydraté (HOSO ₄ 7H ₂ O)	2
Sulfate de manganèse tétra hydraté (MnSO ₄ ,4H ₂ O)	0.5
Agar-agar	15
1000 ml d'eau distillée q.s.p	

Dissoudre les composants dans de l'eau bouillante, laisser refroidir à 50 °C ± 1 °C et ajuster le pH à l'aide des réactifs en contrôlant avec un pH mètre, de sorte qu'après stérilisation il soit de 6.2 à 25 °C ± 1°C. Répartir dans des flacons de 250 ml et stériliser à 121 °C ± 1°C pendant 15 min.

➤ Milieu M17 (Terzaghi *et al.*, 1975).

Composé	Composition en g/l
Peptone trypsique de caséine	2.5
Peptone pepsique de viande	2.5
Peptone papainique de soja	05
Extrait de levure déshydraté	2.5
Extrait de viande	05
Glycérophosphate de sodium	19
Sulfate de magnésium héptahydraté (MgSO ₄ , 7 H ₂ O)	0.25
Acide ascorbique	0.5
Agar-agar	10
1000 ml d'eau distillée qsp	
Ajuster le pH à 7,2 puis autoclaver 15min à 121°C.	

Annexe II

Dissoudre les composants dans de l'eau bouillante, laisser refroidir à $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ et ajuster le pH à l'aide des réactifs en contrôlant avec un pH mètre, de sorte qu'après stérilisation il soit de 7.1 à $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Répartir dans des flacons de 250 ml et stériliser à $120\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 20 min.

➤ Milieu à la gélatine (Guiraud, 2003).

Composé	Composition en g/l
Peptone	10
Extrait de viande	04
NaCl	2.5
Gélatine	120
1000 ml d'eau distillée	
Ajuster le pH à 6,8 puis répartir en tubes, stériliser 25min à 121°C .	

Isolement et identification des bactéries lactiques et étude de l'effet antagoniste vis-à-vis des germes pathogènes

RÉSUMÉ

Les bactéries lactiques jouent un rôle de premier plan dans la fabrication de produits alimentaires fermentés. Elles contribuent à l'amélioration du goût, de l'aspect et de l'innocuité microbiologique de l'aliment. Ces bactéries produisent en effet une variété de composés à action antimicrobienne tels les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines.

Dans le présent travail, une collection de souches lactiques a été établie, elle comprend 50 souches isolées à partir de 44 échantillons de produits laitiers fermentés de façon artisanale et identifiées sur la base d'un certain nombre de caractères phénotypique, physiologique, biochimique (API 50 CHL) et moléculaire (MALDI-TOF MS). Sur un total de 50 souches testées pour leurs activités antimicrobienne par les deux méthodes ; de double couche et celles de diffusion en gélose, 10 sont confirmées productrices de substances antimicrobiennes. Cependant, la recherche de l'activité antimicrobienne dans des conditions qui éliminent l'effet des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène a permis de cribler une seule souche bactériocinogène qui est *Lactococcus garvieae* M14.

Le génome de *L. garvieae* M14 est constitué d'un seul chromosome linéaire (2, 188,835 pb) avec une teneur en G + C % de 37.69 et quatre plasmides dont la taille varie de 1,095 à 42,306 pb, dont un plasmide circulaire. D'autres analyses du génome de la souche M14 ont révélé une capacité métabolique pour former l'acide lactique au cours de la fermentation qui est très utile pour des applications industrielles, ainsi que la présence de deux bactériocines responsables d'éventuelles propriétés bio-protectrices, nous avons identifié dans le génome de *L. garvieae* M14 deux bactériocines qui sont localisés dans le chromosome. La première bactériocine a une longueur de 64 aa et la deuxième de 184 aa et correspond à une colicine V.

MOTS CLÉS : Lait fermenté, Bactéries lactiques, antagonisme, MALDI-TOFF MS, Séquençage du génome, Protéomique.

MERYEM MOUMENE

Prof : D. E. BENOURETH

2016

