



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : des sciences de la nature et de la vie



MEMOIRE DE MASTER

Domaine : des sciences de la nature et de la vie

Filière : sciences biologiques

Option : microbiologie appliquée

Thème :

**Inhibition des bactéries multi résistantes aux antibiotiques
par des bactéries lactiques autochtones isolées de produits
laitiers.**

Présenté par :

**ZOUARI Souad
BENARFA Taki eddine**

Devant le jury :

Dr.Boukoucha.M	M.C.B	Université de Tébessa	Président
Dr.Mechai.A	M.C.A	Université de Tébessa	Promoteur
Dr.Debabza.M	M.C.B	Université de Tébessa	CoPromoteur
M. Zouaoui.N	M.A.A	Université de Tébessa	Examineur

Date de soutenance: 26 Mai 2018

Note :..... Mention :.....

ملخص.

تلعب بكتيريا حمض اللاكتيك دورا رئيسيا في تصنيع المنتجات الغذائية المتخمرة. إنها تساهم في تحسين الذوق والمظهر والسلامة الميكروبيولوجية للأغذية. هذه البكتيريا تنتج مجموعة متنوعة من المركبات المضادة للميكروبات مثل الأحماض العضوية، بيروكسيد الهيدروجين، ثنائي الأسيتيل والبكتريوسينات. ركز هذا العمل على دراسة إمكانات البكتيريا المعزولة من السلالات المعزولة من منتجات الألبان الحرفية.

وقد تم إنشاء مجموعة من سلالات حمض اللاكتيك، تضم 34 سلالة معزولة عن 8 عينات من منتجات الألبان الجزائرية وتم تحديدها على أساس عدد من السمات المظهرية والفسولوجية والكيميائية الحيوية. من السلالات في مجموعتنا، تم تحديد 10 سلالات من بكتيريا حمض اللاكتيك على مستوى الأنواع من خلال API 50 CHL. هذه هي الأنواع:

Lb. plantarum (سلالة), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (سلالتان), *Enterococcus faecalis* (سلالتان), *Pediococcus pentosaceus* (ثلاثة سلالات), *Lb. pentosus* (سلالة), *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (سلالة).

إن الأنشطة المضادة للميكروبات التي تنتجها السلالات العشرة المختارة لها طيف واسع النطاق موجه ضد البكتيريا الموجبة لصبغة جرام (*staphylococcus aureus*)، والبكتيريا المسببة للأمراض سلبية الجرام بما في ذلك البكتيريا الممرضة المقاومة للأدوية المتعددة،

(*Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *En. cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e01, *Klebsiella pneumoniae* 01, *Klebsiella pneumoniae* 04, *Klebsiella pneumoniae* 11, *Klebsiella pneumoniae* 20, *Klebsiella pneumoniae* 21, *Klebsiella pneumoniae* 58, *Klebsiella pneumoniae* 59).

الكلمات المفتاحية: بكتيريا حمض اللاكتيك، إمكانات تثبيطية، بكتريوسينوجين، بكتريوسين، مقاومة للأدوية المتعددة، مسببات الأمراض

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. Ce travail a porté sur l'étude du potentiel bactériocinogène de souches isolées des produits laitiers artisanaux.

Une collection de souches lactiques a été établie, elle comprend 42 souches isolées à partir 08 échantillons de produits laitiers Algériens et identifiées sur la base d'un certain nombre de caractères phénotypiques, physiologiques et biochimiques.

Parmi l'ensemble des souches de notre collection, 10 souches de bactéries lactiques ont été identifiées au niveau de l'espèce en utilisant la galerie API 50 CHL. Il s'agit des espèces ; *Lb. plantarum* (une souche), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (deux souches), *Enterococcus faecalis* (deux souches), *Pediococcus pentosaceus* (trois souches), *Lb. pentosus* (une souche), *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (une souche).

Les activités antimicrobiennes produites par les 10 souches sélectionnées possèdent de larges spectres d'activité dirigée contre les bactéries Gram+ (*Staphylococcus aureus*) et les bactéries pathogènes Gram négatifs englobant les bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques, (*Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *En. cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* 01, *Klebsiella pneumoniae* 04, *Klebsiella pneumoniae* 11, *Klebsiella pneumoniae* 20, *Klebsiella pneumoniae* 21, *Klebsiella pneumoniae* 58, *Klebsiella pneumoniae* 59).

Mots clés : Bactéries lactiques, potentiel inhibiteur, bactériocinogène, bactériocine, multirésistance, pathogènes.

Summary

Lactic acid bacteria play an important role in the manufacture of fermented food products. They contribute to improving the taste, appearance and microbiological safety of the food. These bacteria produce a variety of antimicrobial compounds such as organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl and bacteriocins. This work is focused on the study of the bacteriocinogenic potential of Lactic acid bacteria strains isolated from artisanal dairy products.

A collection of lactic acid bacteria strains has been established, comprising 42 strains isolated from 08 samples of Algerian dairy products and identified on the basis of a number of phenotypic, physiological and biochemical characters.

From the overall strains of our collection, 10 strains were identified at the species level by using the API 50 CHL. These are the species; *Lb. plantarum* (1 strain), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (two strains), *Enterococcus faecalis* (two strains), *Pediococcus pentosaceus* (three strains), *Lb. pentosus* (1strain) and *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (1 strain).

The antimicrobial activities produced by the 10 selected strains have a broad spectrum activity directed against Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) and Gram negative pathogenic bacteria including antibiotic-resistant multiresistant bacteria (*Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *En. cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* 01, *Klebsiella pneumoniae* 04, *Klebsiella pneumoniae* 11, *Klebsiella pneumoniae* 20, *Klebsiella pneumoniae* 21, *Klebsiella pneumoniae* 58, *Klebsiella pneumoniae* 59).

Key words: lactic acid bacteria, inhibitory potential, bacteriocinogenic, bacteriocin, multidrug resistance, pathogens.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, longue vie à « Allah » qui nous a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et nous a inspiré les bons pas et les justes réflexes. Sans sa miséricorde, ce travail n'aurait pas abouti.

*L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par **Dr. Mechai Abdelbasset**, maître de conférence classe A à la faculté des sciences de la Nature et de la vie, Université Tébessa. Nous tenons vivement à lui exprimer nos profonde reconnaissances gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour notre sujet de travail. Nous le remercions de nous avoir fait confiance et d'avoir été présent aussi souvent que possible malgré ses tâches pédagogiques. Son soutien permanent et son dynamisme nous ont permis d'avancer plus loin dans notre travail.*

Nos remerciements vont aussi à

*Mr. **Boukoucha.M**, d'avoir ménagé son temps pour présider ce jury
Mr. **Zouaoui** pour avoir bien voulu siéger dans ce jury afin d'examiner et critiquer ce mémoire et nous éclairer par ces précieux conseils.*

*Mme. **Mechai***

*Aucun remerciement ne saurait exprimer notre respect et considération pour les orientations que vous avez consentis pour notre étude à l'Université.
Mme **Fenghour**, Mme **Benhadj**, Mme **Azizi**, Mr **Menasria** et tous les enseignants qui ont participé à notre formation durant ces 5 années. Merci pour votre encouragement et gentillesse.*

Tous nos amis pour leur solidarité

La meilleure équipe, l'équipe de la microbiologie

A nos parents

Pour l'enfance merveilleuse qu'ils nous ont offerte ainsi que pour leurs encouragements.

Pour leurs soutiens et leurs aides.

Avec tout notre amour.

A tous nos amis

Pour leurs bonnes humeurs, leurs gentillesse et pour tous nos fous rires partagés.

Pour tout ce qu'ils nous ont appris

Merci à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ce travail, et que nous ne pouvons citer individuellement.

DEDICACES

Je dédie ce travail de fin d'études à :

A mes parents Zouari Laid et Daas Mouna

A mon frère unique Ismail et mes sœurs Nour, Meryem.

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter.

En reconnaissance de tous les sacrifices consentis par tous et

Chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

Avec toute ma tendresse.

A mes oncles, tantes, cousins et cousines de la famille Zouari et Daas sans

exception.

Vous avez de près ou de loin contribué à ma formation.

Affectueuse reconnaissance.

A mes amis intimes Amel, Rima, Nesrine, Nadjette.

A mes camarades de la promotion de la microbiologique 2017/2018.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce

Projet soit possible, je vous dis merci.

A tous les habitants de mon petit village (Hammamet).

DEDICACES

Je dédie ce travail

À ma cher Maman

À ma famille : Naoui, Ma grand-mère, ma tante et mes oncles

À mon frère : Daoud

À tous mes Amis, les proches et les plus proches.

Taki

Liste des tableaux

Numéro		Page
Tableau 01	Classification des groupes du genre <i>lactobacillus</i> (Axellsson, 1998).	17
Tableau 02	Les classe des Bactériocines produites par les bactéries lactiques (Ouwehand et Vesterlund, 2004).	29
Tableau 03	les principales bactériocines produites par certaines espèces de bactéries lactique letterature (Dortu et Thonart, 2009).	33
Tableau 04	Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire et exemples des espèces prédominantes (d'après McKay et Baldwin, 1990).	35
Tableau 05	Effets positifs des probiotiques sur la santé (effets probables ou suspectés) (Moroni, 2007).	38
Tableau 06	Morphologie des souches lactiques étudiées.	49
Tableau 07a	profils fermentaires des isolats par les galeries API 50 CHL.	57
Tableau 07b	profils fermentaires des isolats par les galeries API 50 CHL.	59
Tableau 08a	Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques par la méthode de Barefoot et Kaenhammer (1983).	64
Tableau 08b	Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques par la méthode de Barefoot et Kaenhammer (1983).	65

Liste des figures

Numéro		Page
Figure 01	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés , obtenu par des ARNr 16S (Mechai 2009).	9
Figure 02	Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries Gram positif.	32
Figure 03	Schéma représentant les méthodes de détection de l'antagonisme bactérien, adaptées d'après la méthode de diffusion en puits de Méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983).	52
Figure 04	Aspect des colonies de bactéries lactiques sur le milieu MRS	53
Figure 05	Distribution du pourcentage des isolats lactiques (%)	54
Figure 06	Différente forme microscopique de bactéries lactiques obtenues au laboratoire de microbiologie appliquée. <i>Lb.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> (A), <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (B), <i>Pedicoccus pentosaceus</i> 1 (C), <i>Pedicoccus pentosaceus</i> 2 (D) .	54
Figure 07	Résultat du profil fermentaire de la souche: <i>Lb. plantarum</i> sur la galerie API 50 CHL après 48 h d'incubation.	56
Figure 08	Résultat du profil fermentaire de la souche: <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> 01 sur la galerie API 50 CHL après 48 h d'incubation.	56
Figure 09	Inhibition de <i>Salmonella typhi</i> (A), (B) <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 (C) par les extraits actifs des souches bactériocinogènes (S1, S2, S3, S4, S5, S12, S14, S15 et S16).	62
Figure 10	inhibition <i>Staphylococcus aureus</i> 07(A) et <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (B) par les extraits actifs des souches bactériocinogènes (S2, S3, S4, S5, S14, S15 et S16).	62
Figure 11	activité antimicrobienne des souches lactiques (S1, S2, S3, S4, S5, S14, S15 et S16) contre les souches indicatrices ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> 21 (A), <i>Klebsiella pneumoniae</i> 20 (B) et <i>Klebsiella pneumoniae</i> 11 (C).	63
Figure 12	activité antimicrobienne des souches lactiques (S1, S2, S3, S4, S5, S14, S15 et S16) contre les souches indicatrices ; <i>En. cloacae</i> (A), <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (B).	63

Liste des abréviations

<p>Ac : acide</p> <p>ADH : Arginine dihydrolase</p> <p>ATCC : American Type of culture collection</p> <p>BL/LAB : Bactéries Lactiques/Lactic Acid Bacteria</p> <p>CFU/ml : Unité formant colonie par millilitre</p> <p>DEAE : diéthylaminoéthyl</p> <p>EDTA : acide éthylènediamine tétra acétique</p> <p>ml : millilitre,</p> <p>ssp/ subsp : sous-espèce</p> <p>U. A/ ml : unités arbitraires d'activité par millilitre</p> <p>M17 : Milieu complexe à base d'extrait de viande, de peptone et d'extrait de levure.</p> <p>GN : gélose nutritive</p>	<p>MRS :de Man, Rogosa et scharpe</p> <p>MH : Muller Hinton</p> <p>Abréviations utilisé pour les genres microbiens</p> <p><i>Cb</i> : <i>Carnobacterium</i></p> <p><i>En</i> : <i>Enterococcus</i></p> <p><i>L</i> : <i>Lesteria . monocytogenes</i></p> <p><i>Lb</i> : <i>Lactobacillus</i></p> <p><i>Lc</i> : <i>Lactococcus</i></p> <p><i>Ln</i> : <i>Leuconostoc</i></p> <p><i>S</i> : <i>Sporolactobacillus</i></p> <p><i>Sc</i> : <i>Streptococcus</i></p> <p><i>P</i> : <i>Pediococcus</i></p> <p><i>W</i> : <i>Weissella</i></p>
--	---

Table des Matières	
ملخص	
Résumé	
Summary	
REMERCIEMENTS	
DEDICACES	
DEDICACES	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction générale	01
1 Les Bactéries lactiques	03
1.1 Définition.....	03
1.2 Habitat et origine.....	04
1.3 Génétique des bactéries lactiques.....	04
1.4 Caractéristiques générales des bactéries lactiques.....	05
1.4.1 Les caractères morphologiques.....	05
1.4.2 Les caractères physiologiques et biochimiques.....	05
1.4.3 Les caractères structuraux.....	05
1.5 Exigences nutritionnelles.....	06
1.5.1 Exigence en vitamines.....	06
1.5.2 Exigence en sources azotées.....	06
1.5.3 Influence des cations.....	06
1.6 Taxonomie et relation génétique entre l'espèce de bactéries lactiques.....	07
1.7 Classification des bactéries lactiques.....	09
1.7.1 Classification de genre.....	09
1.7.1.1 Les genres Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus et Vagococcus.....	10
1.7.1.2 Les genres Aeorococcus, Pediococcus et Tetragenococcus.....	13
1.7.1.3 Le genre Leuconostoc, Oenococcus et Weissella.....	14
1.7.1.4 Le genre Lactobacillus et Carnobacterium.....	15
1.8 Application industrielle des bactéries lactiques.....	17
1.8.1 Activité acidifiante.....	17
1.8.2 Production de métabolites d'intérêt.....	17
1.8.3 Propriétés enzymatiques.....	18
1.8.4 Propriétés probiotiques.....	18
1.8.5 Critères de performance.....	18
2 Activité antimicrobienne des Bactéries lactiques.....	19
2.1 Différentes interactions existantes chez les bactéries lactiques.....	19
2.1.1 Phénomène de stimulation.....	19
2.1.2 Phénomène d'inhibition.....	20
2.2 Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques.....	21
2.2.1 Le pH et l'acide organique.....	21
2.2.2 Peroxyde d'hydrogène.....	22
2.2.3 Dioxyde de carbone (CO ₂)	23

2.2.4 Le diacétyle (C ₄ H ₆ O ₂).....	24
2.2.5 Acide lactique.....	24
2.2.6 Acides gras insaturés.....	25
2.2.7 Reutéline et la reutélicycline.....	25
2.2.8 Les bactériocines.....	26
2.2.8.1 Classification des bactériocines.....	27
2.2.8.2 Mode d'action des bactériocines.....	28
2.2.8.2.1 Les antibiotiques.....	29
2.2.8.2.2 Les bactériocines de classe II.....	29
2.2.8.2.3 Les bactériocines de classe III.....	30
3 Aptitude probiotiques et l'utilisation industrielle des bactéries lactiques.....	32
3.1 Rôles probiotiques des bactéries lactiques.....	33
3.1.1 Critères de sélection des souches probiotiques.....	33
3.1.2 Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé.....	35
3.1.3 La bio-conservation par les bactériocines des bactéries lactiques.....	36
3.1.4 Les stratégies d'Utilisation des bactériocines dans les aliments.....	38
3.1.4.1 Ajout de bactéries lactiques bactériocinogènes.....	38
3.1.4.2 Ajout de bactériocines pures ou semi-purifiées.....	39
3.1.4.3 Ajout de bio-ingrédient concentré à base de bactériocine.....	39
3.2 Généralités sur les entérobactéries.....	41
3.3 Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques.....	41
3.3.1 Définition.	41
3.3.2 Mécanisme de résistance.....	41
4 Matériels et méthodes.....	43
4.1 Lieu d'étude.....	43
4.2 Objectives d'étude.....	43
4.3 Matériel utilisé.....	43
4.3.1 Milieux de culture.	43
4.3.2 Matériel biologique et produits chimiques.....	43
4.4 Méthodes.....	44
4.4.1 Isolement, purification et conservation des souches.....	44
4.4.2 Identification des bactéries lactiques isolées.....	45
4.4.2.1 Examen microscopique.....	45
4.4.2.2 Tests physiologiques et biochimiques.....	45
4.4.2.3 Identification par la galerie API 50CHL.....	46
4.4.3 Etude de l'activité antibactérienne des souches lactiques.....	47
4.4.3.1 Souches bactériennes et leurs origines.....	47
4.4.3.2 Souches de références.....	51
4.4.3.3 Les bactéries utilisées (témoins négatifs) comme souches tests.....	51
4.4.4 Criblage des souches à activité antimicrobienne.....	51
4.4.4.1 Méthode de détection indirecte.....	51
4.4.4.2 Mesure de l'activité antimicrobienne.....	52
5 Résultats.....	53
5.1 Pré-Identification des isolats.....	53

5.1.1 Aspect macroscopique.....	53
5.1.2 Test de catalase.....	53
5.1.3 Aspect microscopique.....	53
5.2 Identification des souches.....	56
5.2.1 La galerie API 50 CHL.....	56
5.3 Activité antibactérienne des souches sélectionnées.....	61
5.3.1 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne	62
6 Discussion.....	68
6.1 Facteurs antibactériens produits par les lactobacilles.....	70
6.2 Facteurs antibactériens produits par <i>Pediococcus pentosaceus</i> 01 et 02.....	73
6.3 Facteurs antibactériens produits par <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> 01 et 02.....	73
6.4 Facteurs antibactériens produits par <i>Enterococcus faecalis</i> 01 et 02.....	74
Conclusion générale.....	75
Référence Bibliographiques.....	78
Annexes .	

Introduction générale

Les bactéries lactiques sont des microorganismes très répandus dans la nature et sont généralement reconnues comme étant saines, de statut "GRAS" (Generally Recognized As Safe). Elles 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 (bendimerad, 2013). Elles sont largement employées dans la préparation de nombreux aliments fermentés (yaourts, laits fermentés, fromages, etc...). En plus de leur rôle technologique, elles réalisent dans les aliments une acidification, une production d'arômes, une production d'enzymes permettant d'améliorer la digestibilité des aliments et une inhibition des microorganismes qu'elle soit pathogène ou d'altération. Cette dernière activité est due à la production de substances antagonistes tels que les acides organiques (acétique et lactique), le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines (Lasagno *et al.*, 2002; De Vuyst et Leroy, 2007).

La bio-conservation ou bien la technologie dite «douce» de conservation des aliments est une conservation naturelle qui préserve les propriétés organoleptiques et nutritionnelles de l'aliment, par l'utilisation de microorganismes vivants (Gálvez *et al.*, 2007). Ceci résulte en une réduction logique du recours aux conservateurs "chimiques", dont certains ont montré des effets indésirables sur la santé de l'Homme, ainsi qu'aux traitements thermiques souvent préjudiciables aux propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments. La bio-conservation par les bactéries lactiques est due à leurs capacités à produire plusieurs métabolites antimicrobiens, tels que les acides organiques (acide lactique, acide acétique,...), le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, le diacétyl, la reutérine, le dioxyde de carbone et les bactériocines (Klaenhammer 1988). Ces dernières, font depuis quelques décennies, l'objet d'innombrables études notamment dans l'objectif d'applications alimentaires. Elles ont un spectre d'activité plus ou moins large (Cotter *et al.*, 2005), qui, souvent, inclut des bactéries pathogènes. Certaines bactériocines ont une activité antimicrobienne qui s'étale jusqu'aux protozoaires, levures, champignons et virus (Reddy *et al.*, 2004). Leur dégradation par les enzymes protéolytiques, en particulier les protéases du tractus gastro-intestinal des mammifères, ainsi que l'absence de toxicité pour l'Homme, rendent leur consommation sans danger (Zacharof et Lovittb 2012). Le spectre d'activité des bactériocines, leur capacité à inhiber des bactéries pathogènes, leur thermo-stabilité et leur résistance aux variations de pH, sont les principales caractéristiques

qui doivent être prises en compte lors de la sélection des souches productrices pour des applications dans l'industrie agroalimentaire (Gálvez *et al.*, 2007).

En plus des applications alimentaires, les bactériocines ont un immense potentiel dans le domaine médical. Elles peuvent être utilisées contre différentes infections causées par des bactéries pathogènes et même contre certains antibio-résistants notoires.

Dans ces conditions, il apparaît intéressant et utile de collecter et de sélectionner de nouvelles souches de bactéries, issues de différents biotopes naturels, afin d'en exploiter les propriétés technologiques et particulièrement leur capacité à produire des métabolites antimicrobiens (Gálvez *et al.*, 2007).

Dans ce travail, nous nous sommes fixés l'objectif de parvenir à isoler et identifier des bactéries lactiques à partir du lait cru de chèvre de la région de Tébessa et d'un fromage traditionnel « Jben » dans la région de Tébessa, la partie suivante nous allons tenter de mettre en évidence les activités antagonistes des bactéries lactiques contre des bactéries pathogènes ou multi-résistantes aux antibiotiques en l'occurrence de *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus cloacea*, *Escherichia coli*, *Klesiella pneumonie* et *Pseudomona aeruginosa*.

ETUDE

BIBLIGRAPHIQUE

1 Les Bactéries lactiques

Depuis l'aube de l'humanité, les bactéries lactiques sont employées pour la fabrication et la conservation d'aliment .la découverte de leur action sur le lait fur probablement accidentelle, mais leur utilisation a été perpétuée sous forme de levains (Carr *et al.*, 2002).

Ces bactéries furent et sont encore utilisées sous forme de levains artisanaux, mais le développement de l'industrie laitière, a conduit à la production de ferments industriels capable d'assurer à la fois la constante du produit (Carr *et al.*, 2002).

Malgré leur importance économique, les bactéries lactiques n'ont pas toujours reçu l'attention nécessaire ni de la part des microbiologistes ni de celle des industriels.

Depuis quelques années, elles deviennent un sujet d'étude privilégié de part le monde (Thapa,2005). Elles sont utilisées dans la préparation de nombreux aliments : produits laitiers (fromage ,yaourts),carnés (saucissons) ,produits à base de poissons et de plantes (choucroute , olive fermentées ,ensilage) . Leur croissance s'accompagne d'une production d'acide lactique et de métabolites qui améliorent la conservation et les qualités organoleptiques des produits (Drouault et Coethier, 2001 :Carr *et al.* ,2002).

En plus de l'acide lactique, certaines produisent du gaz carbonique et divers composés, dont certains contribuent à l'arôme des produits laitiers. leur présence dans le tractus des mammifères limite l'implantation d'agents pathogènes tout en sécrétant des substances bénéfiques pour l'hôte (Drouault et Coethier, 2001 :Carr *et al.* ,2002) .

En effet, un certain nombre d'études cliniques chez l'homme ou sur des modèles animaux ont notamment confirmé l'effet bénéfique des laits fermentés et des yaourts dans le cas d'intolérance au lactose, de diarrhées virales ou de diarrhées associées à la prise d'antibiotiques (Sullivan et Nord .2005).

1.1 Définition

Les bactéries lactiques sont des procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes Gram positifs généralement immobiles, en formes de bâtonnet ou coque, jamais sporulées

(asporulées), catalase négatives , oxydase négatives , généralement nitrate réductase négatives. Ce sont des bactéries anaérobies mais, aérotolérantes ne liquéfient par la gélatine, ne produisent pas l'indole ni d'hydrogène sulfureux. Leur capacité de biosynthèse est faible, ce qui explique polyauxotrophie pour divers acide aminés, des bases nucléiques, des vitamines et des acides gras mais aussi leur métabolisme fermentaire, elles sont normalement dépourvues de cytochromes et en conséquence inaptes à toute respiration (Desmazeaud, 1983 ; Guiraud *et al* .,2003) .

Les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire qui, en utilisant des glucides, produisent soit exclusivement de l'acide lactique (bactéries homolactiques strictes), soit de l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives), soit de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'éthanol ou du CO₂ (bactéries hétérolactiques strictes) (Desmazeaud ,1994 :Carr *et al* .,2002).

1.2 Habitat et origine

Les bactéries lactiques ont été isolées dans nombreux milieux naturels végétaux, animaux et humains ; certaines espèces semblent adaptées à un environnement spécifique et ne semblent guère se retrouver ailleurs que dans leur habitat naturel. Grace à leur souplesse d'adaptation physiologique, les BL peuvent coloniser des milieux très différents du point de vue physico-chimique et biologique (Roissard et Luquet,1994).

Selon Desmazeaud (1992), les espèces du genre *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Leconostoc* se rencontrent plutôt chez les hommes, ainsi que chez les animaux. Dans le domaine laitier, elles existent en quantité considérable, les espèces du genre *Lactobacillus* sont encore plus répandues dans la nature, par exemple, on les trouve sur les végétaux ou elles assurent l'acidification de l'ensilage, on les trouve aussi dans l'intestin des animaux et de l'homme. Elles sont également isolées des cavités naturelles de l'organisme (cavités buccales et vaginales) (Roissard et Luquet, 1995).

1.3 Génétique des bactéries lactiques

Le matériel génétique des bactéries lactiques est organisé en deux structures : le chromosome, long filament d'ADN très replié sur lui-même, et les plasmides, petites molécules circulaires d'ADN indépendantes du chromosome, pouvant se répliquer de façon autonome. Les plasmides peuvent être perdus spontanément par la bactérie dans les conditions

de milieu défavorables (température élevée, privation nutritionnelles) ou éliminés par des traitements chimiques. Cette possibilité de perdre spontanément des plasmides explique l'instabilité des propriétés technologiques, due à l'apparition de variantes ayant perdu certains gènes et donc certaines fonctions métaboliques ainsi, la perte du plasmide codant pour la protéase de paroi rend les bactéries peu protéolytiques, et entraîne une croissance ralentie des germes et une acidification faible du lait.

D'autres caractères technologiques sont également codés par des gènes portés par des plasmides la capacité à utiliser le lactose, le métabolisme de précurseurs d'arômes, la production de la nisine chez certaine souches, des résistances aux bactériophage (Stackebrandt et Teuber , 1988 et Kandler et Weiss ,1986) .

1.4 Caractéristiques générales des bactéries lactiques

1.4.1 Les caractères morphologiques

- La forme : des cellules microbiennes représentent souvent un caractère distinctif de l'espace et du genre bactériens (coques ou bâtonnets).
- Le diamètre cellulaire : est un caractère plus stable que la longueur cellulaire.
- La mobilité : est une caractéristique rare chez les bactéries lactiques qui sont généralement non mobiles, sauf dans certains cas où elles possèdent des flagelles péritriches.
- La sporulation : toutes les bactéries lactiques sont non sporulées.
- La présence d'inclusion cellulaires, corpuscules métachromatiques ou de vultine, est un caractère distinctif de certaines espèces du genre *Lactobacillus* homofermentaires strict.

1.4.2 Les caractères physiologiques et biochimiques

Regroupement : La quantité et la configuration de l'acide lactique produit, la température de croissance minimale, optimale et maximale, la tolérance à l'oxygène et au chlorure de sodium, production de gaz et d'arome, la production d'ammoniaque à partir de l'arginine, la capacité d'hydrolyser l'esculine ou de résister aux sels biliaires et à différentes valeurs de PH (Luquet et de Roissars, 1994).

1.4.3 Les caractères structuraux

- L'analyse de ces composés cellulaires est entrain de devenir un instrument essentiel non seulement pour la classification mais aussi pour l'identification des bactéries.
- Les recherches chimiotaxonomiques réalisées sur les bactéries ont contribué de façon fondamentale à expliquer les relations génétiques intra et inter spécifiques (Sneath et al ., 1986) .

1.5 Exigences nutritionnelles

Les bactéries lactiques sont très exigeantes du point de vue nutritionnel. Elles requièrent plusieurs substrats complexes azotés, phosphatés et soufrés mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les cations (Desmazeaud ,1983).

1.5.1 Exigence en vitamines

Vis-à-vis des vitamines, toutes les espèces de lactobacilles présentent une exigence absolue pour le pantothénate de calcium (vitamine B5) et la riboflavine (vitamine B2) (sauf pour *Lb. reuteri* qui nécessite la thiamine-vitamine B1 et l'acide folique, *Lb. helveticus* exige la pyridoxine (vitamine B6) , *Lb. acidophiles* l'acide folique , *Lb. casei* la pyridoxine et l'acide folique.

Les lactocoques ont une exigence en niacine et en acide pantothéniques, Les streptocoques thermophiles ont une exigence absolue en acide pantothénique et en riboflavine leur croissance est stimulées par la thiamine et la niacine, la biotine et la pyridoxine (Luquet et de Roissard, 1994).

1.5.2 Exigence en sources azotées

Chez certaines souches des lactocoques, la production d'acide dans le lait peut être stimulée par le mélange, adénine, guanine, uracile et xanthine. Dans les milieux synthétiques, les lactobacilles exigent la présence d'adénine, de cytosine, de désoxyguanosine, de guanine, de thymidine et d'uracile (Law et Kolstard ,1988).

1.5.3 Influence des cations

La supplémentation du lait avec 1 à 2 Mm en ions Mg^{2+} permet la stimulation de la croissance de ce thermophiles et *Lactococcus lactis* et un meilleur taux du servie, cet ion serait indispensable pour la croissance de *Lb . helverticus* et essentiel pour celle de *Lb . lactis* et *Lb . delbrueckii*.

Le manganèse à lui aussi des effets biologiques importants chez les bactéries lactiques le manganèse est nécessaire à :

- La structure et fonctionnement des enzymes, dont l'ARN polymérase.
- La détoxification des cellules mises en présence de l'oxygène.
- Le potassium joue un rôle important dans la régulation du PH intracellulaire. Cet ion est exigée pour la croissance de *Lb . helvertcus* , *En. faecalis* et *Lb . casei*.
- Le sodium, quant à lui, exerce un effet sélectif sur les différentes espèces de bact éries lactiques (Luquet et Roissard ;1994) .

1.6 Taxonomie et relation génétique entre l'espèce de bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques ne peut pas être considéré comme un groupe phylogénétique. Elles appartiennent toutes au groupe des bactéries à Gram positif, mais si la plupart d'entre elles appartiennent au groupe des bactéries à Gram positif à bas G+C (phylum des Firmicutes), le genre *Bifidobacterium* appartient au groupe des bactéries à Gram positif à haut G+C (phylum des Actinomycètes) (figure 01). Siles bifidobactéries sont phylogénétiquement éloignées des BL car elles partagent certaines caractéristiques avec elles (elles produisent de l'acide lactique et sont utilisées dans les laits fermentés) (Holzapfel *et al .*, 2001).

Selon Stiles et Holzapfel (1997) et Axelsson (1998), les bactéries lactiques englobent les genres suivants : *Aerococcus* , *Alloicoccus* , *Bifidobacterium* , *Carnobacterium* , *Dolosigranulum* , *Enterococcus* , *Globicatella* , *Lactobacillus* , *Lactococcus* , *Tetragenococcus* , *Leuconostoc* , *Melissococcus* , *Oenococcus* , *Pediococcus* , *Streptococcus* , *Lactsphaea* , *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 dans la figure (01) et est basée sur la comparaison des séquences d'ARNr 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*). Le genre *Lactosphaera* a été reclassé comme appartenant au genre *Trichococcus*. Parmi ces 15 nouveaux genres, seul *Paralactobacillus* est d'origine alimentaire. En effet, l'espèce qui compose ce genre, en l'occurrence *Paralactobacillus selangorensis*, a été isolée d'un ingrédient malaysien (Leisner et al., 2000).

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* (Krockel 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., (2004) a montré quant à lui que *Lb. curvatus subsp. melibiosus* est synonyme de *Lb. sakei subsp. carnosus* (figure 01).

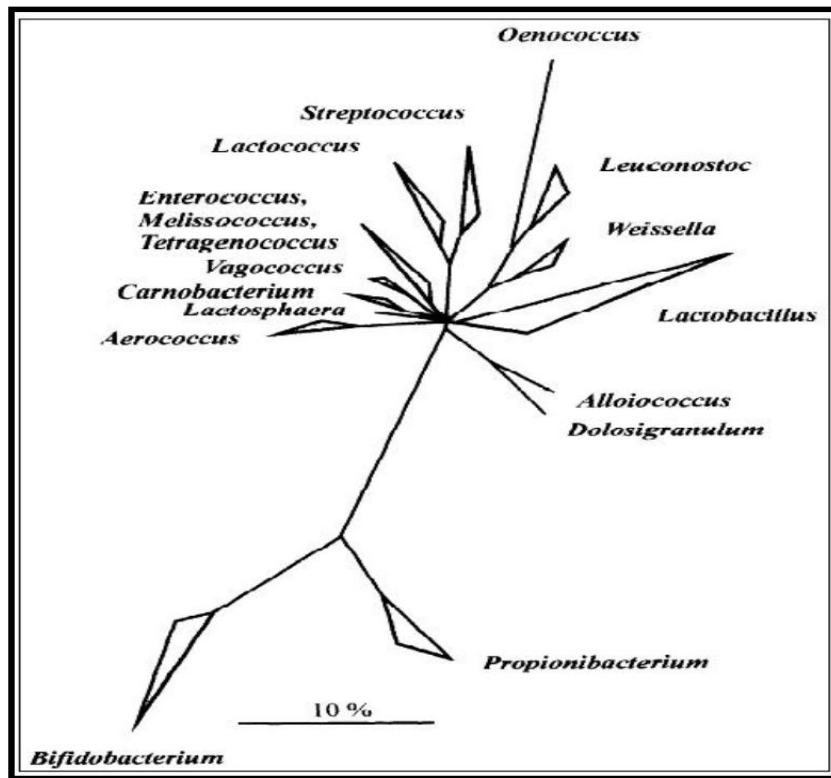


Figure 01 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par des ARNr 16S. (Mechai 2009).

1.7 Classification des bactéries lactiques

1.7.1 Classification de genre

Les genres principaux de bactéries lactiques associées aux aliments sont les *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. Historiquement, le genre *Bifidobacterium* était aussi considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal (Klein *et al.*, 1998).

Dans le manuel de Bergey publié en 1957, les *Bifidobacterium* étaient répertoriées comme étant des *Lactobacillus bifidum* (Axelsson *et al.*, 2004). Ces microorganismes, considérés souvent comme de véritables bactéries lactiques, sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement Actinomycètes) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de GC (<http://www.bacterio.cict.fr/bacdio/aa/tactinobacteria.html>).

L'ancien genre *Streptococcus* était divisé au début en trois groupes : *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus sensu stricto*, mais aujourd'hui, certaines bactéries lactiques qui étaient mobiles, rassemblant aux *Lactococcus*, ont formé un autre genre séparé : les *Vagococcus*. Les germes *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont globalement restés inchangés, mais quelques bactéries lactiques, auparavant incluses dans le genre *Lactobacillus*, forment maintenant le genre *Camobacterium* qui regroupe les lactobacilles atypiques isolés de différents produits carnés. De plus, des souches de l'ancienne espèce *Pediococcus halophilus* ont été incluses dans le genre *Tetragenococcus* du fait de leur insensibilité à la Vancomycine. Un autre groupe de *Lactobacillus* ou *Leuconostoc* a formé un nouveau genre, les *Weissella*, en raison de leurs différences phylogénétiques avec les autres lactobacilles hétérofermentaires. Les *Leuconostoc oenos*, les « *Leuconostoc* du vin », ont formé le genre *Oenococcus*. Des genres nouveaux, par exemple *Alliococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupes des bactéries lactiques (Axelsson, 2004).

Les caractéristiques phénotypiques ont généralement servi de point de départ pour plusieurs tests sophistiqués. La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour détruire et classifier les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacilles* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (Collins *et al.*, 1993). En outre, la division cellulaire en deux directions perpendiculaires sur un seul plan (autre fois décrite incorrectement comme « divisée en deux plans »), est utilisée comme la caractéristique clé dans la différenciation des coques. Les genres formant les tétrades sont les *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus* (Simpson *et al.*, 1995).

1.7.1.1 Les genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Vagococcus*

a. *Streptococcus*

Famille VI : *Streptococcaceae*

Genre I : *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* sensu stricto est toujours large et la classification est très mouvementée. ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène , oral et les autres streptocoques .

Le groupe pyogène contient plusieurs streptocoques pathogènes, hémolytiques (hémolyse B) qui nuisent à la santé humaine. Les *Streptococcus pneumoniae*, précédemment inclus dans ce groupe, sont transférés maintenant dans le groupe oral puisqu'ils sont associés principalement à la cavité orale de l'homme et de l'animal. En général, les streptocoques pyogènes sont B-hémolytiques tandis que les streptocoques oraux sont alfa- ou non-hémolytiques. Le groupe oral est divisé en cinq sous-groupes phylogénétiques qui sont respectivement les groupes anginosus, mitis, salivarius, bovis et mutans. Les caractéristiques biochimiques telles que : la fermentation des hydrates de carbones, l'hydrolyse de l'arginine, et certaines activités enzymatiques sont utilisées dans la classification. Les techniques fingerprinting génétiques telles que RFLP, REP-PCR, RAPD-PCR, DGGE-PCR et SDS-PAGE sont également utilisées pour identifier et classier les streptocoques (Desar *et al.*, 2008 ;Huys *et al.*, 2006 ; Koort *et al* ,2006 ; Piraino *et al.*, 2006 ; Rossetti *et al.*, 2005 ; Furet *et al.*, 2004 ; Rantsiou *et al.*, 2004).

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisées en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*. Cette espèce est l'un des deux ferments (avec *Lactobacillus delbruckii ssp bulgaricus*) impliquée (et obligatoire) pour la dénomination yaourt en législation française et pour certains fromages. Les *Sp.thermophilus* ont été inclus dans le groupe des « autres sterptocoques » (Scheilfer, 1987 ; Hardie, 1986) mais en suite, transférés au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Sp . salivarius* (Haddie *et al.*, 1995). Une troisième espèce, *Sp. vestibularis* appartient également au groupe des streptocoques (Kawamura *et al.*, 1995).La résistance à la température , la capacité à croitre à 52 °C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *Sp . thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Haddie *et al.*, 1986) .

b. Lactococcus

Famille VI : *Streptococeae*

Genre II : *Lactococcus*

Les lactocoques sont étroitement associés aux produits laitiers, mais seuls les *Lactococcus lactis* sont actuellement utilisés dans la technologie laitière (Teubet *et al.*, 1995). Les *La. garviae* sont souvent associés à la mastite bovine et à la lactococcose des poissons . Trois sous-espèces de *Lactococcus lactis* peuvent être distinguées : *La. lactis ssp .lactis* , *La .lactis ssp . cremoris* et *La .lactis ssp .hordniae*. Seules les deux premières sont importantes dans la fabrication des produits laitiers. Les *La. Lactis ssp. lactis* incluent les espèces qui étaient autrefois désignées *Sp.lactis ssp.lactis* , *Sp . lactis ssp .diacetylactis* et *Lactobacillus xylosus* (Schleifer *et al.*, 1987) .Le groupe *La . lactis ssp . cremoris* comporte les espèces précédemment désignées *Sp . cremoris* ou *Sp . lactis ssp . cremoris* qui se différencient de *La . lactis ssp .lactis* par l'incapacité à croître à 40 °C mais peuvent se développer dans un milieu à 4/ NaCl , peuvent hydrolyser l'arginine et fermenter le ribose . Les sous-espèces *lactis* et *cremoris* de *La. lactis* sont également séparées par les études d'homologie ADN-ADN et de comparaison des séquences des ARNr 16S . Les caractéristiques biochimiques (par exemple l'utilisation des sucres) peuvent être utilisées pour distinguer les espèces de lactocoques ainsi que les méthodes génétiques (Axelsson *et al.*, 2004).

c. *Vagococcus*

Famille IV : *Enterococcaceae*

Genre II : *Vagococcus*

Les espèces du nouveau genre *Vagococcus* sont facilement confondues avec les lactocoques au niveau morphologique, mais ces deux genres sont clairement distincts par leur composition en acides gras. Certaines espèces de *Vagococcus* sont mobiles (Teixeira *et al.*, 1999). Les amorces d'oligonucléotides spécifiques à ce genre et ses espèces sont disponibles, ce qui rend l'identification des bactéries de ce genre fiable et réalisable (Ammor *et al.*, 2005 ;Endo *et al*, 2005) .

d. *Enterococcus*

Famille IV : *Enterococcaceae*

Genre II : *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* regroupe les streptocoques fécaux qui présentent une hémolyse de type lambda, beta, et qui appartiennent au groupe sérologique D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. Fecalis*

(auparavant *Streptococcus faecalis*), et ses varités (*En. durans* et *En.bovis*).Les *Enterococcus* sont les bactéries lactiques les plus controversées. Plusieurs études sur la microflore des fromages traditionnels des pays méditerranéens ont montré que les entérocoques jouaient un rôle important dans la maturation des fromages, probablement au travers de la protéolyse et de la lipolyse d'où leur contribution à la flaveur des produits. Ces bactéries sont également trouvées dans les autres produits fermentés tels que les saucisses et les olives (Franz *et al.*, 2003).

Les entérocoques produisent des bactériocines (Moreno *et al.*, 2006 ; Sabia *et al.*, 2003, 2002). D'ailleurs, des préparations d'*En. faecium* (autrefois *Sp . faecium*) et d'*En. faecalis* ont été utilisées en tant que probiotiques (Ruiz-Moyano *et al.*, 2008 ; Guerra *et al.*, 2007 ; Stropfovà *et al.*, 2007,2006 ; Schanrek *et al.*, 2005 ; Burns *et al.*, 2004). Certaines résistent aux antibiotiques et transfèrent de telles propriétés au moyen d'éléments génétiques mobiles. La résistance des probiotiques aux antibiotiques peut poser un problème si elle peut être transmise à des pathogènes chez lesquels la résistance thérapeutique pourrait avoir des conséquences néfastes. L'infection causée par les entérocoques résistants à la vancomycine pose un problème clinique grave et par conséquent, l'utilisation de souches d'*Enterococcus faecalis* en tant que probiotiques doit faire l'objet de travaux extrêmement attentifs (Marteau *et al.*, 2004).

1.7.1.2 Les genres *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Ce sont des coques formées de cellules groupées en tétrades. Le genre *Aerococcus* qui contient cinq espèces est généralement moins intéressant dans l'agroalimentaire. Cependant, une étude récente a suggéré que ces bactéries pourraient être responsables du verdissement des produits carnés cuits (Peirson *et al.*, 2003).

a. *Aerococcus*

Le genre *Aerococcus* a été proposé en 1953 pour classer des coques à Gram positif, catalase négative, aéro-anaérobies, se différenciant des streptocoques par son mode de groupement. Les souches d'*Aerococcus ssp* se présentent sous la forme de coques à Gram positif, immobiles, groupés en tétrades ou en amas. *Aerococcus viridans* est souvent considérée comme un simple contaminant de l'air et cette bactérie est également présente dans divers prélèvements : eau douce et eau de mer, sol, sédiments marins, végétaux, produits d'origine animale (Vela *et al.*, 2007).

b. *Pediococcus*

Famille I : *Lactococcaceae*

Genre III : *Pediococcus*

Les pediococques sont formés de cellules groupées en paires ou en tétrades. Il s'agit de bactéries microaérophiles, leur métabolisme homofermentaire produit principalement de l'acide DL lactique, bien que l'acide L (+) lactique prédomine (Garvie, 1986 ;Deroissard, 1994 ;Holt *et al.*, 1994) .

L'étude de la composition en bases de l'ADN, montre que les pediococques ont un GC/ compris entre 37,8/ -41,2/ contre 42,0-43,2/ pour les streptocoques. D'autre part la nature du peptidoglycane constitue un critère important qui distingue le genre *Pediococcus* du genre *Streptococcus*. Actuellement, les tests immunologiques de précipitation sont d'une grande importance, ils sont utilisés pour trancher entre les différentes espèces de deux genres. Les espèces se différencient par tolérance à la température, au pH et au NaCl et par leur spectre fermentaire. Les différentes espèces du genre *Pediococcus* sont présentes dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons : bière, cidre et vin. *P.pentasaceus* avec *P. acidilactici* sont bien représentées dans les matières végétales mais peuvent aussi être trouvées dans le lait et les produits laitiers (Simpson et Taguchi 1995).

c. *Tetragenococcus*

Famille IV : *Enterococcaceae*

Genre III : *Tetragenococcus*

Seulement deux espèces de *Tetragenococcus* sont connues : *Te. Halophilus* (précédemment considérées comme *Pe. halophilus*) et *Te. muriaticus*.

Les *Enterococcus solitarius* sont phylogénétiquement liés au *Tetragenococcus*. Ces bactéries résistent à des concentrations élevées en sel (supérieures à 18/ NaCl) et en sont dépendantes pour leur croissance. Les espèces *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration de sel élevée par exemple les sauces de soja (Masuda *et al.*, 2005).

1.7.1.3 Le genre *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Les cellules de *Leuconostoc* sont des coques en paires ou en chaînes comme les streptocoques mais les *Leuconostoc* sont des bactéries hétérofermentaires produisant de l'acide D (-) lactique, de l'éthanol et du CO₂. Des études phylogénétiques, basées sur les séquences des ARNr 16S et 23S, ont montré que les espèces du genre *Leuconostoc* sont hétérogènes et peuvent être divisées en trois groupes : un groupe comprenant *Leuconostoc paramesenteroides*, un groupe formé par *Leuconostoc oeni* (actuellement reclassé dans le genre *Oenococcus*) et un groupe rassemblant *Leuconostoc mesenteroides* (espèce type du genre) ainsi que les autres espèces du genre *Leuconostoc*. Ces études révélaient également que cinq espèces hétérofermentaires du genre *Lactobacillus* (*Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor* et *Lactobacillus viridescens*) étaient apparentées à *Leuconostoc paramesenteroides* (Martinez- Muracia et Collins, 1990).

En 1993, Collins *et al.*, réalisent une étude taxonomique sur des souches bactériennes ressemblant à des *Leuconostoc ssp.* et isolées de saucissons secs fabriqués en Grèce. L'étude des séquences des ARNr 16S a permis de classer ces souches dans le groupe constitué par *Leuconostoc paramesenteroides* et les cinq espèces de lactobacilles hétérofermentaires. En se basant sur les résultats de leur étude et sur les résultats des études antérieures, Collins *et al.* (1990) transfèrent l'ensemble de ces espèces dans le nouveau genre *Weissella* et ils proposent la création de six nouvelles combinaisons (*Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella kandleri*, *Weissella minor*, *Weissella viridescens* et *Weissella*

paramesenteroides) pour reclasser *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor*, *Lactobacillus viridescens* et *Leuconostoc paramesenteroides* ainsi que la création d'une nouvelle espèce (*Weissella hellenica*) pour les souches isolées de saucissons grecs (Walter *et al.*, 2001).

Les espèces du genre *Weissella* sont constituées de courts bacilles ou de coccobacilles ou des coques ovoïdes, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés, immobiles, possédant un peptidoglycane du type A3alpha, catalase négative (Walter *et al.*, 2001).

1.7.1.4 Le genre *Lactobacillus* et *Carnobacterium*

a. *Lactobacillus*

Les lactobacilles et les Carnobacteriums, sont des bactéries Gram+, polymorphes asporogènes, non pigmentées, immobiles (sauf *Lb. agilis*), catalase-, nitrate-, gélatine-, leur morphologie va de cocci plus ou moins allongées à des formes longues, ce qui les rend parfois difficile à les distinguer des *Leuconostoc*. Leur GC% varie de 32 à 53% (Axelsson , 1998) .

Quant à leur classification, la division du genre *Lactobacillus* en trois sous genres, *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium*, a été proposé pour la première fois par Orla Jensen (1919). Cette classification tenait compte essentiellement de la répartition des voies de fermentation chez ces bactéries. Actuellement, cette classification des sous genres a disparue de la dernière édition du *Bergey'smanuel* (Kandler & Weiss , 1986) . Cette même classification à été reprise, mais sous une formenumérotée. Ainsi, on distingue dans le tableau 01 trois groupes de bactéries lactiques classées en fonction de leurs caractéristiques fermentaires (Schleifer, & Ludwig 1995 ; Axellsson, 1998).

a) Les Lactobacilles homofermentaires stricts (ancien sous-genre : *Thermobacterium*) qui utilisent le glucose grâce à la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas. Leur seul produit final étant l'acide lactique (D ou L). Ils ne métabolisent pas les pentoses et ne dégagent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose ou du gluconate. La production de l'acide lactique est supérieure à 85% à partir du glucose.

b) Les Lactobacillus hétérofermentaires facultatifs (ancien sous-genre : *Streptobacterium*) peuvent changer de voie en fonction du substrat. Ils métabolisent le glucose en acide lactique grâce à la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas et dégradent les pentoses par la voie hétérofermentaire des pentoses phosphate. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose, mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate.

c) Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts (ancien sous-genre : *Betabacterium*) qui fermentent le glucose en acide lactique, CO₂ et acide acétique ou éthanol via la voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase et qui dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique via la voie hétérofermentative de la glycéraldéhyde-3-phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase. Ces bactéries produisent du CO₂ lors de la fermentation du glucose et du gluconate. La production de l'acide lactique est d'environ 50% avec des quantités importantes en acide acétique, éthanol et CO₂ (tableau 01).

Tableau 01 : Classification des groupes du genre *lactobacillus* (Axellsson, 1998).

Caractères	Groupe I Homofermentaires	Groupe II Hétérofermentaires facultatifs	Groupe III Hétérofermentaires obligatoires
Fermentation des pentoses	-	+	+
Glucose (production de CO ₂)	-	-	+
Gluconate (production de CO ₂)	-	+	+
FDP aldolase	+	+	-
Phosphocétolase	-	+	+
Espèces	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbruekii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sake</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i>

Le genre *Carnobacterium* est constitué de bacilles minces, droits ou légèrement incurvés, à Gram positif, se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou parfois en courtes chaînes. Il est non sporulé, mobile ou immobile, aéro-anaérobie facultatif, catalase négative, oxydase négative, nitrate réductase négative, à métabolisme fermentatif (production d'acide lactique). Les *Carnobacterium* sont incapables de croître sur des milieux à base d'acétate, ne peuvent pas croître ni en présence de 8 % NaCl ni à 45°C et peuvent croître à 10°C et parfois à 0°C. Il est difficile de distinguer le genre *Carnobacterium* du genre *Lactobacillus*. On peut noter que les *Carnobacterium ssp.* ne se développent pas sur les milieux à l'acétate de Rogosa et sont capables de se développer à des pH plus élevés que ceux des *Lactobacillus ssp.* (Croissance possible jusqu'à pH 9,1). Ils sont parfois mobiles (*Cb. alterfunditum*, *Cb. funditum*, *Cb. inhibens* et *Cb. mobile*), et produisent principalement de l'acide L-lactique. Leur principal acide gras est l'acide oléique et leur peptidoglycane est du type A1 gamma. (Collins *et al.*, 1987).

En 1991, le genre *Carnobacterium* s'est enrichi de deux espèces (*Cb. funditum* et *Cb. alterfunditum*) (Franzmann *et al.*, 1991). Jôborn *et al.*, (1999) ont proposé l'espèce *Cb. Inhibens* pour identifier une souche isolée du tube digestif d'un saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*), en se basant sur l'analyse de la séquence des ARNr 16S et des caractères phénotypiques. La nomenclature de *Cb. viridans* a été publiée pour trois souches isolées d'une sauce bolonaise emballée sous vide (Holley *et al.*, 2002).

1.8 Application industrielle des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements (Axelsson, 1998). Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle.

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières (d'origine animale et végétale), conduisant ainsi à de nombreux produits.

Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand consommateur de ferments lactiques commerciaux, pour la production de laits fermentés, fromages, crèmes et beurres. La fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de nombreux produits différents, chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité (Daly *et al.*, 1998 ; Hugenholtz *et al.*, 2002).

L'utilisation des bactéries lactiques pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques. Celles-ci recouvrent les propriétés suivantes :

1.8.1 Activité acidifiante

La transformation du sucre assimilable en acide lactique conduit à l'acidification du produit. Cette acidification accroît sa durée de vie, en limitant sa contamination par les microorganismes d'altération ou pathogènes, et lui confère des caractéristiques organoleptiques particulières (Frank *et al.*, 1998;Mäyrä-Mäkinen *et al.*,1998).

1.8.2 Production de métabolites d'intérêt

Selon les espèces et selon les souches, les bactéries lactiques sont capables de produire des métabolites tels que l'acide acétique, l'éthanol, des arômes (diacétyle, acétaldéhyde,), des bactériocines (activité antimicrobienne), des exo polysaccharides, des enzymes (protéases, peptidases, lipases,) et du CO₂ (formation d'ouvertures dans les fromages) (Frank *et al.*, 1998 ; Mäyrä-Mäkinen *et al.*, 1998 ; Béal *et al.*,2008).

1.8.3 Propriétés enzymatiques

Les activités protéolytiques et peptidiques sont importantes car elles déterminent la capacité des bactéries lactiques à utiliser la fraction azotée du milieu. L'activité lipolytique présente, de plus, un intérêt pour les applications fromagères (Béal *et al.*, 2008).

1.8.4 Propriétés probiotiques

En plus des activités précédentes, les souches probiotiques doivent être résistantes aux acides gastriques et aux sels biliaires rencontrés lors de leur passage dans l'estomac, le duodénum et l'intestin (Da Cruz *et al.*, 2007).

De plus, elles présentent des propriétés thérapeutiques spécifiques à chaque souche en termes d'activités immunostimulantes et anti-diarrhéiques.

1.8.5 Critères de performance

Indépendamment de la propriété fonctionnelle envisagée, les bactéries lactiques doivent être résistantes aux bactériophages, aux traitements mécaniques, à la congélation ou à la lyophilisation et au stockage. Elles doivent également être tolérantes aux inhibiteurs de la croissance (antibiotiques, acidité éthanol, chlorure de sodium) (Béal *et al.*, 2008).

2 Activité antimicrobienne des Bactéries lactiques

2.1 Différentes interactions existantes chez les bactéries lactiques

Lorsque les bactéries lactiques sont utilisées en cultures mixtes pour la fermentation du lait, des interactions entre les différentes souches se manifestent. Ces interactions sont généralement classées en deux groupes : l'antagonisme et la stimulation. Les points suivants ne se veulent pas une liste exhaustive des interactions rencontrées lors de la fabrication fromagère mais un résumé des principales observations résultant de l'association de bactéries lactiques dans un même levain (Grattepanche, 2005).

2.1.1 Phénomène de stimulation

Les phénomènes de stimulation sont divisés en plusieurs catégories. On distingue le commensalisme, lorsqu'une population est stimulée par la production d'une substance essentielle ou la destruction d'un facteur inhibiteur par une autre population et le mutualisme ou la proto-coopération, lorsque l'interaction est positive. Dans le cas du mutualisme, l'interaction est nécessaire à la survie des populations contrairement à la proto-coopération où l'interaction présente un caractère facultatif (Choisy *et al.*, 1997).

L'interaction entre les lactobacilles et les streptocoques thermophiles est particulièrement mise à profit pour la fabrication des yaourts. Dans un premier temps, les lactobacilles se développent puis, leurs activités protéolytique et aminopeptidasique permettent de stimuler la croissance des streptocoques. Ceci se vérifie également pour des souches de lactocoques protéinase positive (Prt+) et négative (Prt-) associées en culture mixte.

En cultures mixtes dans le lait, la croissance des deux variants est similaire tant que la concentration en matières azotées non protéiques (NPN de l'anglais Non-Protein-Nitrogen) est suffisante. Dans un second temps, lorsque la source de NPN est épuisée, la croissance du variant Prt – est stimulée, comparativement à une culture pure, par l'activité protéolytique du variant Prt + qui favorise la libération de fractions azotées de faible poids moléculaire utilisables directement par les cellules (Juillard *et al.*, 1994 et 1996). Cependant, l'hydrolyse

des caséines par les souches Prt + est trop faible pour assurer une croissance maximale des deux souches. Par conséquent, le développement du variant Prt + se trouve inhibé par compétition pour les oligopeptides avec le variant Prt – (Juillard *et al.*, 1994 et 1996). L'association des deux types de variant est également profitable pour éviter les défauts d'amertume : les peptides amers générés par les protéinases des souches Prt + pouvant être dégradés par l'activité aminopeptidasique des variants Prt – (Juillard *et al.*, 1996).

2.1.2 Phénomène d'inhibition

Durant la fermentation du lait, différents agents antimicrobiens ayant la capacité d'inhiber le développement de bactéries pathogènes et/ou d'une flore de dégradation de l'aliment sont produits par les bactéries lactiques. Cependant, lorsqu'ils atteignent une certaine concentration, ces composés peuvent interrompre la croissance des souches productrices, il s'agit d'autoinhibition, et/ou des autres souches constituant le levain. Ces interactions négatives faisant intervenir la production de substances inhibitrices sont connues sous le nom d'amensalisme. C'est notamment le cas des acides organiques issus des mécanismes homofermentaire et hétérofermentaire des bactéries lactiques. L'inhibition peut aussi résulter de la production de peroxyde d'hydrogène car contrairement à d'autres genres bactériens, les bactéries lactiques sont dépourvues de catalase capable de dégrader ce composé toxique. L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène peut être renforcée par le système lactoperoxydase-thiocyanate présent naturellement dans le lait (Gilliland, 1985). Le thiocyanate est oxydé, en présence d'H₂O₂, en un composé bactériostatique pour les bactéries Gram positif. Les bactériocines, produites par quelques souches de bactéries lactiques, sont également des agents inhibiteurs très puissants dont le spectre d'activité s'étend de souches phylogénétiquement proches de la souche productrice à des espèces génétiquement plus éloignées.

Les phénomènes de compétition constituent la deuxième catégorie des interactions négatives fréquemment rencontrées lors de la fermentation du lait par une culture mixte. Certains nutriments, présents dans le lait en faibles quantités et indispensables à la croissance bactérienne, peuvent être consommés préférentiellement par un groupe microbien aux dépens d'un autre. C'est le cas notamment des NPN regroupant l'urée, des acides aminés, de courts peptides et les bases azotées adénine, guanine, uracile et xanthine. La concentration en NPN dans le lait ne supporte la croissance que d'une faible densité cellulaire de bactéries lactiques. Juillard *et al.* (1990 et 1991) ont ainsi observé que la croissance d'une souche de lactocoque

dans un lait ayant déjà préalablement servi à la préculture de la souche était inférieure à celle réalisée dans du lait frais. Ce phénomène s'explique par l'épuisement de la fraction azotée de faible poids moléculaire durant la pré-culture.

2.2 Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Plusieurs études ont démontré que la présence des bactéries lactique pouvait contribuer à l'inhibition de bactéries non-pathogènes et pathogènes dans les aliments. En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux agents naturels antimicrobiens tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyle et les bactériocines (Demers, 2011). Ces molécules à action bactéricide/bactériostatique et ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (Baliarda, 2003).

2.2.1 Le pH et l'acide organique

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques. Les acides organiques sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaires (Liu, 2003).

Grâce à cette production d'acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe. Leur compétitivité est améliorée étant donné leur grande tolérance aux pH bas extra et intra cellulaires. Outre la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération du proton, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (Klaenhammer, 1993; Brul *et al.*, 1999; Caplice *et al.*, 1999; Hsiao *et al.*, 1999; Cotter *et al.*, 2003; Janssen *et al.*, 2007).

Les acides organiques sont un des agents classiques de préservation des aliments (Brul *et al.*, 1999) et sont reconnus comme des additifs alimentaires. Les acides couramment utilisés sont les acides benzoïque, sorbique, acétique, fumarique, propionique et lactique. Ils sont utilisés pour prévenir ou retarder la croissance des bactéries dégradant la nourriture (Hsiao *et*

al., 1999). Le principal problème consécutif à leur utilisation est la haute concentration nécessaire pour inhiber les bactéries pathogènes ou indésirables et qui est parfois inacceptable pour le consommateur (Kobilinsky *et al.*, 2007).

La concentration inhibitrice minimale, qui est la plus petite quantité d'acide qui peut empêcher la croissance d'un microorganisme, de chacun de ces acides doit être déterminée dans des conditions précises de pH mais aussi d'activité d'eau, de température... (Hsiao *et al.*, 1999). Elle varie avec chaque microorganisme à inhiber. Hsiao *et al.* (1999) ont montré qu'une concentration en acide acétique de 0,105 g l⁻¹ inhibe la croissance de *Bacillus subtilis* à un pH de 5,3 alors qu'il faut une concentration de 27,5 g l⁻¹ pour inhiber *Lactobacillus plantarum* et une concentration de 1,6 g l⁻¹ pour inhiber *Escherichia coli* dans les mêmes conditions. *Listeria monocytogenes* est inhibé par de l'acide lactique à 9,0 g l⁻¹ et un pH de 3,7 tandis qu'il l'est à un pH de 3,4 par l'acide chlorhydrique à la même concentration (Gravesen *et al.*, 2004).

Les bactéries pathogènes peuvent développer certains mécanismes de résistance appelés « acid tolerance response » vis à vis de l'exposition à des pH bas. Ceux-ci leur sont également utiles pour survivre au transit intestinal. *L. monocytogenes* par exemple peut survivre à une exposition de 60 minutes à un pH de 3 (Brul *et al.*, 1999; Gahan *et al.*, 1999; Cotter *et al.*, 2003).

2.2.2 Peroxyde d'hydrogène

En général, les bactéries lactiques sont capables de transformer l'oxygène moléculaire (O₂) en super oxyde excité (O₂*), en peroxyde (H₂O₂) ou en eau (H₂O). Ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques généralement en présence d'un substrat à oxyder. Ces enzymes ont été trouvées chez des souches de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Condon, 1987).

Le peroxyde d'hydrogène est produit par les bactéries lactiques en présence de l'oxygène sous l'action de la flavoprotéine oxydase du nicotinamide adénine hydroxyperoxydase dinucléotide (NADH).

L'effet antimicrobien de H₂O₂ peut résulter de l'oxydation des groupes sulfhydriques causant la dénaturation d'un certain nombre d'enzymes, et de la peroxydation des lipides de membrane ; de ce fait provoque l'augmentation de la perméabilité de la membrane (Kong et Davison, 1980).

H₂O₂ peut également agir comme précurseur pour la production de radicaux libres bactéricides tels que le superoxyde (O₂) et radicaux d'hydroxyde (OH) qui peuvent en dommager l'ADN (Byczkowski et Gessner, 1988).

Dans le lait cru, H₂O₂ active le système de lactoperoxydase produisant le hypothiocyanate (OSCN⁻), des oxyacides plus élevés (O₂SCN⁻) et (O₃SCN⁻) et produits, intermédiaires d'oxydation qui sont inhibiteurs à une gamme étendue de bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻ (Reiter et Hårnolv, 1984 et Conner 1993). H₂O₂ peut s'accumuler et devenir inhibiteur pour quelques micro-organismes (Condon, 1987). Cette accumulation résulte d'un déséquilibre entre les moyens de synthèse et de dégradation.

Le peroxyde d'hydrogène peut aussi activer le système lactoperoxydase avec la formation de l'hypothiocyanate et d'autres agents antimicrobiens (De Vuyst et Vandamme, 1994 b). L'ion hypothiocyanate est un très puissant antimicrobien qui agit aussi bien sur les bactéries à Gram⁺ que sur les bactéries à Gram⁻.

La production de H₂O₂ par *Lactobacillus* et *Lactococcus* inhibe la croissance de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas sp.* Et de divers micro-organismes psychrotropes (Davidson et al, 1983). L'inhibition est négociée par l'effet d'oxydation fort sur des lipides de membrane et des protéines cellulaires (Morris, 1976 et Lindgren et Dobrogosz, 1990).

Le peroxyde d'hydrogène peut également activer le système lactoperoxydase du lait frais avec la formation de la hypothiocyanate et d'autres agents antimicrobiens (Reiter et Hårnolv, 1984 ;Pruitt *et al.*, 1986 et Condon, 1987).

La quantité de peroxyde d'hydrogène produite par les bactéries lactiques dépend en grande partie de la souche et la disponibilité de l'oxygène (Helander *et al.*, 1997).

2.2.3 Dioxyde de carbone (CO₂)

Il est principalement produit par les bactéries lactiques hétérofermentaires. Le mécanisme précis de son action antimicrobienne est toujours inconnu. Cependant, le CO₂ peut jouer un rôle antimicrobien en créant un environnement anaérobique, qui empêche les décarboxylations enzymatiques, et l'accumulation de CO₂ dans le milieu peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (Eklund, 1984).

Le CO₂ peut aussi empêcher la croissance de beaucoup de microorganismes de détérioration, particulièrement les bactéries psychrotrophes à Gram⁻ (Farber, 1991 et Hotchkiss *et al.*, 1999). Le degré d'inhibition par le CO₂ varie considérablement selon les espèces. Un taux de CO₂ de 10 % pourrait diminuer la population bactérienne de 50 % (Wagner et Moberg, 1989), il a une forte activité antifongique (Lindgren et Dobrogosz, 1990).

2.2.4 Le diacétyl (C₄H₆O₂)

Il est produit par des souches de *Lc. Lactis* subsp. *Lactis* biovar. *diacetylactis* par la fermentation du citrate (Lindgren et Dobrogosz, 1990 et Cogan et Hill ; 1993). Il est responsable de l'arôme et de la saveur du beurre et de quelques autres produits laitiers fermentés. Les niveaux sensoriels acceptables du diacétyl sont de 2 à 7 µg/ml (Earnshaw, 1992).

Beaucoup de bactéries lactiques comprenant des souches de *Leuconostoc*, de *Lactococcus*, de *Pediococcus* et de *Lactobacillus* peuvent produire le diacétyl bien que la production soit réprimée par la fermentation des hexoses (Cogan 1986). Son utilisation pratique en tant que conservateur est limitée.

Cependant, le diacétyl peut agir synergiquement avec d'autres facteurs antimicrobiens (Jay, 1992) et contribuer aux systèmes combinés de conservation en nourritures fermentées.

Les bactéries à Gram⁻ sont plus sensibles au diacétyl que les bactéries à Gram⁺ ; 200 µg/ml et 300 µg/ml respectivement (Jay, 1982). Une concentration de 344 µg/ml a empêché la croissance des souches de *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia* et *Escherichia coli*. L'effet antimicrobien du diacétyl a été connu depuis les années 30. Il empêche la croissance des bactéries à Gram⁻ en affectant l'utilisation de l'arginine (Jay, 1986).

Le diacétyl a été démontré pour être un antimicrobien efficace contre un éventail de bactéries Gram négatives et Gram positives, bien que les bactéries lactiques soient généralement résistantes (Gill et Halley, 2003). Les quantités de diacétyl produites par *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* varient de 0,07 à 3,72 ppm (Burrow *et al.*, 1970).

2.2.5 Acide lactique

L'acide lactique est le métabolite majeur produit par les bactéries lactiques. Au cours de la Fermentation (Mechai, 2009), il est considéré comme un acide faible (Mahi, 2010), ses formes dissociée et non dissociée sont en équilibre et l'amplitude de la dissociation dépend du pH. A bas pH, une grande quantité de l'acide lactique est contenue dans sa forme non dissociée et est toxique pour beaucoup de bactéries, levures et moisissures. Lindgren et Dobrogosz (1990) ont montré qu'à différentes valeurs de pH, la concentration minimale inhibitrice (MIC) de la forme non dissociée était différente à l'encontre de *Clostridium tyrobutyricum*, *Enterobacter* sp. En outre, les stéréoisomères d'acide lactique diffèrent aussi dans l'activité antimicrobienne. L'acide L (+) lactique est plus inhibiteur que l'isomère D (-) (Mechai, 2009).

2.2.6 Acides gras insaturés

Les acides gras insaturés sont actifs contre les bactéries à Gram positif et peuvent présenter une activité antifongique dépendante de longueur des ramifications, la concentration et le pH du milieu. L'action antimicrobienne des acides gras serait due à la molécule non dissociée et pas l'anion, étant donné que le pH conditionne largement cette activité. Un bas pH favorise une destruction rapide des microorganismes cibles (Mechai, 2009).

2.2.7 Reutéline et la reutéricycline

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus* ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium*. La fermentation du glycérol se déroule en deux étapes. Le glycérol sera tout d'abord deshydraté par une «glycéroldeshydratase» pour former de la reutéline qui sera ensuite réduite en 1,3-propanediol par une oxydoréductase. La reutéline s'accumule alors dans le microorganisme producteur. A haute concentration, elle est excrétée dans le milieu. Sa toxicité contre la cellule productrice limite sa production, certaines espèces comme *Lactobacillus reuteri* sont plus résistantes. La reutéline a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les bactéries (Gram-positif ou Gram-négatif), les champignons et les

protozoaires. Elle interfère avec la réplication de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (Dortu, 2008).

La reutéricycline, seul antibiotique produit par une bactérie lactique, est un type d'acide tétramique. Son spectre d'inhibition est large et comprend notamment de nombreuses bactéries à Gram positif pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*...) mais aussi *Escherichia coli* et *Salmonella* spp. Dans certaines conditions (Brillet, 2005).

Tous ces métabolites compétitifs produits par les bactéries lactiques contribuent à limiter le développement microbien. Ils ont cependant un large spectre d'action et peuvent de ce fait aussi inhiber des bactéries d'intérêt dans les produits alimentaires (bactéries probiotiques par exemple). D'autres métabolites, appelés bactériocines, ont un spectre d'action plus limité et peuvent ainsi mieux cibler les bactéries indésirables dans le cadre d'une stratégie de biopréservation des aliments (Brillet, 2005).

2.2.8 Les bactériocines

L'effet inhibiteur justifiant l'intérêt pour les bactériocines a été observé par Pasteur et Joubert (1877) et cité par Tagg *et al.* (1976). Une étude approfondie menée par Gratia en 1925, a permis d'isoler d'*Escherichia coli* V une substance bactéricide envers une souche de *E.coli* 0 ; elle fut appelée « principe V » (Reeves, 1965). En 1946, Gratia et Frédéricq substitua à cette appellation, le terme plus précis de « colicine ».

C'est en 1944 que la diplococcine, première bactériocine d'origine lactique fut identifiée, (Oxford, 1944). Hirsch *et al.*, (1951) démontrèrent qu'une bactériocine nommée nisine inhibait le développement de *Clostridium* au cours de l'affinage de fromage. C'est à partir de cette date que l'usage de bactériocine est préconisé dans la préservation des aliments.

De ce fait, le terme bactériocine fut généralement employé pour désigner des peptides inhibiteurs de nature protéique et du type colicine sécrétés par un certain nombre d'espèces bactériennes (Jacob *et al.*, 1953). On distingue les bactériocines produites par les bactéries à Gram positifs, petits peptides de taille inférieure à 10 kDa, des bactériocines issues de bactéries à Gram négatif comme *E. coli* et plus connue sous le nom de colicine.

Leur poids moléculaire est supérieur à 20 kDa et leur spectre est plus restreint aux souches apparentées à la souche productrice. Par contraste les bactériocines produites par des bactéries à Gram positif ont un spectre généralement plus étendu (Hamon et Peron, 1963).

Les bactériocines sont donc définies comme étant des peptides antimicrobiens synthétisés par une bactérie et qui démontrent une activité inhibitrice contre des bactéries apparentées à la souche productrice (Tagg et al. 1976 ; Klaenhammer, 1988 ; Jack et al. 1995). Leur spectre d'activité peut s'étendre à certaines bactéries à Gram négatif surtout lorsqu'elles sont associées à un chélateur de type EDTA (Vessoni Penna *et al.*, 2006 ; Lyon et Glatz, 1991). Les gènes des bactériocines sont soit encodés sur un chromosome, comme c'est le cas chez *Lactococcus lactis* (Liu et Hansen, 1990) et les streptocoques du groupe A (Simpson et Tagg, 1984), soit portés par un plasmide (Heng *et al.*, 2006, Abrioulet *et al.*, 2006 ; Nettles et Barefoot, 1993 ; Garriga *et al.*, 1993).

2.2.8.1 Classification des bactériocines

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

- **Classe I. Les antibiotiques** : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stable à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formé postraductionnellement, c'est la lanthionine, la B-méthyle 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 des peptides globulaires chargé négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés. Certains antibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme lacticine 3147. La nisine, produite par *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, est la bactériocine la plus largement étudiée de la classe I (Dortu et Thonart, 2009 et Rajaram *et al.*, 2010).
- **Classe II.** Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stable à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoélectrique varie entre 8 à 10. Cette classe est divisée en trois sous-classes. Les bactériocines de la sous-classe 2 a contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNG ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminal moins

conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action. Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminal 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. La sous-classe IIIb comprend les bactériocines de classe 2b peuvent être distingués : le type E (Enhancing) ou la fonction d'un des deux peptides sont complémentaires. La sous-classe IIc contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes (Dortu et Thonart, 2009).

- **Classe III.** Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques.
- **Classe IV.** Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite (Dortu et Thonart, 2009).

Le tableau 02 montre les différentes classes de bactériocines avec leurs descriptions (Ouweland et Vesterlund, 2004).

Tableau 02 : Les classe des Bactériocines produites par les bactéries lactiques (Ouweland et Vesterlund, 2004).

Classe	Sous—classe	Description
Classe I (antibiotique)	A(1)	Allongé, cationique, membrane active, la charge nette est légèrement + ou -.
	A(2)	Allongé, cationique, membrane active, la charge nette est hautement -
	B	Globulaire, inhibe l'activité enzymatique.
Classe II		Petite (<10 kDa), stabilité à la chaleur modérée. (100°C) à élevée (121°C), les peptide membrane actives ne contiennent pas la lanthionine.
	IIa	Peptides <i>Listeria</i> active avec -Y-G-N-G-V-X-C- près de l'amino-terminus.

	I Ib	Bactériocines deux-peptides.
	I Ic	Bactériocines autre peptides.
Classe III		Grand (>30kDa) protéines thermolabiles.
Classe IV		Bactériocines complexe : protéines avec lipides et/ou carbohydrates.

2.2.8.2 Mode 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.

2.2.8.2.1 Les antibiotiques

Les antibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par les interactions électrostatiques ou par liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide₂ (un decarpenylpyro-phosphoryl-MurNAc-pentapeptides-GlcNAc), un précurseur de peptidoglycanes.

Suit à cette liaison, les antibiotiques 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 de deux composants de la force proton motrice, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. L'interaction avec le lipide 2 permet d'augmenter la stabilité des pores formés et de réduire la concentration de l'antibiotique de type A dissipent la force proton-motrice par formation de pores, mais peut également conduire à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (Dortu et Thonart, 2009). Les antibiotiques de type A dissipent la force proton-motrice par formation de pores et interfèrent avec la synthèse des peptidoglycanes alors que la plupart des antibiotiques de type B agissent par inhibition de la synthèse des peptidoglycanes. Néanmoins, certains forment également des pores dans la membrane des cellules cibles. Nisine, un antibiotique de type IA, interagit avec le lipide 2 au niveau du MurNAc tandis que la mersacidine, un antibiotique de type IB, interagit avec le GlcNAc du lipide 2 (Dortu et Thonart, 2009).

2.2.8.2.2 Les bactériocines de classe II

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe II a est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur spécifique, la « mannose perméase », pour ensuite forme 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. 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 (Dortu et Thonart, 2009). La figure 02, montre le mécanisme d'action bactéricide de la pédiocine PA-1/AcH (Naidu *et al.*, 2006).

Les bactériocines de classe II b ont en général un spectre d'action inhibant une large gamme de bactérie 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 (Dortu et Thonart, 2009).

2.2.8.2.3 Les bactériocines de classe III

Le mode d'action de ces bactériocines diffère complètement des bactériocines des autres classes. Par exemple, 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 (Dortu et Thonart,2009).

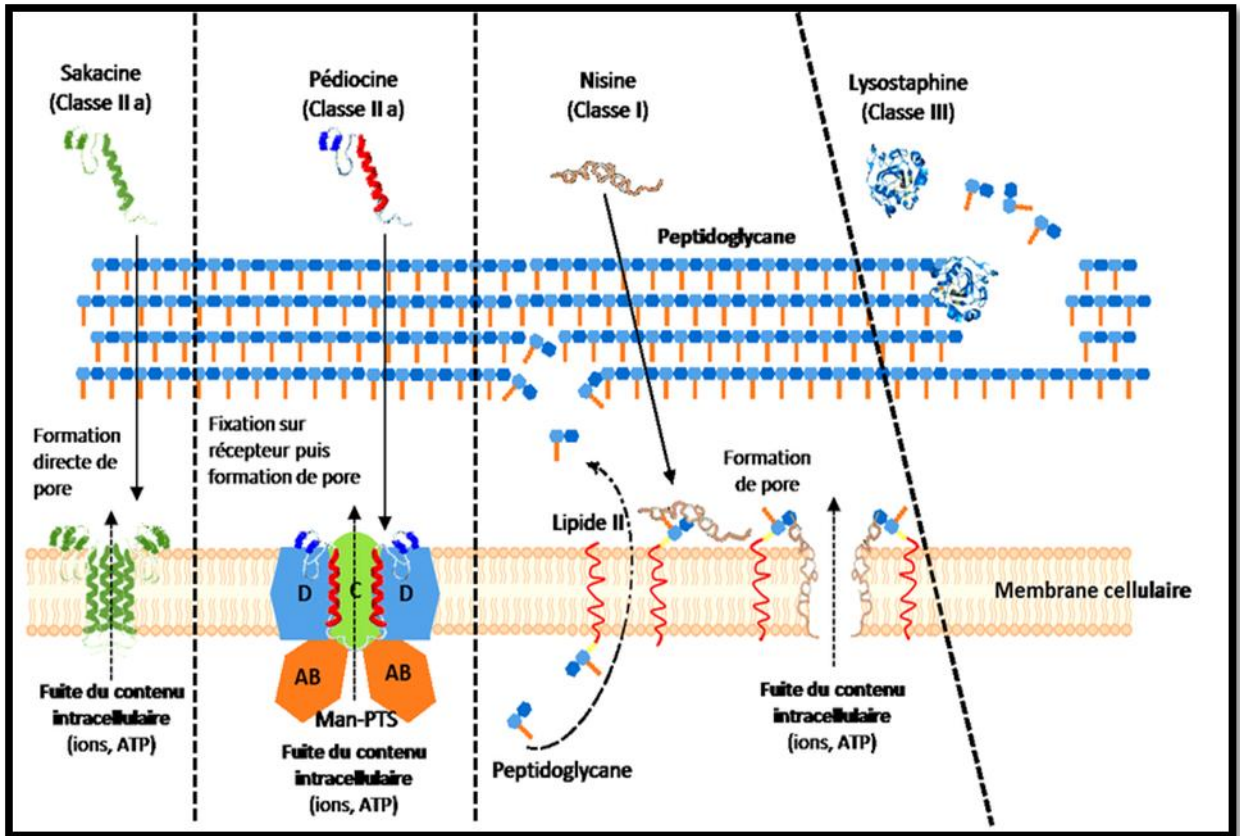


Figure 02 : Principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries Gram positif.

La sakacine, une bactériocine de classe IIa, agit directement au niveau de la membrane interne en formant un pore conduisant à la mort de la bactérie cible. La pédiocine PA-1, appartenant aussi à la classe IIa, se fixe sur l'unité D du mannose phosphotransférase (enzyme transmembranaire multimérique). Elle s'internalise et force le canal à rester ouvert, conduisant à la fuite du contenu intracellulaire et à la mort de la bactérie cible. La nisine, une bactériocine de classe I, se fixe sur le lipide II transmembranaire impliqué dans la synthèse du peptidoglycane. Elle s'internalise et forme des pores tout en bloquant la fonction du lipide II.

Enfin, la lysostaphine, une bactériocine de classe III agit directement au niveau du peptidoglycane (Fernandez, 2014).

Tableau 03 : les principales bactériocines produites par certaines espèces de bactéries lactique littérature (Dortu et Thonart, 2009).

Dénomination	Espèces productrices	Espèce sensibles
Nisine	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus</i> , Bactéries Gram positif (dont <i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i>)
Lacticine 481	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i> , <i>Clostridium</i>
Diplocicine	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Lactocoques
Lactostrepcine (S)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus</i> , Streptocoque hémolytique, <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Listeria</i>
Lactocidine	<i>Lactococcus fermentum</i>	<i>Lactobacillus</i>
Lactocine 27	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i>
Helveticine	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus lactis</i>
Lactacine B	<i>Lactobacillus acidophilus</i> N2	<i>Lactobacillus leichmanii</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i>
Lactacine F	<i>Lactobacillus acidophilus</i> SS	Id+ <i>Lactobacillus fermentum</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>
Plantaricine A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus</i> <i>pentosaceus</i>
Pediocine A	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i>

3 Aptitude probiotiques et l'utilisation industrielle des bactéries lactiques

Les caractéristiques métaboliques des bactéries lactiques en font des acteurs indispensables au cours des fermentations alimentaires. Les bactéries lactiques sont classiquement impliquées dans un grand nombre de fermentations alimentaires, seules ou avec d'autres micro-organismes (transformation du lait, boissons fermentées, salaison, fermentation des végétaux), et sont également étroitement associées à l'environnement humain (Tableau 04). Le principal atout de ces bactéries réside donc dans leur capacité à acidifier les produits alimentaires. Le L- acide lactique, qui est le produit principal du métabolisme fermentaire, joue un rôle majeur dans la conservation des aliments puisqu'il inhibe fortement la croissance des bactéries pathogènes à bas pH (Stiles, 1996). Il a également un rôle direct dans l'industrie laitière puisqu'il permet la formation du caillé à bas pH. Les bactéries lactiques participent également à la texture (production d'exopolysaccharides) et à la saveur des produits laitiers. Les arômes sont multiples, parfois indésirables (amines biogènes) et peuvent provenir d'origines diverses, soit du catabolisme des hydrates de carbone présents dans le lait (lactose, citrate.), soit du métabolisme des acides aminés ou encore des matières grasses (Moroni, 2007).

De nos jours, les bactéries lactiques font l'objet de recherches intensives qui sont améliorées par la disponibilité de la séquence complète du génome de nombreuses bactéries lactiques : *Lactococcus lactis* IL1403 (Bolotin *et al.*, 2001), *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (Kleerebezemé *et al.*, 2003), *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (Pridmore *et al.*, 2004), *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Altermann *et al.*, 2005). La production sans cesse en augmentation de produits laitiers fermentés et surtout de fromage, 18 millions de tonnes en 2004 alors que seulement 15 millions de tonnes étaient produites en 1999 (source statistique FAO cité par Dortu, 2008), conduit aujourd'hui à une rationalisation indispensable de l'utilisation des ferments lactiques dans l'industrie. Les technologies laitières constituent le secteur principal d'application des bactéries lactiques. La compréhension de la physiologie de ces microorganismes contribue ainsi à un meilleur contrôle des procédés de même qu'à l'amélioration et à la diversification des qualités organoleptiques et texturales des produits laitiers fermentés.

Pour cela diverses stratégies ont été mises en place, il s'agit tout d'abord d'une meilleure sélection des souches et leur utilisation en mélanges complexes dans des levains de culture. Une optimisation métabolique des souches a également été envisagée afin d'augmenter la production d'arômes (Hugenholtz *et al.*, 2000), de polysaccharides, de vitamines ou encore de la protéolyse des protéines du lait.

Tableau 04 : Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire et exemples des espèces prédominantes (d'après McKay et Baldwin, 1990).

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

3.1 Rôles probiotiques des bactéries lactiques

3.1.1 Critères de sélection des souches probiotiques

La notion de "probiotiques" a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff (1907) qui avait constaté que les paysans bulgares, grands consommateurs de laits fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé. Ainsi, Metchnikoff avait proposé l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des bactéries lactiques, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie (Gournier-Château *et al.*, 1994).

Le terme probiotique dérive des deux mots grecs "pros" et "bios" qui signifient littéralement "pour la vie" contrairement au terme antibiotique signifiant "contre la vie". Ce terme a été introduit pour la première fois par Lilly et Stillwell (1965) pour décrire des substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes. Depuis, plusieurs définitions ont été données aux probiotiques dépendamment de leurs effets sur la santé. Selon Parker (1974), « probiotiques » désigne les microorganismes et les substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale. Cette définition englobant les microorganismes et les métabolites microbiens produits (les antibiotiques), a été modifiée par Fuller (1989) qui redéfinit les probiotiques comme étant : "des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale". Enfin, selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'Organisation des Nations Unies (ONU) pour l'agriculture et l'alimentation et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) (Rapport du FAO/WHO, 2002), les probiotiques sont « des microorganismes vivants administrés en quantités adéquates et qui sont bénéfiques pour la santé de l'hôte » (Amrouche, 2005).

De façon plus spécifique, pour qu'un organisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique, il doit présenter les caractéristiques suivantes :

- Être un habitant naturel de l'intestin.
- Être capable de coloniser le milieu intestinal, persister et se multiplier.
- Adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduire l'adhérence des pathogènes.
- Avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides,

H₂O₂, bactériocines...).

- Être non invasif, non carcinogène et non pathogène.
- Être capable de co-agréger pour former une flore normale équilibrée.
- Survivre aux différents procédés technologiques de production.
- Garder sa viabilité dans l'aliment et durant le transit intestinal (Stanton et al., 2001).

Dans toutes les définitions prononcées, la notion de viabilité apparaît comme un critère de sélection importante. Cependant, cette notion demeure très controversée puisque des études récentes, ont clairement démontré que même les souches non viables de probiotiques sont capables d'exercer certains effets positifs sur la santé entre autres la stimulation de certaines fonctions immunitaires, l'inhibition de l'adhésion et l'invasion de certains pathogènes (Ouwehand *et al.*, 1999). Ceci laisserait donc envisager une éventuelle redéfinition des probiotiques où la notion de viabilité sera à reconsidérer.

3.1.2 Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé

Différents effets positifs sont ainsi attribués aux probiotiques. Cependant, des études doivent encore être réalisées afin de confirmer certains bienfaits. Ces effets sont décrits dans le tableau 05 et expliqués ci-dessous.

Il est à noter que la validité scientifique de ces effets bénéfiques est très variable. Pour certains effets, des preuves scientifiques irréfutables appuyées par des études cliniques existent et permettent d'attribuer certaines allégations-santé aux produits probiotiques (Moroni, 2007).

Tableau 05 : Effets positifs des probiotiques sur la santé (effets probables ou suspectés) (Moroni, 2007).

Evidences scientifiques fortes	
Effets des probiotiques	Mécanismes des probiotiques
Aide à la digestion du lactose	♣ Action de la β - galactosidase bactérienne
Réduction du risque des diarrhées	♣ Activité antipathogène ♣ Stimulation du système immunitaire
Diminution des allergies alimentaires	♣ Amélioration de la fonction barrière de la muqueuse ♣ Stimulation du système immunitaire ♣ Dégradation des protéines allergènes
Evidences scientifiques prometteuses	
Effets des probiotiques	Mécanismes des probiotiques
Activité hypocholestérolémiant	♣ Assimilation du cholestérol ♣ Déconjugaison des sels biliaires
Prévention du cancer du côlon	♣ Production de composés antimutagéniques ♣ Modulation des enzymes fécales carcinogéniques ♣ Stimulation du système immunitaire
Résistance contre les maladies inflammatoires et irritables des intestins	♣ Activité antipathogène ♣ Stimulation du système immunitaire
Diminution des infections à <i>Helicobacter pylori</i>	♣ Activité antipathogène
Effet antihypertenseur	♣ Action des peptidases sur les protéines du lait donnant des peptides bioactifs

3.1.3 La bio-conservation par les bactériocines des bactéries lactiques

La bio-conservation (ou bio-préservation) est une nouvelle approche de conservation basée sur l'utilisation de méthodes impliquant des conservateurs naturels et/ou biologiques et qui est dorénavant préconisée dans l'industrie alimentaire. Ces conservateurs ont généralement une origine microbienne ou font partie des structures intrinsèques de l'aliment et contribuent à sa conservation (lysozyme de l'œuf, immunoglobulines et lactoferrine du lait, etc.). Plus précisément, la bio-préservation utilise des microorganismes antagonistes ainsi que leurs métabolites (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl, bactériocines, etc.) pour inhiber ou détruire les microorganismes indésirables dans les aliments (Rodgers, 2001). Les aliments fermentés sont un bon exemple de produits faisant appel à la bio-préservation et ce, par la croissance et le métabolisme de bactéries lactiques et les conditions que celles-ci imposent dans ce type d'aliment (pH bas, compétition, etc.) (Ray et Daeschel, 1992 ; Bourgeois et Larpent, 1996). Les bactéries lactiques sont donc les acteurs essentiels de cette bio-préservation.

Parmi les nouvelles stratégies de conservation, notons l'application des nouvelles techniques physiques dites de pasteurisation ou de stérilisation à froid (hautes pressions, champs électriques et magnétiques pulsés) en combinaison avec les bactériocines (Deegan *et al.*, 2006). Le changement de l'intégrité de la structure membranaire des microorganismes pathogènes à Gram négatif induit par ces traitements pourrait permettre ensuite leur contrôle par les bactériocines, généralement plus actives contre les bactéries Gram-positives. Cependant, ces traitements ne peuvent être appliqués qu'à certains types de produits, notamment les aliments liquides (Abee *et al.*, 1995; Deegan *et al.*, 2006).

Dans le cas des aliments crus ou prêts à consommer, la réfrigération ne peut pas constituer à elle seule une barrière suffisamment efficace pour contribuer au contrôle des microorganismes pathogènes psychrotrophes. Les bactéries bactériocinogènes ou leurs bactériocines semblent être plus efficaces à ces températures. Dès lors, l'exploitation et l'utilisation de cette flore lactique et/ou de ses bactériocines pour la bio-préservation dans ce type de produit paraît être une avenue prometteuse et suscite d'ailleurs un grand intérêt dans l'industrie agro-alimentaire (Leroi *et al.*, 1996).

De nombreux travaux de recherche ont évalué le potentiel des bactériocines ou de leurs souches productrices pour le contrôle des microorganismes indésirables dans les aliments. De manière générale, la sélection de souches productrices de bactériocines pour une application alimentaire doit obéir à un certain nombre de critères législatifs et technologiques. Ces bactéries doivent être reconnues GRAS, elles doivent démontrer une stabilité au pH (acide notamment), produire activement leurs bactériocines aux conditions de conservation appliquées, produire des arômes neutres qui n'affecteront pas les caractéristiques sensorielles du produit et respecter les normes microbiologiques.

L'application des bactériocines dans les produits laitiers, carnés et végétaux a été largement étudiée. Les produits laitiers, particulièrement le fromage est un exemple d'application de la nisine Z pour le contrôle de *L. monocytogenes*, qui pose un sérieux problème durant la production et la maturation fromagère (Benech *et al.*, 2002). Pour sa part, la nisine A a été étudiée pour l'inhibition de la flore d'altération dans la viande (Cutter et Siragusa, 1998). Plus récemment, la recherche sur l'utilisation de la nisine dans la bio-préservation a porté sur son addition sous forme concentrée (Nisapline™) plutôt que son introduction par l'intermédiaire de cultures vivantes. Dans les produits carnés, certaines souches de *Lactobacillus* et *Pediococcus* productrices de bactériocines de classe IIa *anti-Listeria* telles que la pediocine, constituent une meilleure approche de bio-préservation de ce type de produit du fait que ces souches représentent la microflore dominante des produits carnés sous atmosphère modifié (Abee *et al.*, 1995).

3.1.4 Les stratégies d'Utilisation des bactériocines dans les aliments

Il existe trois modes d'addition des bactériocines pour la bio-préservation des aliments :

- Elles peuvent être ajoutées en tant qu'auxiliaire technologique, c'est-à-dire par l'ensemencement d'une souche de bactérie lactique bactériocinogène qui produira sa bactériocine in situ dans l'aliment.
- Elles peuvent être aussi utilisées directement dans le produit comme additif sous forme purifiée ou semi-purifiée.
- La troisième stratégie, qui est d'ailleurs très peu exploitée, consiste à utiliser les bactériocines sous forme d'ingrédient concentré non purifié, issu de la fermentation d'une souche productrice de bactériocine (Deegan *et al.*, 2006).

3.1.4.1 Ajout de bactéries lactiques bactériocinogènes

Les avantages de l'utilisation de bactéries lactiques bactériocinogènes dans un aliment sont nombreux. Cela permet d'une part une conservation biologique sans avoir recours aux additifs chimiques, étant donné le statut GRAS de ces bactéries (Rodgers, 2001). Elles donnent donc une image naturelle au produit en question. D'autre part, la croissance de ces bactéries est régulée par la température et permet la production continue de bactériocine *in situ* dans la matrice alimentaire, ce qui réduit les problèmes liés à la décomposition et à l'adsorption des bactériocines aux constituants alimentaires lorsqu'elles sont ajoutées directement au produit. Cependant, ces bactéries ne doivent pas altérer les caractéristiques organoleptiques et sensorielles de l'aliment dans le cadre de leur utilisation dans un produit non fermenté (Abee *et al.*, 1995; Rodgers, 2001).

3.1.4.2 Ajout de bactériocines pures ou semi-purifiées

L'ajout de bactériocine pure ou semi-purifiée directement dans l'aliment permet généralement une inhibition rapide des microorganismes indésirables. Cependant, il n'en demeure pas moins que sous cette forme, elles sont peu stables dans la matrice alimentaire. Par ailleurs, l'utilisation de bactériocine pure n'est pas une stratégie attrayante pour l'industrie car celle-ci doit être préalablement approuvée en tant qu'additif alimentaire par la législation. De plus, le rendement de purification des bactériocines est faible (de l'ordre de 50 à 100 µg/ml), ce qui rend leur utilisation difficilement accessible en termes de quantité, en plus d'être coûteuse (Naghmouchi, 2007).

3.1.4.3 Ajout de bio-ingrédient concentré à base de bactériocine

Très peu de bactériocines ont été développés en tant qu'ingrédients dans les aliments. La Nisapline™ est le seul exemple d'ingrédient concentré non purifié issu de techniques de grade alimentaire et qui est actuellement utilisé en tant qu'additif alimentaire. La Nisapline™ provient de la fermentation de lait écrémé avec la souche productrice de nisine, *Lactococcus lactis* et elle est utilisée de manière efficace dans plusieurs applications alimentaires. Cependant, étant donné qu'elle apparaît inefficace dans certaines applications, il est donc nécessaire de développer de nouveaux ingrédients pour leur utilisation dans certains types de produits alimentaires. La pediocine PA-I/AcH (Rodriguez *et al.*, 2002) et la lacticine 3147

(*Lb. Lactis* DPC 3147) (Morgan *et al.*, 1999) ont aussi été testées en tant que bio-ingrédients dans différents produits laitiers mais ne sont pas encore appliquées en industrie.

3.2 Généralités sur les entérobactéries

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par Rahn en 1937 qu'il dénomma *Enterobacteriaceae*. Si le nom de famille est toujours maintenu, en revanche le classement des bactéries dans la famille a beaucoup évolué (Joly et Reynaud, 2007).

Actuellement, les entérobactéries sont classées sur la base du séquençage des ARN5S et 16S dans :

- Domaine : *Eubacteria*
- Phylum XII : *Proteobacteria*
- Classe : *Cammaproteobacteria*
- Ordre des *Enterobacteriales*
- Famille des *Enterobacteriaceae* (Meyer *et al.*, 2004).

44 genres sont regroupés en cinq tribus, d'après leurs propriétés fermentatives : *Escherichiae*, *Klebsielleae*, *Proteae*, *Yersiniaet Erwiniae* (Larpen, 2000). Les genres les plus communément isolés en bactériologie clinique sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* et *Yersinia* (Morice, 2003).

Le nom « entérobactérie » fait référence à la localisation de cette famille de microorganismes dans le tube digestif et principalement le côlon de l'homme et des animaux (Scheftel, 2008). La famille des entérobactéries se définit par un ensemble de caractères généraux communs. Ce sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, le plus souvent mobiles grâce à une ciliature péritriche mais immobiles dans le cas des bactéries des genres *Klebsiella*, *Shigella* et *Yersinia pestis*. Elles fermentent le D-glucose avec ou sans production de gaz et réduisent les nitrates en nitrites. Elles n'ont pas d'oxydases et possèdent une catalase (Joly et Reynaud, 2007). Elles sont aérobies-anaérobies facultatives et elles cultivent sur les milieux ordinaires. La température optimale de croissance est 37°C mais la culture est possible entre 20°C et 40°C. Leur temps de division varie de 20 à 40 minutes. Sur gélose, les colonies sont lisses et régulières et atteignent 2 millimètres de large sauf celles des *Yersinia*, qui sont plus petites. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis

uniforme. En milieu liquide, les entérobactéries occasionnent un trouble uniforme de bouillon (Decoster, 2005).

Les entérobactéries sont une famille très hétérogène pour ce qui est de leur pathogénie et de leur écologie. 130 espèces sont en effet soit parasites (*Shigella*, *Yersinia pestis*), soit commensales (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp.), soit encore saprophytes (*Serratia* spp., *Enterobacter* spp.) (Decoster, 2005; Morice, 2003). Elles semblent plus spécifiquement adaptées à l'homme ou l'animal ; certaines sont responsables d'infections humaines parfois sévères (fièvre typhoïde, dysenterie bacillaire, peste). D'autres groupes pourtant prolifèrent en abondance dans l'environnement (sol-eaux). Elles participent aux grands cycles de dégradation des matières organiques ou sont étroitement associées aux plantes chez lesquelles elles peuvent déterminer des altérations nuisibles dans le domaine agro-alimentaire (nécroses, dégénérescence ou ramollissement tissulaire, pourriture molle) (Philippon, 2001).

Les entérobactéries fréquemment rencontrées en bactériologie clinique, alimentaire, des eaux... sont succinctement présentées en considérant leur habitat naturel ou leur habitat lié aux activités anthropiques, leurs caractères particuliers, leurs pouvoirs pathogènes ou leur intérêt (Delarras, 2007). Seuls les genres et les espèces qui ont un intérêt médical reconnu seront envisagés par la suite. Une centaine d'espèces d'*Enterobacteriaceae* sont individualisées, mais 23 d'entre elles représentent 99% des souches isolées en clinique (Avril *et al.*, 2000).

3.3 Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques

3.3.1 Définition

Depuis les débuts de l'utilisation des antibiotiques, les bactéries n'ont cessé de développer différentes stratégies de résistance. En Avril 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié un texte intitulé « La résistance aux antimicrobiens : rapport mondial sur la surveillance en 2014 » (World Health Organisation. 2014.). Le rapport met l'accent sur la résistance aux antibiotiques chez sept espèces bactériennes responsables d'infections graves, parmi lesquelles figurent *E. coli* et *K. pneumoniae*.

Par définition, la multirésistance aux antibiotiques (MDR) caractérise les bactéries qui présentent une résistance, naturelle ou acquise, à au moins 3 classes d'antibiotiques (Magiorakos et *al.*, 2012). Echappant aux traitements de première intention, les infections à bactéries MDR entraînent un retard à la mise en place d'une antibiothérapie adaptée et contribuent à une augmentation de la mortalité des patients (Schwaber et *al.*, 2006).

3.3.2 Mécanisme de résistance

D'une façon générale, la résistance acquise aux antibiotiques fait appel à trois grandes catégories de mécanismes :

- Inactivation de l'antibiotique liée à la production d'enzymes,
- Modification de la cible de l'antibiotique,
- Défaut d'accumulation de l'antibiotique, due soit à un défaut de pénétration intracellulaire (diminution de l'influx membranaire), soit à l'expulsion de l'antibiotique hors de la bactérie (efflux membranaire).

3.5.2. Résistance par inactivation enzymatique de l'antibiotique

Chez les entérobactéries, ce mécanisme de résistance majeur concerne plusieurs familles d'antibiotiques, principalement les β -lactamines et les aminosides, mais également les quinolones et le chloramphénicol.

3.5.2.1. Résistance aux β -lactamines

Les β -lactamines agissent par inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane, réseau complexe formé de chaînes polysaccharidiques reliées entre elles par des ponts peptidiques, qui est un constituant essentiel de la paroi bactérienne. Les cibles moléculaires des β -lactamines sont des enzymes appelées « protéines de liaison aux pénicillines » (PLP), qui catalysent des réactions de transglycosylation et de transpeptidation assurant la formation du peptidoglycane (Spratt. 1975). L'inhibition de la synthèse de la paroi entraîne un arrêt de la croissance bactérienne (effet bactériostatique) tandis que l'effet bactéricide des β -lactamines est probablement lié à l'activation d'autolysines (Tomasz. 1986).

Le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines observé chez les entérobactéries est la production d'enzymes inactivatrices, qui hydrolysent la liaison amide au

niveau du cycle β -lactame, d'où leur nom de β -lactamases. Les β -lactamases, dont le support génétique peut être chromosomique ou plasmidique, sont produites à l'état de précurseur dans le cytoplasme et deviennent matures en perdant leur peptide signal lors de leur transfert à travers la membrane cytoplasmique. Comme elles ne peuvent pas franchir la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, elles restent concentrées dans l'espace périplasmique où elles inactivent les β -lactamines avant que ces dernières n'atteignent leur cible.

PARTIE

EXPERIMENTALE

4 Matériels et méthodes

4.1 Lieu d'étude

Cette étude a été réalisée au niveau de laboratoire de microbiologie de l'université de Tébessa.

4.2 Objectives d'étude

Notre étude vise à évaluer le potentiel des bactéries lactiques productrices des substances antimicrobiennes. Il vise également à :

- ❖ Rechercher des bactéries lactiques à partir des produits laitiers (le jben).
- ❖ Identifier les bactéries lactiques isolées.
- ❖ Etudier l'activité antimicrobiennes des bactéries lactiques productrices des substances antimicrobiennes vis-à-vis les souches multirésistances aux antibiotiques.

4.3 Matériel utilisé

4.3.1 Milieux de culture

Les milieux utilisés pour isoler et caractériser les souches lactiques sont nombreux.

- ❖ Milieu M17 : Ce milieu convient pour l'isolement des Streptocoques lactiques.
- ❖ Milieu MRS agar : utilisé pour l'isolement du genre *Lactobacillus*.
- ❖ Gélose nutritif
- ❖ Muller Huntten agar
- ❖ MRS bouillon

La stérilisation des milieux est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 min. Le milieu lait est stérilisé à 110°C pendant 10 min.

4.3.2 Matériel biologique et produits chimiques

- ❖ Ethanol 96% (Sigma-Aldrich)
- ❖ Eau oxygénée
- ❖ Kit coloration Gram
- ❖ Fromage traditionnel « Jben »
- ❖ Lait de chèvre cru

4.4 Méthodes

4.4.1 Isolement, purification et conservation des souches

Les étapes d'isolement, de purification et de conservation des souches (figure 06) sont presque identiques pour les genres recherchés. La différence réside dans la nature des milieux de culture ainsi que dans les durées et les températures d'incubation.

▪ Isolement

A partir de l'échantillon, nous avons effectué initialement des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-6} .

Après plusieurs essais, seules les dilutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} sont retenues pour ensemercer les milieux de cultures solides M17 et MRS coulés en boîtes de Pétri. Ces dilutions permettent de repérer des colonies suffisamment séparées.

Les temps et les températures d'incubation sont adaptés à chaque genre :

- Incubation à 30°C pendant 48h pour l'isolement des espèces du genre *Streptococcus* sur M17.

- Incubation à 37°C pendant 72h pour l'isolement des espèces du genre *Lactobacillus* (Leveau *et al.*, 1991).

Pour chaque échantillon de lait, l'observation des colonies est réalisée simultanément pour toutes les dilutions.

▪ Purification

A partir des colonies isolées sur boîtes de Pétri présentant la morphologie et la pigmentation proche de celles des bactéries lactiques, on procède à un premier repiquage sur les bouillons spécifiques d'enrichissement. Ainsi les colonies isolées sur gélose MRS et M17 sont repiquées respectivement sur bouillon MRS et bouillon Elliker puis incubées pendant 48 h, par la suite on réalise un deuxième isolement sur gélose spécifique à partir de la culture sur bouillon d'enrichissement.

Après incubation aux temps et température appropriés à chaque genre, on vérifie s'il s'agit toujours du même type de colonies que celles isolées dans la première étape et ceci par l'observation directe de leurs caractères morphologiques. On effectue un deuxième repiquage sur les bouillons d'enrichissement à partir de colonies bien distinctes.

Ainsi les isolats supposés appartenir aux genres de bactéries lactiques sont repiqués sur leurs milieux d'enrichissement puis incubées à 37°C pendant 24 h. A partir des cultures sur bouillon et à l'aide d'une pipette stérile, on ensemence du lait écrémé stérile réparti en tubes.

4.4.2 Identification des bactéries lactiques isolées

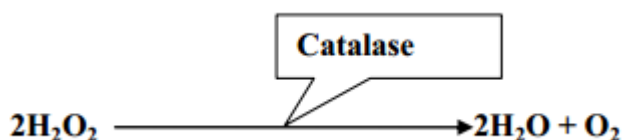
L'identification des souches a été réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Toutes les techniques d'identification ont été décrites par Larpent (1997), Idoui et Karam (2008) et Gusils *et al.* (2010).

4.4.2.1 Examen microscopique

Après l'examen macroscopique des colonies sur gélose MRS, et dans le but d'écartier tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram (annexe), celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement.

4.4.2.2 Tests physiologiques et biochimiques

a. Recherche de la catalase : La catalase est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester.



b. Croissance à différentes températures : Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation du bouillon MRS par les cultures pures, les tubes sont incubés pendant 24h à 48h aux températures 10°C, 39°C et 45°C, au bout de ce délai, la croissance est appréciée

par examen des milieux. Les bactéries mésophiles poussent à 10°C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas.

c. Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH) :

La recherche de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques. Cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine. Pour réaliser ce test, le bouillon Mœller à arginine a été étudié expérimentalement et ensemencé par les cultures à tester. Après une incubation à 37°C pendant 24h, la culture dans le milieu de base se manifeste par le virage du milieu au jaune dû au métabolisme du glucose. La dégradation de l'arginine et la libération de l'ammoniac empêchent le virage au jaune.

d. Type fermentaire :

Ce test permet de classer les bactéries en hétérofermentaire ou homofermentaire. Il est effectué dans un milieu dépourvu de citrate pour éviter la formation de CO₂ liée à ce métabolisme particulier (Dicks et Van Vuuren, 1987). On ensemence abondamment un tube de 10 ml de bouillon MRS (sans citrate) ou M17 dans le milieu on introduit une cloche de Durham, le CO₂ dégagé par les bactéries hétérofermentaires s'accumule dans la cloche après l'incubation à 30°C pendant 24 à 48 h.

4.4.2.3 Identification par la galerie API 50CHL

Les galeries API 50 CHL (Biomérieux, REF 50 300, France) permettent une identification des bactéries lactiques au niveau de l'espèce et même parfois de la sous-espèce sur la base de la fermentation de 49 sucres différents.

La galerie API 50 CHL est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

Préparation des galeries :

- Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés.
- Préparer une boîte d'incubation (fond et couvercle)
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

- Répartir environ 10 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.
- Sortir les bandes de leur emballage, séparer en deux les bandes 0-19 et 20-39 et les déposer dans le fond de la boîte d'incubation.
- Compléter la galerie avec la bande 40- 49

Préparation de l'inoculum :

- Cultiver les bactéries sur un milieu adapté à sa croissance
- Après 24 h d'incubation, la culture est récupérée par centrifugation à 3100 tr/mn pendant 10 mn, le culot est rincé 2 fois à l'eau physiologique stérile.
- Préparer l'inoculum dans le milieu de l'API50 CHL.

Inoculation des galeries :

- Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie en se conformant aux précautions suivantes :
- Incliner légèrement vers l'avant la boîte d'incubation.
- Eviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule.
- Lorsque les tubes doivent être inoculés, les cupules sont remplies avec de l'huile de paraffine stérile.
- Incuber les galeries à la température optimum de croissance de bactéries étudiées.
- Durant la période d'incubation, la fermentation des sucres est indiquée par une couleur jaune exceptée pour l'esculine (brun foncé). Les résultats sont lus à 24 h et vérifiés après 48 h d'incubation.
- L'interprétation des résultats peut se faire par le logiciel Api Web (BioMérieux) pour identifier les bactéries lactiques.

4.4.3 Etude de l'activité antibactérienne des souches lactiques

4.4.3.1 Souches bactériennes et leurs origines

Les bactéries utilisées (témoins négatifs) comme souches tests (souches testées pour leur activité antagoniste) et souches indicatrices (souches sur lesquelles est testée l'action inhibitrice des bactéries productrices de facteurs antibactériens) sont indiquées dans le tableau 06.

Tableau 06 : Les souches bactériennes utilisées et leurs origines

	Microorganismes	Sources	Profil d'antibiogramme	Phénotypes de résistance détectés
Souches indicatrices	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 01	ECBU	AMC ^R , AM ^R , TI ^R , TZP ^R , CF ^R , CTX ^S , FOX ^R , CAZ ^R , ETP ^S , IPM ^S , AK ^S , GEN ^R , TM ^R , NA ^R , CIP ^R , OFX ^R , NIF ^R , SXT ^S .	Béta-lactamase à spectre étendu
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 04	ECBU	AMC ^R , AM ^R , TI ^R , TZP ^R , CF ^R , CTX ^R , FOX ^R , CAZ ^R , ETP ^S , IPM ^S , AK ^S , GEN ^R , TM ^R , NA ^S , CIP ^S , OFX ^S , NIF ^R , SXT ^R .	Béta-lactamase à spectre étendu
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 11	ECBU	AMC ^R , AM ^R , TI ^R , TZP ^I , CF ^R , CTX ^S , FOX ^R , CAZ ^R , ETP ^S , IPM ^S , AK ^S , GEN ^R , TM ^R , NA ^R , CIP ^R , OFX ^R , NIF ^S , SXT ^R .	Béta-lactamase à spectre étendu
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 20	ECBU	AMC ^R , AM ^R , TI ^R , TZP ^R , CF ^R , CTX ^R , FOX ^R , CAZ ^R , ETP ^R , IPM ^R , AK ^S , GEN ^R , TM ^I , NA ^R , CIP ^R , OFX ^R , NIF ^R , SXT ^S .	Imperméabilité carbapénimase (BLSE + ou HN AmpC +), carbapénimase (BLSE + ou-)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 21	ECBU	AMC ^R , AM ^R , TI ^R , TZP ^I , CF ^R , CTX ^R , FOX ^R , CAZ ^R , ETP ^S , IPM ^S , AK ^S , GEN ^S , TM ^I , NA ^R , CIP ^I , OFX ^S , NIF ^I , SXT ^S .	Céphalosporinase à haut niveau (sauf ACC-1) Béta-lactamase à spectre étendu + imperméabilité (céphamycines)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 58	ECBU	AMC ^R , AM ^R , TI ^R , TZP ^R , CF ^R , CTX ^R , FOX ^R , CAZ ^R , ETP ^R , IPM ^R , AK ^S , GEN ^R , TM ^R , NA ^R , CIP ^R , OFX ^R , NIF ^I , SXT ^R .	carbapénimase (BLSE + ou-)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 59	ECBU	AMC ^R , AM ^R , TI ^R , TZP ^R , CF ^R , CTX ^R , FOX ^R , CAZ ^R , ETP ^R , IPM ^R , AK ^S , GEN ^R , TM ^R , NA ^R , CIP ^R , OFX ^R , NIF ^S , SXT ^R .	carbapénimase (BLSE + ou-)

<i>En. cloacae</i> 3	ECBU	AMC ^R , AM ^I , TI ^R , TZP ^S , CF ^R , CTX ^S , FOX ^R , CAZ ^R , ETP ^S , IPM ^S , AK ^S , GEN ^R , TM ^R , NA ^R , CIP ^R , OFX ^R , NIF ^S , SXT ^R .	Béta-lactamase à spectre étendu Céphalosporinase à haut niveau (AmpC)
<i>Salmonella Typhi</i> 14	Hémoculture	AMC ^S , AM ^S , TI ^S , TZP ^S , CF ^R , CTX ^R , FOX ^S , CAZ ^S , ETP ^S , IPM ^S , AK ^R , GEN ^R , TM ^R , NA ^S , CIP ^S , OFX ^S , NIF ^S , SXT ^S .	sauvage
<i>Staphylococcus aureus</i> 07	Pied diabétique	KA ^S , FOX ^R , P ^R , GEN ^S , TM ^S , E ^R , DA ^R , FO ^S , FA ^R , RA ^S , C ^R , TI ^S , OFX ^S , SXT ^S , CIP ^S .	sauvage
<i>Staphylococcus aureus</i> 09	ECBU	KA ^S , FOX ^S , P ^R , GEN ^S , TM ^R , E ^R , DA ^R , FO ^R , FA ^R , RA ^S , C ^S , TI ^S , OFX ^S , SXT ^R , CIP ^S .	sauvage
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Institut pasteur	AMC ^S , FOX ^S , CRO ^S , CAZ ^S , AN ^S , ATM ^S , SEF ^S , BIS ^S , CIP ^S , GEN ^S , IMP ^S	/
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Institut pasteur	AN ^S , PIP ^S , SEF ^S , IMP ^S , SUL ^S , CIP ^S , CAZ ^S , TZP ^S	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Institut pasteur	OXA ^S , P ^S , E ^S , CC ^S , GEN ^S , CIP ^S , BIS ^S	/

ATCC: American Type Culture Collection, Virginia, USA

S: sensible, **R:** résistante.

AMC : Amoxicilline + acide clavulanique, **AM :** Ampicilline, **TI :** Ticarciline, **TZP :** Pipéracilline + tazobactam, **CF :** Céfaloine, **CTX :** Céfotaxime **FOX :** céfoxitine, **CAZ :** Ceftazidime, **ETP :** Ertapénème, **IPM :** Imipénème, **AK :** Amikacine, **GEN :** Gentamycine, **TM :** Tobramycine, **NA :** Acide nalidixique, **CIP :** Ciprofloxacine, **OFX :** Ofloxacine, **NIF :** Nitrofurantoïne, **SXT :** Triméthoprim + sulfaméthoxazole, **PIP:** Piperacilline, **CRO:** Ceftriaxone, **FEP:** Cefepime, **ATM:** Aztreonam, **BIS:** Biseptol (Sulfaméthoxazole/Triméthoprim),

SUL: Sulbactam/Cefoperazone,; **P:** Pénicilline G, **OXA:** Oxacillin, **E:** Erythromycin, **CC:** Clindamycine, **CEF:** Céfépime, **KA:** Kanamycine, **P:** Pénicilline, **DA** Clindamycine, **FO:** Fosfomycine, **FA:** Acide furique, **RA:** Rifampicine, **C:** Cloranphénicol

Les bactéries isolées portent les numéros qui leur sont attribués dans la collection du laboratoire. Pour tous les tests visant à révéler ou à mesurer l'activité bactéricide des bactériocines.

Les bactéries sont conservées dans un mélange glycérol (30%), bouillon cerveau-coeur (70%) à -20°C. Pour une conservation de courte durée, elles sont gardées sur une gélose de conservation de souches à 4°C. Avant leur utilisation, les bactéries sont revivifiées par une ou deux subcultures dans des bouillons choisies (suivant les souches) à 30°C pendant 18 à 24 h.

4.4.3.2 Souches de références

Pour les tests d'activité antibactérienne, nous avons choisi trois micro-organismes pathogènes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27883, ces bactéries sont des souches de références fournis par l'Institut Pasteur (Alger).

ATCC: American Type Culture Collection

4.4.3.3 Les bactéries utilisées (témoins négatifs) comme souches tests

Les souches d'entérobactéries sont fournies par Bouguessa Amel et isolées au niveau de laboratoire de microbiologie (EPH Bouguerra Boulaares), identifiées par le système automatisé VITK.

4.4.4 Criblage des souches à activité antimicrobienne

4.4.4.1 Méthode de détection indirecte

Les souches purifiées sont testées pour la production de substances antibactériennes autres que les acides organiques suivant la méthode des puits (méthode indirecte) de

Méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983) (figure 03). Un bouillon MRS est inoculé par la souche à tester au $1/10^3$ à partir d'une culture de 18 h à 37°C (fin de la phase exponentielle) de façon à obtenir 10^2 à 10^3 UFC/ml, puis incubé pendant 18 h à 37°C . La culture obtenue est centrifugée à 5000 g pendant 10 min et à 4°C . Le surnageant est ajusté à pH 6 avec de la soude 1M (Merck), puis filtré (filtre d'ester mixte de cellulose, $0,45\ \mu\text{m}$, Costar). Le filtrat obtenu constitue l'extrait de culture. Parallèlement, des boîtes de Pétri sont préparées de la façon suivante : des boîtes sont recouvertes de 10 ml de gélose MHensemencée avec une souche indicatrice. Après solidification, des puits de 6 mm de diamètre sont creusés dans la gélose à l'aide d'un tube stérile. Les boîtes sont ensuite séchées pendant 20 min, avant que les puits soient remplis d'extrait de culture ($100\ \mu\text{l}$). Après diffusion complète de ce dernier dans la gélose (1 à 2 h à température ambiante), les boîtes sont incubées pendant 18 h à 37°C , puis examinées pour la présence de zones d'inhibition (zones claires dans une nappe trouble formée par la croissance de la bactérie indicatrice) autour des puits.

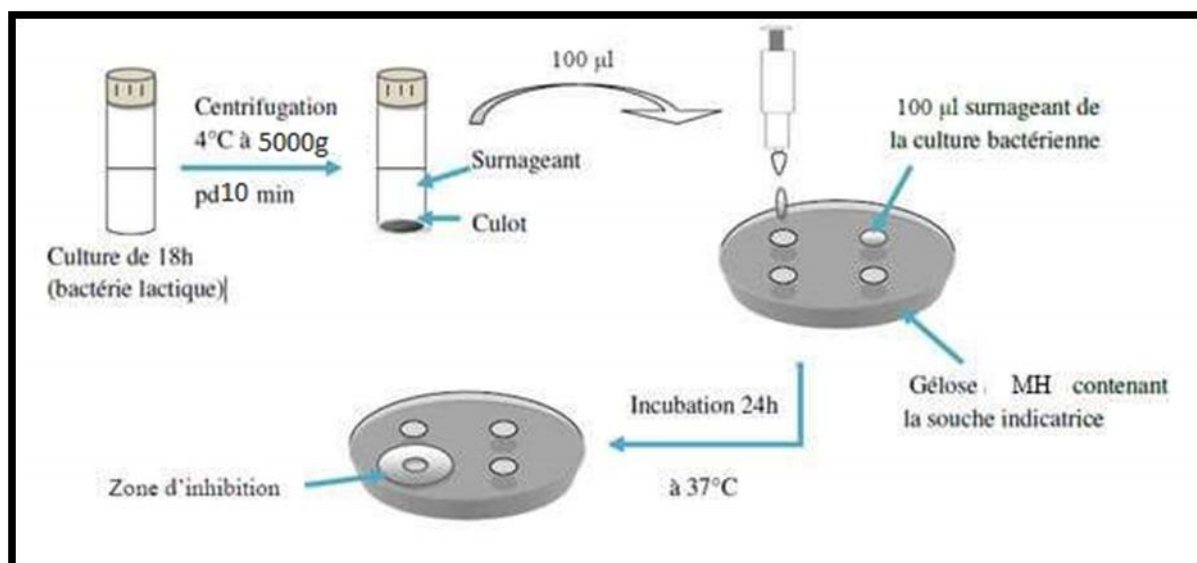


Figure 03 : Schéma représentant les méthodes de détection de l'antagonisme bactérien, adaptées d'après la méthode de diffusion en puits de Méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983).

4.4.4.2 Mesure de l'activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne est estimée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition observée autour des puits (figure 03) (double de la distance en mm allant du centre du puit jusqu'au point où se termine l'inhibition de la croissance (fin de la zone d'éclaircissement)).

5 Résultats

5.1 Pré-Identification des isolats

Lors de cette étude nous avons identifié les souches isolées à partir du Jben et du lait de chèvre sur gélose MRS et M17 par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Les isolats Gram positif, catalases négatifs sont étudiées.

5.1.1 Aspect macroscopique

Les souches pures donnent sur gélose MRS des colonies de tailles variables avec une couleur blanchâtre ou laiteuse, de 2 à 3 mm de diamètre (**Figure 04**).



Figure 04 : Aspect des colonies de bactéries lactiques sur le milieu MRS

5.1.2 Test de catalase

Toutes les souches isolées ne représentaient pas d'effervescence lors de l'ajout d'une goutte de H₂O₂, ce qui s'explique par le fait que ces bactéries ne possèdent pas d'activité catalasique.

5.1.3 Aspect microscopique

Après une coloration de Gram, l'aspect microscopique des souches a révélé deux formes de cellules : bacille, coccobacille et cocci (**figure 06**), dont 8.82 % sont des bacilles, 70.58% sont des coccobacilles et 20.58 % sont des cocci (**Figure 05**).

Les résultats de l'examen microscopique des 10 souches sont illustrés dans le **tableau**.

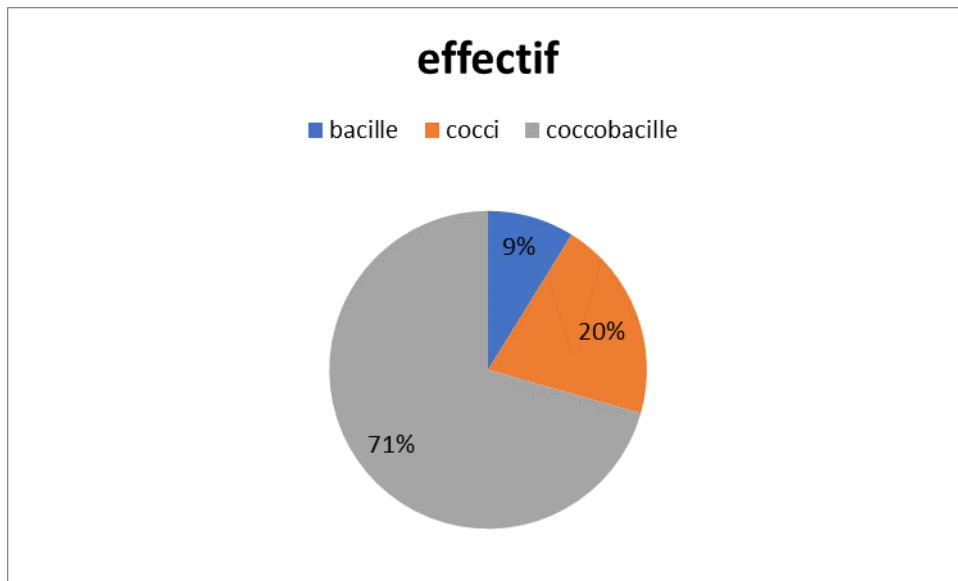


Figure 05 : Distribution du pourcentage des isolats lactiques (%)

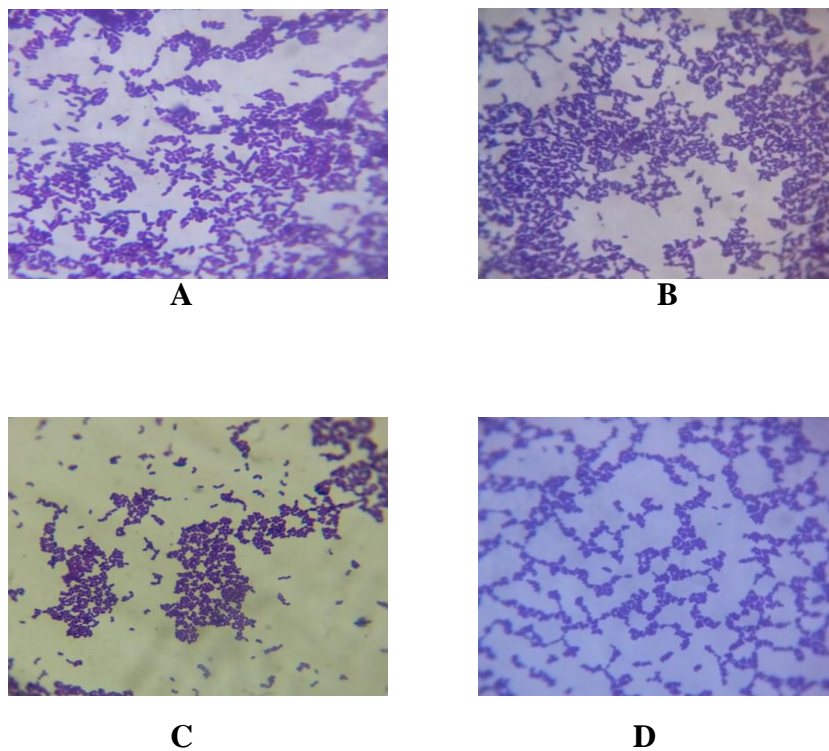


Figure 06 : différente forme microscopique de bactéries lactiques obtenues au laboratoire de microbiologie appliquée. *Lb.paracasei* subsp. *paracasei* (A), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (B), *Pedicoccus pentosaceus* 1 (C), *Pedicoccus pentosaceus* 2 (D) .

Tableau 07 : Morphologie des souches lactiques étudiées.

Morphologie	Isolats	Mode de regroupement	Morphologie	Isolats	Mode de regroupement
Bacille	-s7t	-regroupées en chaînette et en amas	Cocci	-s19	- regroupées en diplo et en chaînette
	-s18	- regroupées en paire et en tétrade			
	-s14	- regroupées en chaînette			
Coccobacille	-s26	- regroupées en diplo et en chaînette		-s7	- regroupées en diplo et en chaînette
	-s32	- regroupées en diplo et en amas			
	-s40	- regroupées en diplo et en chaînette			
	-s15	- regroupées en chaînette et en amas		-s8	- regroupées en diplo et en chaînette
	-s25	- regroupées en diplo et en amas			
	-s61	- regroupées en chaînette et en amas			
	-s23	- regroupées en chaînette et en amas		-s49	- regroupées en amas
	-s9t	- regroupées en diplo et en chaînette			
	-s35	- regroupées en diplo et en chaînette		-s58	- regroupées en diplo et en chaînette
	-s48	- regroupées en diplo et en chaînette			
	-s46	- regroupées en chaînette et en amas			
	-s54	- regroupées en diplo et en chaînette		-s49	- regroupées en diplo et en amas
	-s44	- regroupées en diplo et en chaînette			
	-s47	- regroupées en chaînette		-s1	- regroupées en diplo et en chaînette
	-s5	- regroupées en diplo			
	-s45	- regroupées en diplo et en chaînette			
	-s53	- regroupées en diplo et en chaînette			
	-s4	- regroupées en diplo et en chaînette			
	-s3	- regroupées en diplo et en chaînette			
	-s6	- regroupées en chaînette			
-s24	- regroupées en chaînette et en amas				
-s21	- regroupées en diplo et en chaînette				
-s31	- regroupées en chaînette et en amas				
-s34	- regroupées en diplo et en amas				

5.2 Identification des souches

5.2.1 La galerie API 50 CHL

Parmi les 42 souches isolées, 10 souches (s26, s32, s40, s7t, s14, s15, s25, s18, s61, s23) ont été sélectionnées pour une identification approfondie avec la galerie API 50 CHL, cette élection est basée sur leurs activités antimicrobiennes en se référant à une étude antérieure réalisée au laboratoire.

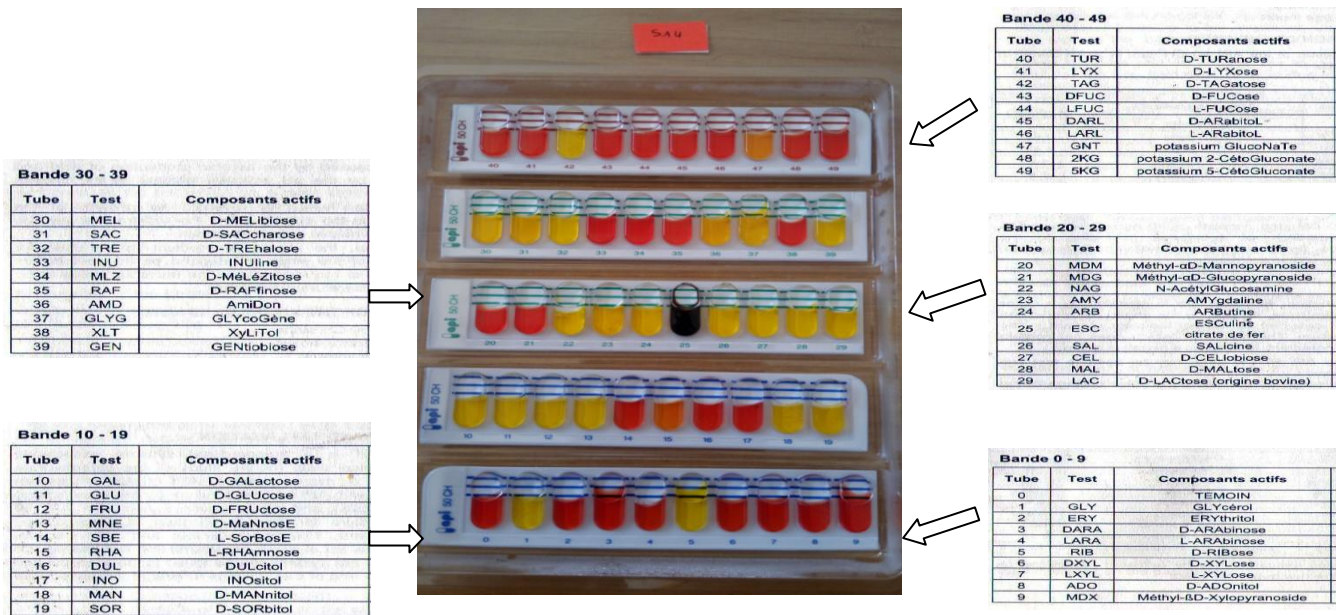


Figure 07 : Résultat du profil fermentaire de la souche: *Lb. plantarum* sur la galerie API 50 CHL après 48 h d'incubation.

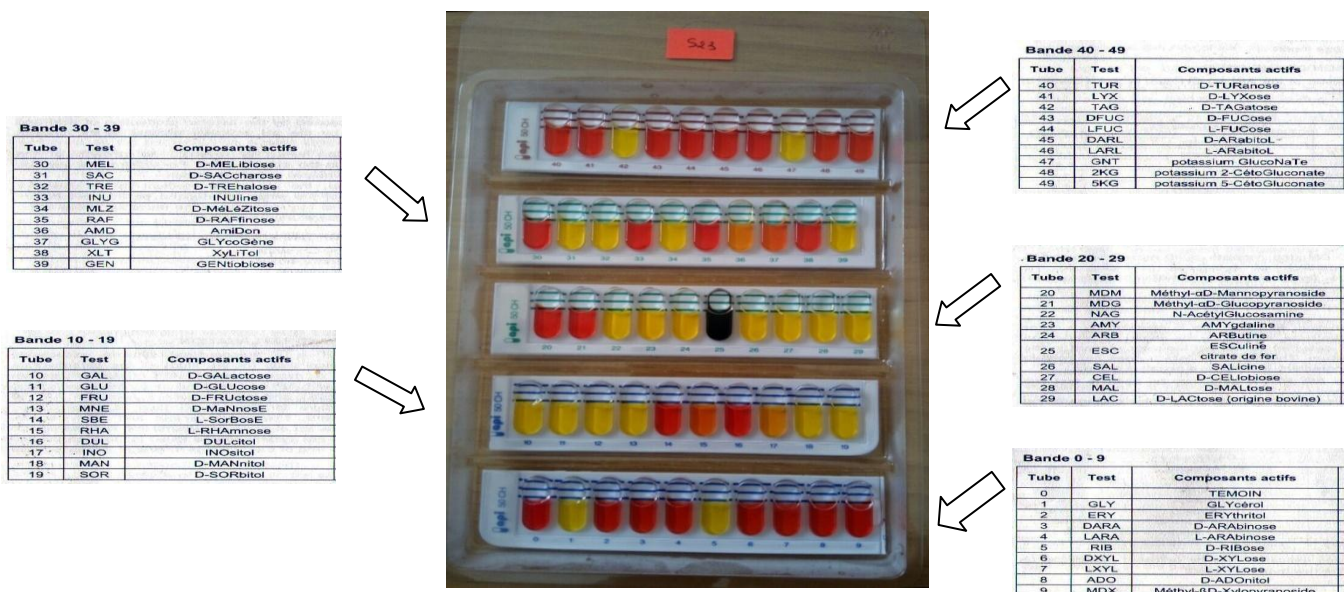


Figure 08 : Résultat du profil fermentaire de la souche : *Lactococcus lactis* subsp *lactis* 01 sur la galerie API 50 CHL après 48 h d'incubation.

Tableau 7a : profils fermentaires des isolats par les galeries API 50 CHL

	Souches Sucres	S18		S61		S15		S32		S25	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
01	GLY	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
02	ERY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03	DARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04	LARA	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
05	RIB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
06	DXYL	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
07	LXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
08	ADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
09	MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	GAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	SBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	RHA	-	-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-
16	DUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
18	MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	MDM	-	-	+/-	+	-	+/-	-	+/-	-	-
21	MDG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	AMY	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	ARB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	SAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	CEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

29	LAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	MEL	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
31	SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	TRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	MLZ	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
35	RAF	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
36	AMD	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+/-
37	GLYG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	XLT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	GEN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	TUR	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	LYX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	TAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43	DFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	LFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	DARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	LARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	GNT	+	+	-	-	-	+	-	+/-	+	+
48	2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	5KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Souches identifiés		<i>Lb.pentosus</i>		<i>Pediococcus pentosaceus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Pediococcus pentocuceus</i>		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	

Tableau 7 b : profils fermentaires des isolats par les galeries API 50 CHL

	Souches	S23		S26		S7t		S14		S40	
	Sucres	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
01	GLY	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
02	ERY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03	DARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04	LARA	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
05	RIB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
06	DXYL	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
07	LXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
08	ADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
09	MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	GAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	SBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	RHA	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	-	+/-
16	DUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	INO	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18	MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	MDM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
21	MDG	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
22	NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	AMY	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	ARB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	SAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	CEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

29	LAC	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+
30	MEL	-	-	+	+	+	+/-	+	+	+	+
31	SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	TRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	MLZ	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
35	RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
36	AMD	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
37	GLYG	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
38	XLT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	GEN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	TUR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	LYX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	TAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43	DFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	LFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	DARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	LARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	GNT	+	+	-	+/-	+	+	-	+	+	+
48	2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	5KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Souches identifiés		<i>Lactococcus Lactis ssp Lactis</i>		<i>Lactococcus Lactis ssp Lactis</i>		<i>Lb.paracasei subsp.paracasei</i>		<i>Lb.plantarum</i>		<i>Enterococcs Faecalis</i>	

0: Témoin, **GLY:** Glycérol, **ERY:** Erythritol, **DARA:** D-Arabinose, **LARA:** L-Arabinose, **RIB:** DRibose, **DXYL:** D-Xylose, **LXYL:** L-Xylose, **ADO:** D-Adonitol, **MDX:** Méthyl-βD-Xylopyranoside, **GAL:** D-Galactose, **GLU:** D-Glucose, **FRU:** D-Fructose, **MNE:** D-Mannose, **SBE:** L-Sorbose, **RHA:** L-Rhamnose, **DUL:** Dulcitol, **INO:** Inositol, **MAN:** D-Mannitol, **SOR:** D-Sorbitol, **MDM:** Méthyl-αDMannopyranoside, **MDG:** Méthyl-αD-Glucopyranoside, **NAG:** N-AcétylGlucosamine, **AMY:** Amygdaline, **ARB:** Arbutine, **ESC:** Esculine, **SAL:** Salicine, **CEL:** D-Cellobiose, **MAL:** D-Maltose, **LAC:** D-Lactose, **MEL:** D-Mélibiose, **SAC:** D-Saccharose, **TRE:** D-Trehalose, **INU:** Inuline, **MLZ:** D-Mélizitose,

RAF: D-Raffinose, **AMD:** Amidon, **GLYG:** Glycogène, **XLT:** Xylitol, **GEN:** Gentiobiose, **TUR:** D-Turanose, **LYX:** D-Lyxose, **TAG:** D-Tagatose, **DFUC:** D-Fucose, **LFUC:** LFucose, **DARL:** D-Arabitol, **LARL:** L-Arabitol, **GNT:** Gluconate, **2KG:** 2-CétoGluconate, **5KG:** 5-CétoGluconate.

Les souches isolées ont été identifiées au niveau de l'espèce en utilisant le site internet Abis online bacterial identification (http://www.tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html). L'identification a révélée 6 espèces différentes sur 42 souches, ce qui montre une grande diversité des bactéries composant ces échantillons.

Les résultats obtenus (tableau 07a et 07b) sont comme suit : les deux souches S23 et S26 correspondent à *Lactococcus lactis* subsp *Lactis* avec un pourcentage de 92 et 94% respectivement, les isolats S61, S32 et S25 correspondent à *Pediococcus pentosaceus* avec un pourcentage de 89, 92 et 94%, la S15 et la S40 correspondent à *Enterococcus faecalis* avec un pourcentage de 90%, la S18 correspond à *Lb. pentosus* avec un pourcentage de 88%, la souche S14 se rapproche de l'espèce *Lactobacillus plantarum* avec un pourcentage de similitude de 95%, cependant la souche S7t est également identifiée comme *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* avec un pourcentage similitude de 94%.

5.3 Activité antibactérienne des souches sélectionnées :

Les souches isolées de Iben et du lait cru de chèvre ont été testées pour leur capacité à inhiber les bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques, Gram négatif tel que *Escherichia coli* ATCC 25922 , *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* , *En.cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*01, *Klebsiella pneumoniae* 01, *Klebsiella pneumoniae* 04, *Klebsiella pneumoniae* 11, *Klebsiella pneumoniae* 20, *Klebsiella pneumoniae* 21, *Klebsiella pneumoniae* 58, *Klebsiella pneumoniae* 59 et les Gram positifs comme *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 07, *Staphylococcus aureus* 09.

5.3.1 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

- **Méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983)**

Notre choix s'est donc porté sur une technique largement décrite dans la littérature notamment celle de Barefoot et Kaenhammer (1983) qui nous a permis de faire une sélection des souches lactiques antibactériennes.

Les résultats de l'interaction obtenue, révèlent la présence d'une zone claire au tour des puits de nos collection ensemencées en puits.

Les résultats de l'interaction entre les extraits des bactéries lactiques et les bactéries pathogènes Gram positifs (+) et Gram négatifs (-) sont mentionnées dans les figures suivantes.

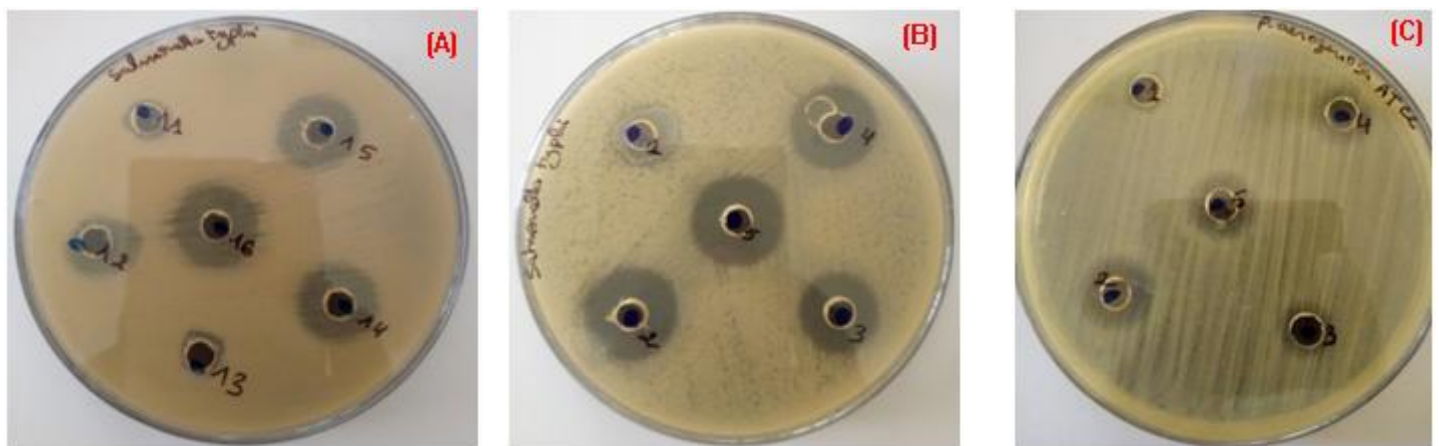


Figure 09 : inhibition de *Salmonella typhi* (A), (B) *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (C) par les extraits actifs des souches bactériocinogènes (S1, S2, S3, S4, S5, S12, S14, S15 et S16).

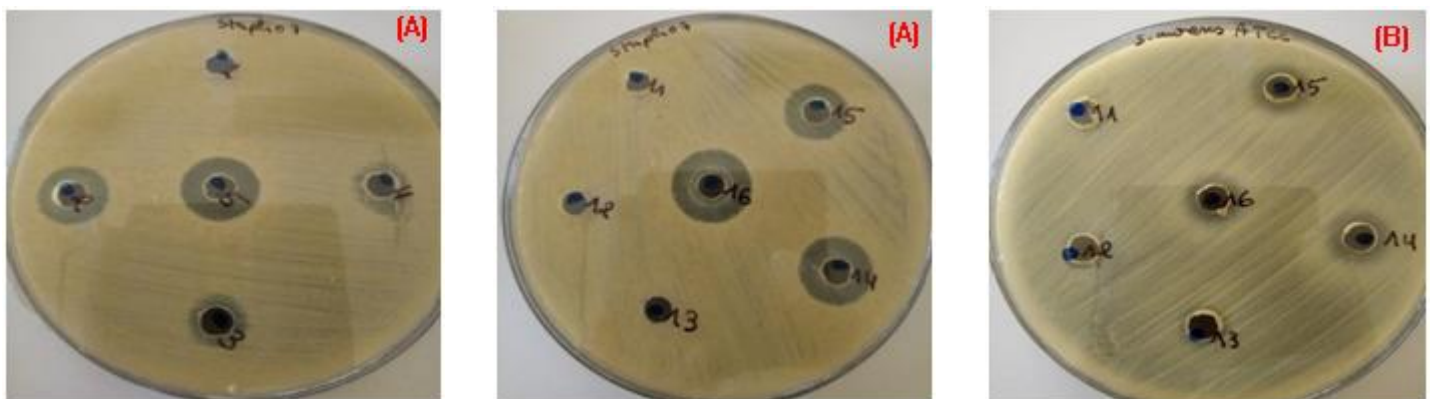


Figure 10 : inhibition *Staphylococcus aureus* 07(A) et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (B) par les extraits actifs des souches bactériocinogènes (S2, S3, S4, S5, S14, S15 et S16).

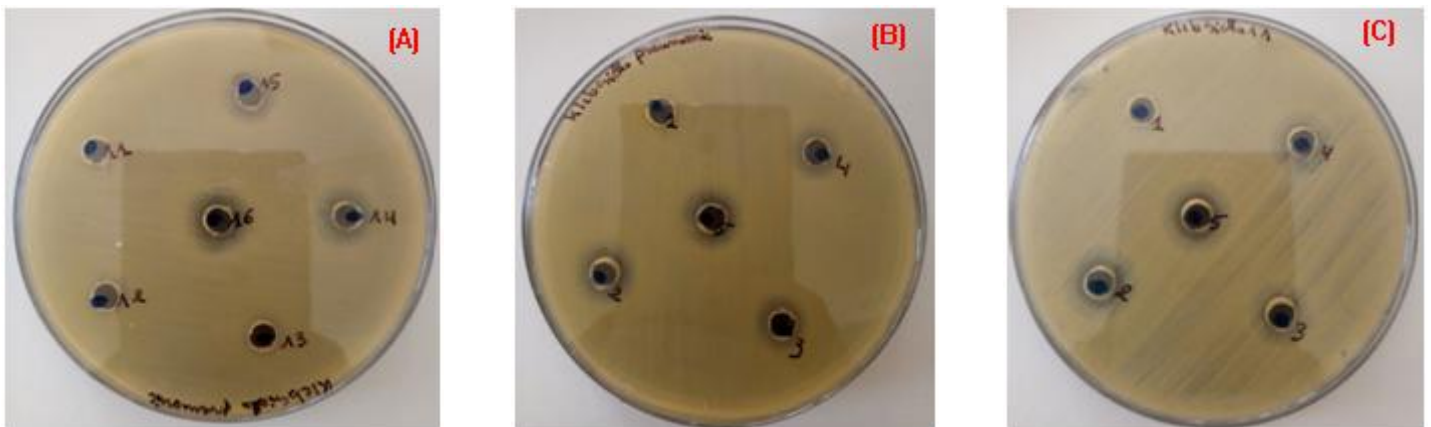


Figure 11 : activité antimicrobienne des souches lactiques (S1, S2, S3, S4, S5, S14, S15 et S16) contre les souches indicatrices ; *Klebsiella pneumoniae* 21 (A), *Klebsiella pneumoniae* 20 (B) et *Klebsiella pneumoniae* 11 (C).

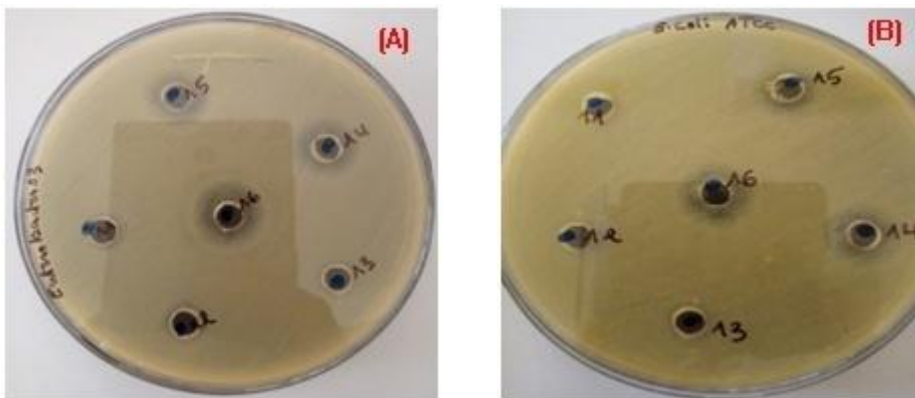


Figure 12 : activité antimicrobienne des souches lactiques (S1, S2, S3, S4, S5, S14, S15 et S16) contre les souches indicatrices ; *En. cloacae* (A), *Escherichia coli* ATCC 25922 (B).

Les résultats des tests d'inhibition des souches pathogènes par les souches lactiques sont aussi exprimés en mm, par mesure de diamètre de la zone d'inhibition (tableau 08a et 08b).

Tableau 08a : Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques par la méthode de Barefoot et Kaenhammer (1983)

Souches indicatrices	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 01	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>Paracasei</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 01	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 02
Gram positifs					
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10	12	00	9	00
<i>Staphylococcus aureus</i> 09	08	12	16	12	10
<i>Staphylococcus aureus</i> 07	12	12	17	13	00
Gram négatifs					
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 01	10	11	00	11	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 04	12	11	00	14	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 11	12	13	00	11	00
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 20	10	11	13	10	00
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 21	00	00	17	00	00
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 58	13	10	14	10	00
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 59	13	10	10	11	00
<i>En. cloacae</i> 03	13	14	00	12	00
<i>E. coli</i> ATCC25922	09	11	14	00	00
<i>Salmonella typhi</i> 14	18	20	00	11	20
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11	15	11	12	10

Tableau 08b : Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques par la méthode de Barefoot et Kaenhammer (1983).

Souches indicatrices	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 02	<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> 1	<i>Pediococcus</i> <i>pentosaceus</i> 03	<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> 2
Gram positifs					
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13	11	13	00	12
<i>Staphylococcus aureus</i> 09	11	12	13	11	12
<i>Staphylococcus aureus</i> 07	16	14	15	00	14
Gram négatifs					
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 01	12	11	12	00	11
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 04	15	11	13	00	12
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 11	15	13	13	00	14
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 20	11	10	12	00	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 21	00	00	12	11	11
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 58	13	12	13	00	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 59	12	13	11	00	13
<i>En. cloacae</i> 03	13	13	13	00	14
<i>E. coli</i> ATCC25922	13	10	13	00	11
<i>Salmonella typhi</i> 14	20	20	18	14	18
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	13	13	14	08	13

- **Spectre d'inhibition**

Les tableaux 08a et 08b représentent les résultats des interactions sur milieu solide MH (Barefoot et Kaenhammer (1983)). Ces tableaux montrent clairement que toutes les 10 souches lactiques utilisées ont une activité inhibitrice contre les souches indicatrices Gram positives et Gram négatifs.

La souche *Pediococcus pentosaceus* 01, présente une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée, sur toutes les bactéries pathogènes testées avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 11 mm à 20 mm), sauf sur *Klebsiella pneumoniae* 21 où aucune inhibition n'a été détectée. Cependant, cette souche s'est montrée très active sur *Salmonella typhi* avec une zone d'inhibition de 20 mm.

Les deux souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 01 et 2 sélectionnées, présentent un spectre d'activité très proche vis-à-vis des germes Gram négatifs et Gram positifs cibles testés. Les diamètres des zones d'inhibition variés de 9 à 20 mm. Parmi les souches indicatrices Gram négatifs testées, nous n'avons constatés que les deux souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* n'exercent aucune inhibition vis-à-vis de la souche *Klebsiella pneumoniae* 21.

La souche *Enterococcus faecalis* 01 présente un spectre d'inhibition très important contre les souches indicatrices Gram+ et Gram -, les longueurs des zones d'inhibition variaient de 11 à 18 mm.

La souche *Enterococcus faecalis* 02 présente un spectre d'inhibition très important contre les souches Gram- tels que *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *Salmonella typhi* (les zones d'inhibition étaient de 14 mm et 8 mm de diamètre) par rapport aux souches Gram-.

La souche *Pediococcus pentosaceus* 02 présente une activité inhibitrice remarquable dirigée contre *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *Salmonella typhi* (diamètres des zones d'inhibition 10 mm et 20 mm) par rapport aux souches Gram-.

La souche *Pediococcus pentosaceus* 03 a montré une activité presque négligeable sur toutes les souches Gram négatif testées sauf sur *Salmonella typhi* (diamètres des zones d'inhibition 14 mm).

La souche *Lb. plantarum* présente un spectre d'inhibition très important contre les souches indicatrices Gram+ et Gram -, Les longueurs des zones d'inhibition variaient de 11 à 20 mm sauf la souche *Klebsiella pneumoniae* 21.

La souche *Lb. pentosus* présente un spectre d'inhibition contre les souches indicatrices Gram + et Gram- sauf la souche *Klebsiella pneumoniae* 21, Les longueurs des zones d'inhibition variaient de 8 à 18 mm.

Tout de même, nous avons constaté une absence totale d'inhibition de la souche *Klebsiella pneumoniae* 21 par *Lb. plantarum* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 01.

6 Discussion

Ce travail avait pour objectif d'isoler, caractériser et sélectionner des souches de LAB appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Lactococcus*, et capables d'être utilisées pour obtenir des laits fermentés type 'Lben' et des fromages frais type 'Jben'. Les travaux faits à la fin du siècle dernier et au tout début de celui-ci avaient montré l'abondance des lactobacilles et des lactocoques dans les laits et fromages frais traditionnellement fermentés en Afrique du Nord et Moyen-Orient (bendimerad, 2013 ; Mechai, 2009). Ces produits sont largement consommés en Algérie et sont obtenus traditionnellement en milieu rural par une fermentation de lait cru, dès sa collecte, à température ambiante par des LAB mésophiles acidifiantes.

Dans notre travail, nous avons établi une collection de 40 isolats dont 30 % issus de laits crus de chèvre et 70 % issus de fromage traditionnel le Jben. L'identification phénotypique a montré que tous les isolats sont des bactéries à Gram positif et ne possèdent pas l'enzyme catalase. Tous étaient des coques ou ovoïdes regroupés en diplo ou en chaînettes, sauf trois isolats sur le milieu MRS, qui se sont révélés être des bacilles courtes.

Au court de dix dernières années, les travaux de recherche sur l'isolement des bactéries lactiques à partir du fromage traditionnel se sont multipliés, Les travaux de Mechai et al. (2014) effectués sur le Jben, ont montré une prédominance du genre *Lactobacillus* (50%), alors que les genres *Leuconostoc* (10%), *Pediococcus* (19%) et *Lactococcus* (21%) . Les entérocoques sont des bactéries lactiques coccoïdes dont les cellules sont ovoïdes et se présentent sous forme de cellules isolées, ou en paires ou encore sous forme de chaînettes (Schleifer et Kilpper-Balz, 1984). Ces bactéries produisent des colonies de couleur blanchâtre. Elles sont généralement catalase négative, oxydase positive, anaérobies facultatives, non mobiles et non sporulées. Dans notre étude, les entérocoques ont été isolés involontairement (2 isolats) sur milieu M17. Leur isolement à partir du milieu M17 était prévisible dans la mesure où les entérocoques pouvaient être à des niveaux de cellules cultivables similaires à ceux des lactocoques ou de toute autre microflore pouvant se développer sur ce milieu. Dans la région méditerranéenne, les souches d'*Enterococcus spp.* a joué un rôle important dans la préparation de divers produits laitiers et carnés fermentés

pendant des siècles, et ils sont essentiels pour la maturation des produits fromagers et au développement de leur arôme (Franz *et al.*, 2011) en raison de la protéolyse, la lipolyse, et la production de diacétyl (Giraffa, 2003).

Les bactéries lactiques possèdent, outre leurs propriétés acidifiantes et leur contribution à la qualité organoleptique d'un aliment, la faculté de produire des substances antagonistes. En effet, lors de la fermentation lactique, différents composés peuvent être synthétisés comme les acides organiques (lactate et acétate), le diacétyl, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines ou polypeptides bactéricides (Lindgren et Dobrogosz, 1990). Ces composés sont largement impliqués dans la conservation alimentaire.

Les bacilles à Gram négatif occupent une place très importante parmi les micro-organismes responsables d'infections nosocomiales (Pagès, 2004). Ces pathogènes appartiennent à différentes familles bactériennes représentées majoritairement par les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Serratiamarcescens* etc.), les *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*), les *Acinetobacter* (*A. baumannii*) et les *Stenotrophomonas* (*S. maltophilia*). Différant par leur virulence, ils présentent en commun la propriété d'avoir naturellement (résistance naturelle), ou de développer (résistance acquise) des résistances aux antibiotiques (Debabza, 2015).

La contamination des denrées alimentaires par les pathogènes Gram positif comme les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) ou les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV), particulièrement dans une situation épidémique, a été fréquemment abordée. Parmi les bactéries multi résistantes, les bactéries sécrétrices des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) prennent une place de plus en plus importante. Elles ont largement été diffusées dans le monde depuis leur première mise évidence en 1983 et font l'objet de nombreuses études (Paterson et Bonomo, 2005). Les gènes des BLSE sont généralement portés par des plasmides sur lesquels ils sont souvent associés à des gènes codant pour d'autres types de résistance (Jacoby et Sutton, 1991). Ces résistances à médiation plasmidique étaient pour la majorité présentes chez *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* et *Escherichia coli* (Debabza, 2015).

Devant cette situation, la bio-conservation (ou bio-préservation) est une nouvelle approche de conservation basée sur l'utilisation de méthodes impliquant des conservateurs naturels et/ou biologiques et qui est dorénavant préconisée dans l'industrie alimentaire. la bio-préservation utilise des microorganismes antagonistes ainsi que leurs métabolites (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl, bactériocines, etc.) pour inhiber ou détruire les microorganismes indésirables dans les aliments. Les bactéries lactiques sont donc les acteurs essentiels de cette bio-préservation.

Dans la présente étude, sur un total de 42 souches lactiques criblées pour la production d'agents inhibiteurs en employant la méthode de diffusion en puits, 10 souches bactériocinogènes ont présenté une activité antagoniste dirigée contre des souches indicatrices Gram négatif multirésistantes aux antibiotiques et productrices de bêtalacatamase et également contre Gram positif *Staphylococcus aureus*.

Le nombre de bactéries productrices de molécules antimicrobiennes isolées des échantillons testés montre que le choix effectué en allant rechercher ce type de bactéries dans ces produits est un choix judicieux. Nos résultats corroborent les travaux antérieurs puisque les produits alimentaires en général, et ceux fermentés de façon artisanale en particulier, constituent une niche écologique de choix pour l'isolement de bactéries lactiques productrices de bactériocines. Cependant, nous pensons que les chercheurs doivent se focaliser dans l'avenir sur la sélection de nouvelles bactéries productrices de bactériocines en explorant de nouveaux sites pouvant assurer une diversité biologique plus grande.

6.1 Facteurs antibactériens produits par les lactobacilles

Lb. pentosus, *Lb. plantarum* 14, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* 01

Selon Tagg et al. (1976), le spectre d'activité des bactériocines des bactéries à Gram positive, bien qu'il puisse être variable suivant les souches, ne concerne jamais les bactéries à Gram négatif ce qui est une caractéristique des bactériocines des bactéries à Gram positive en général, et lactiques en particulier. En outre il a été rapporté que les bactériocines ne sont généralement pas actives contre les bactéries à Gram négatif. Ceci repose sur la différence dans la composition de l'enveloppe cellulaire des bactéries Gram positives et Gram-négatives.

Le spectre d'activité des substances inhibitrices produites par *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum* et *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* englobe également les souches indicatrices Gram positives *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* 07, *Staphylococcus aureus* 09 résistantes aux antibiotiques. En revanche, les 5 genres de bactéries à Gram négatif testées (*Klebsiella*, *En. cloacae*, *E. coli*, *Salmonella* et *P. aeruginosa*) sont aussi affectées par les substances inhibitrices produites par les lactobacilles, ce qui est une caractéristique inhabituelle des bactériocines des bactéries Gram+ en général, et lactiques en particulier. La résistance des bactéries à Gram négatif est attribuée à la nature particulière de leur enveloppe cellulaire, les mécanismes d'action décrits pour les bactériocines faisant intervenir une adsorption de ces molécules aux cellules sensibles. Selon Bhunia *et al.*(1991), la pédiocine AcH (produite par *P. acidilactici* H) interagit avec les acides lipotéchoïques, absents chez les bactéries Gram-. Ces molécules joueraient le rôle de site de réception non spécifique nécessaire pour produire l'effet bactéricide. Kalchayanand *et al.*(1992) attribuent la résistance des bactéries Gram- à la pédiocine AcH à la barrière que représenterait leur membrane externe. L'incapacité des bactériocines à traverser cette barrière est due à leur poids moléculaire et/ou à leurs propriétés hydrophobes (Todorov et Dicks, 2005). Dans le cas où la membrane externe est rendue perméable, soit par un traitement physique (Stevens *et al.*, 1991).

La spécificité de l'action des bactériocines parmi les bactéries Gram+ est fonction des caractéristiques des souches : composition des protéines et des phospholipides membranaires et de la couche de peptidoglycane. Selon Schved *et al.*(1994), la séquence d'acides aminés d'une bactériocine donne lieu à un certain nombre de charges positives avec des positions relatives particulières, ce qui permet la reconnaissance d'un site récepteur par neutralisation des charges négatives se trouvant à la surface membranaire. Le deuxième facteur de spécificité concernerait l'interaction entre la séquence hydrophobe de la bactériocine et les phospholipides de la membrane (Schved *et al.*, 1994).

Les infections à *S. aureus* sont très fréquentes et apparaissent sous des aspects cliniques très variés. Parmi ces infections on a les toxi-infections alimentaires, qui sont dues à l'ingestion d'entérotoxines (A et E), préformées dans l'aliment, résistant aux sucs digestifs et pour certaines à la chaleur, entraînant des troubles d'apparition précoce (moins de 3 heures) avec vomissements, diarrhée, déshydratation et absence de fièvre. L'évolution est bénigne, sauf en cas de pertes hydro-électrolytiques importantes (sujets âgés, nourrissons).

S. aureus peut aussi causée des entérocolites aiguës, qui surviennent au décours d'une antibiothérapie et sont dues à la prolifération de *S. aureus* antibiorésistant et producteur d'entérotoxines (Avril *et al.*, 1992).

Les lactobacilles (*Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* et *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*), possèdent la plus grande activité d'inhibition contre les staphylocoques. L'inhibition des souches *S. aureus* par des lactobacilles a été déjà décrite. Par exemple, Mami *et al.* (2008), ont mentionné que des souches *Lb. plantarum* isolées du lait cru de chèvre inhibent des souches de *S. aureus* (ATCC 25923).

Escherichia coli est connu depuis longtemps comme une bactérie commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire. Au cours des dernières décennies, le rôle de certaines catégories d'*E. coli* dans les syndromes diarrhéiques a été précisé et les mécanismes de ce pouvoir pathogène ont été analysés. L'existence de diarrhées à *E. coli* est connue depuis 1940. Ces diarrhées sont dues à des souches de sérotypes particuliers qui provoquent soit des cas sporadiques, soit des petites épidémies. Ce sont les souches entérohémorragiques (EHEC) et entéro-invasifs (EOEC) qui causent les intoxications alimentaires (Avril *et al.*, 1992).

Dans notre travail, nous avons constaté, une activité inhibitrice nettement remarquable exercée par les souches lactiques *Lb. plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* et *Enterococcus faecalis* à l'égard des souches à Gram négatifs : *E. coli* ATCC25922, *Klebsiella sp*, *En. cloacae* 03, *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Karthikeyan et Santosh (2009), ont décrit des souches de *Lb. plantarum* qui inhibent les souches de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella paratyphi*, *Klebsiella sp*, et *Pseudomonas aeruginosa*. En outre, plusieurs études récentes ont rapportées que les souches de *L. plantarum* produisent une large gamme de bactériocines comme ST28MS, ST26MS, bacST202Ch, bacST216Ch, ST71KS, plantaricine B, D, K, MG, JKZJ008, etc (Dinev *et al.*, 2017). Selon les précédents des études, il est rapporté que *L. plantarum* est actif contre de nombreux agents pathogènes à Gram négatif, des microorganismes d'altération des aliments et divers MDR (Dinev *et al.*, 2017). Zang *et al.* (2016) a signalé que *L. plantarum* ZDY 2013 a significativement inhibé l'adhésion de souches productrices d'entérotoxines et de pathogènes de *B. cereus* cellules épithéliales intentionnelles par inhibition, compétition et déplacement.

Selon Klaenhammer (1988), les bactériocines de bactéries lactique sont actives contre les bactéries étroitement apparentées. Cependant, quelques exceptions à cette règle sont signalées et une activité contre Gram négatif bactéries a été observée. Les exemples sont la plantaricine 35d, produit par *Lactobacillus plantarum* (Messi *et al.*, 2001); la bactériocine ST151BR, produit par *Lactobacillus pentosus* ST151BR (Todorov et Dicks, 2004); une bactériocine produite par *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Caridi, 2002); la thermophyline, produite par *Streptococcus thermophilus* (Ivanova *et al.*, 1998); la bactériocine AS-48, produite par *Enterococcus faecalis* (Abrionel *et al.*, 2001); et une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* KCA2386 (Ko et Ahn, 2000). La nisin, produite par *L. lactis* subsp. *lactis*, est actif contre les bactéries à Gram négatif, mais seulement lorsqu'il est utilisé à des concentrations élevées (Todorov et Dicks, 2005) ou quand les cellules cibles ont été prétraitées avec de l'EDTA (Stevens *et al.*, 1992).

6.2 Facteurs antibactériens produits par *Pediococcus pentosaceus* 01 et 02

Les deux souches de *Pediococcus pentosaceus* 01 et 02 ont donné des diamètres d'inhibition assez importants uniquement avec *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhi*. Les bactéries appartenant au genre *Pediococcus* productrices de bactériocines ne sont pas adaptées à la fabrication des produits laitiers fermentés de par leur manque ou leur lenteur de fermentation du lactose (Papagianni, 2003). En revanche, la souche *Pediococcus acidilactici* productrice de pédiocine PA-1/ AcH s'est révélée être responsable de la bonne conservation de la viande en diminuant les populations de *Li. monocytogenes* et de *Clostridium perfringens* (Rodríguez *et al.*, 2002).

6.3 Facteurs antibactériens produits par *Lactococcus lactis* subsp *lactis* 01 et 02

Les deux souches *Lactococcus lactis* subsp *lactis* 01 et *Lactococcus lactis* subsp *lactis* 02 ont présenté une activité inhibitrice avec un diamètre d'inhibition > 11 mm vis-à-vis de toutes les souches Gram positifs et Gram négatifs testées sauf la souche *Klebsiella pneumoniae* 21. Il a été rapporté que les souches bactériennes du genre *Lactococcus* sont les bactéries productrices de bactériocines les plus utilisées. La souche bactérienne productrice de la nisine, *Lc. lactis*, est souvent utilisée lors de la fermentation de fromages comme le Manchego ou le Camembert en raison de ses propriétés antibactériennes dirigées contre *Li.*

monocytogenes et *Staphylococcus aureus* (Gálvez *et al.*, 2008). Les souches productrices de nisine Z sont aussi utilisées pour limiter les gaz produits lors de la fermentation, qui sont le plus souvent dus à une surcroissance de spores de *Clostridium* et en particulier de *Cl. tyrobutyricum*. La souche productrice de lacticine 3147 est aussi utilisée pour le contrôle de la prolifération de *Li. monocytogenes* dans les aliments tels que les fromages fabriqués à partir du lait écrémé (O'Sullivan *et al.*, 2006).

6.4 Facteurs antibactériens produits par *Enterococcus faecalis* 01 et 02

Les deux souches *E. faecalis* 01, *E. faecalis* 02 sont capables d'inhiber le développement de toutes les souches indicatrices Gram positifs (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 07, *Staphylococcus aureus* 09) et Gram négatifs (*Escherichia coli* ATCC 25922, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi*, *En. cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* 01, *Klebsiella pneumoniae* 01, *Klebsiella pneumoniae* 04, *Klebsiella pneumoniae* 11, *Klebsiella pneumoniae* 20, *Klebsiella pneumoniae* 21, *Klebsiella pneumoniae* 58, *Klebsiella pneumoniae* 59). En effet, des souches bactériocinogènes d'*Enterococcus faecalis* ont été isolées à partir d'une variété d'aliments comme le saumon fumé (Tomé *et al.*, 2009), la viande et les produits carnés (Strompfová et Laukova, 2007), les olives (Franz *et al.*, 1996), du fromage et du lait (Ennahar *et al.*, 2001), du nuka (pâte de son de riz japonais) (Losteinkit *et al.*, 2001) et du chungkuk-jang (produit de soja fermenté) (Yoon *et al.*, 2008).

Le genre *Enterococcus* produit une grande variété de bactériocines, dénommées entérocinines. Ces bactériocines sont des peptides de faible poids moléculaire constitués de 20 à 60 acides aminés cationiques et amphiphiles. Cependant, le spectre d'activité, le mode d'action, la structure, la thermostabilité et le pH d'activité varient d'un type de bactériocine à l'autre (Dortu *et al.*, 2009).

Conclusion générale

La conservation des aliments demeure un problème majeur, dans le secteur bioalimentaire à cause des problèmes d'ordre microbiologique rencontrés. En particulier, les produits laitiers constituent un substrat bactériologique potentiellement dangereux en raison d'un certain nombre de facteurs intrinsèques dont: une activité de l'eau élevée, un pH proche de la neutralité et une quantité importante en protéines.

Ainsi, des pathogènes tels que *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus* sont capables de se développer dans ces produits et peuvent provoquer des infections graves chez le consommateur.

Les moyens de lutte employés contre ces agents pathogènes font le plus souvent appel aux barrières microbiologiques traditionnelles tels 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.

Au court de ce travail, des bactéries lactiques ont été isolées et ont fait l'objet d'études morphologiques, physiologiques et biochimiques afin de les identifier. Sur la base de la coloration de Gram et la catalase, 42 isolats ont été sélectionnés pour le criblage de leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis des souches pathogènes Gram positives et Gram négatifs multiresistantes aux antibiotiques. 10 isolats présentant des aptitudes antimicrobiennes ont été identifiés par la galerie API 50CHL. Il s'agit des espèces ; *Lb. plantarum* (une souche), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (deux souches), *Enterococcus faecalis* (deux souches), *Pediococcus pentosaceus* (trois souches), *Lb. pentosus* (une souche) et *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (une souche).

L'évaluation de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques par la méthode de diffusion en puits a montré que les 10 isolats exercent une activité inhibitrice dirigée contre des souches indicatrices Gram positifs et Gram négatifs testées et que cette activité variée selon la souche teste.

Nous résultats ont montré que la souche *Salmonella typhi* est la plus affectée par les activités antimicrobiennes exercées par les souches sélectionnées, avec des zones de lyse comprises entre 11 et 20 mm.

Parmi les bactéries multi résistantes aux antibiotiques inhibées par les souches de notre collection, *Staphylococcus aureus* qui est à l'origine de toxi-infections alimentaires, cette espèce produit entre autres des toxines thermorésistantes dans les aliments comme les produits laitiers. De plus, des Gram négatifs fréquemment impliquées dans les infections communautaires ou nosocomiales qui se sont montrées résistantes aux antibiotiques par production de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), telles que *E. coli*, *En. cloacea* et *Klebsiella pneumoniae*, sont également inhibées par les activités antimicrobiennes produites par la plus part des souches lactiques de notre collection.

Le nombre de bactéries productrices de bactériocines isolées des échantillons testés montre que le choix effectué en allant rechercher ce type de bactéries dans ces produits est un choix judicieux. Nos résultats corroborent les travaux antérieurs puisque les produits alimentaires en général, et ceux fermentés de façon artisanale en particulier, constituent une niche écologique de choix pour l'isolement de bactéries lactiques productrices de bactériocines.

La recherche de nouvelles bactériocines permettra de combattre plus efficacement les diverses bactéries nuisibles ou pathogènes. La résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques est un phénomène préoccupant, et c'est pourquoi de nouveaux antibiotiques sont constamment recherchés. Cela s'applique aussi aux bactériocines puisque la sélection de bactéries devenues résistantes à ces peptides est possible. La recherche de nouvelles bactériocines trouve aussi raison dans l'acquisition de connaissances fondamentales sur la structure, la biosynthèse, le mécanisme d'action et l'organisation génétique des ces dernières.

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.

Ces observations ouvrent des perspectives futures :

- Il serait intéressant de faire une caractérisation plus poussée et une purification des substances inhibitrices produites par les souches.
- Déterminer les propriétés physico-chimiques des molécules produites (thermo- stabilité, sensibilité aux enzymes protéolytiques, glycolytique et lipolytiques, activité à différents pH, sensibilité aux détergents).

Le développement et l'optimisation d'un protocole de purification par les techniques chromatographiques et l'estimation de leurs poids moléculaire.

Référence Bibliographiques

1. Alix, P. (2015). Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques et modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez *Escherichia coli* ST131. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2015. Français.
2. Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S. *et al.* (2005). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology. vol alimentaires. Tome 2. Tec & Doc.* 1996, 704p.
3. Abrionel, H., Valdivia, E., Galvez, A., Maqueda, M. (2001). Influence of physicochemical factors on the oligomerization and biological activity of bacteriocin AS-48. *Curr Microbiol* ., 42:89–95.
4. Axelsson, L.T. (2004). Lactic Acid bacteria : Classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria – Microbiology and functional aspects. Edited by S. Salminen, A.v. Wright et A. Ouwehand. Marcel Dekker, Inc.* 1-166.
5. Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. *In : Lactic acid bacteria.* Ed. S. Salminen and A. von Wright. Marcel Deccer. p. 1-72.
6. Baliarda, A. (2003). Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* approches physiologiques et génétiques, thèse doctorat en sciences des aliments et nutrition, l'université bordeaux 154 p.
7. Béal, C., Martin, M., Fontaine, E., Fonseca, F., and Obert, J. P. (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. *In Bactéries lactiques, de la géniques aux ferments.* Corrieu G. et Luquet F. M, Ed. Tec et Doc Lavoisier, Paris. 661-785.
8. Belfetni., K et Sedira., N. (2015). Recherche des bactéries lactiques productrices des substances antimicrobiennes vis-à-vis des souches cliniques multirésistance aux antibiotiques. Université de Tébessa.

9. Bendimerad, N. (2013). caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type «Jben. » thèse de doctorat de l'université Aboubaker Belkaid -Tlemcen- 190 pp.
10. Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Kalchayand, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.*, 70 : 25-33.
11. Birsfh, A., Grinsted, E., Chapman, HeR., et Mattick, A.T.R. (1951), A noteon the inhibition of an anaerobics poreformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*. *J. Dais, Res.*,18(2) : 205-207.
12. Brul, S., Coote, P. (1999) Preservative agents in foods : Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50(1-2), 1-17.
13. Burns, A.J., Rowland, I.R. (2004). Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Nutrition and Carcinogenesis.* 551 : 233-243.
14. Carr, F.J., Chill, D., a,d Maida, N. (2002) The lactic Acid Bacteria : *A literature Survey. Critical Reviwes in Microbiology.* 28 (4) : 281-370.
15. Caridi, A. (2002). Selection of *Escherichia coli*-inhibiting strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 29:303–8.
16. Choisy, C., Desmazeaud, M., Gueguen, M., Lenoir, J., Shmidt, J.L et Tourneur, C. (1997). Les phénomènes microbiens. In : Le fromage. Ed. Eck A, Gillis JC, Lavoisier *Tec & Doc, Paris, France.* Pp. 377-466.
17. Cogan, T.M., (1986). The leuconostocs : Milk products. In : Gilliland, S.E. (Ed.), *Bacterial Starter Cultures for Foods, CRC Press, Boca Raton, Florida,* pp. 25-40.
18. Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46 :269-280.

19. Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P.R. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 777-788.
20. Cotter, P.D., Hill, C. (2003). Surviving the acid test : response of Gram-Positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(3), 429-453.
21. Daly, C., Fitzgerald, G.F., O'Connor, L., Davis, R. (1998). Technological and health benefits of dairy starter cultures. *Int. Dairy Journal*. 8 : 195-205.
22. Da Cruz, A. G., Faria, J. A. F., Van Dender, A. G. F. (2007). *Packaging system and probiotic dairy foods*. *Food Res. Int.* 40 : 951-956.
23. Davidson, P.M., Post, L.S., Braner, A.L. et Mc Curdy A.R. (1983). Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In : *Antimicrobials in foods*. eds. *Davidson P.M. and Braner, A.L. Marcel Dekker Inc.*, New York. pp. 385-392.
24. Denis., R. (2001). Production et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* mjc 15. Université Laval. Québec.
25. Desar, I.M.E., De Boer M., Bens C.C.P.M. et al. (2008). Rapid and reliable identification of *Streptococcus anginosus* group isolates to the species level by real-time PCR and melting curve analysis. *Journal of Microbiological Methods*. vol. 75, 372-374.
26. Desmazeaud, M.J., (1983) : L'état des connaissances en matière des nutriments des bactéries lactiques. *Le lait*, 63, pp 267-316.
27. Desmazeaud, M.J., (1992) : Les bactéries lactiques. *INRA station de recherche laitière 78350 Jouy en Joas*.
28. De Vuyst, L. et Vandamme, E.J. (1994) b. Nisin, a Lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. In De Vuyst L. et Vandamme E.J (Eds.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria : microbiology, genetics and application*. London and New York : *Blackie*. pp. 151-221.

29. Dortu, C. (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. *Thèse de Doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique*. Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux.
30. Dortu, C., Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 143-154 p.
31. Dinev, T., Beev, G., Tzanova, M., Denev, S., Dermendzhieva, D., Stoyanova, A. (2017). Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic and food spoilage microorganisms: a review. *Bulg J Vet Med*. <http://dx.doi.org/10.15547/bjvm.1084>.
32. Drouault, S., et Coethier G, (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet. Res.*, 32 :101-117.
33. Ennahar, S., Asou, Y., Zendo, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. (2001). Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *Int. J. Food. Microbiol.* 70: 291-301.
34. Endo, A., Okada, S. (2005). Monitoring the lactic acid bacterial diversity during shochu fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. vol. 99 : 216-221.
35. Eklund, H., Cambillau, C., Sjoberg, B.M., Holmgren, A., Jornvall, H., Hoog, J.O et Branden, C.I. (1984). Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO.J.* 3 : 1443-1449.
36. Franck, G., (2005). Etude d'un système de préfermentation en continu du lait par une culture mixte immobilisée fonctionnelle, *Faculté des études supérieures de l'Université Laval, Québec*.
37. Frank, J., et Hassan, A. N. (1998). Starters cultures and their use. *In Applied Dairy Microbiology*. Marth E. H. et Steele J. L. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 131-172.

38. Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzappel, W.H. (2003). *Enterococci in foods - a conundrum for food safety*. International Journal of Food Microbiology Enterococci in Foods. *Functional and Safety Aspects*. vol. 88,105-122.
39. Franz, C.M.A.P., Van Belkum, M.J., Holzappel, W.H., Abriouel, H., Galvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*. 31: 293-310.
40. Furet, J-P., Quenee, P., Tailliez, P. (2004). Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*. vol. 97, 197-207.
41. Gálvez, A., Lopez, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E., and Omar, N. B. (2008) Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit Rev Biotechnol.*, 28: 125-152.
42. Gahan, C., Hill, C. (1999). The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella* Typhimurium and *L. monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 50(1-2), 93-100.
43. Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Ben Oma, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 120 (1-2): 51-70.
44. Gill, A.O. et Halley, R.A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. *Int. J. Food Microbiol.* 80 :251-259.
45. Gilliland, S.E. (1985). Concentrated starter cultur. In : Bacterial starter cultures of foods, *Ed. Gilliland SE, CRC Press, Inc. Boca Raton USA. Pp : 145-157.*
46. Giraffa, G., (2003). Functionality of enterococci in dary products. *Int. J. Food Microbiol.*, 88:215-222.
47. Grattepanche, F., (2005). Etude d'un système de préfermentation en continu du lait par une culture mixte non immobilisée fonctionnelle, *thèse Ph.D. Université Laval, Québec, PQ, Canada.*

48. Gravesen, A., Diao, Z., Voss, J., Budde, B., Knochel, S. (2004). Differential inactivation of *L. monocytogenes* by D- and L-lactic acid. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 528-532.
49. Guerra, N.P., Bernardez, P.F., Mendez, J., Cachaldora, P., Castro, P.L. (2007). Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology.* vol. 134, 89-107.
50. Guiraud, Joseph-Pierre. (2003). Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyses microbiologiques. *Ed. Dunod, Paris, 651p.*
51. Haddie, J.M. (1995). The genus *Streptococcus*. In *The genera of Lactic acid Bacteria.* Wood B.J.B., Holzapfel W.H. Chapman & Hall, London. 392, 55 - 124.
52. Hamon, Y., et Peron, Y. (1963). Quelques remarques sur les bactériocines produites par les microbes Gram-positifs. *C.R. Acad. Sci. (Paris), 257 :1191-1193.*
53. Helander, I.M., Von Wright, A., Mattila-Sandholm, T.M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and noval antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends. Foods. Sci. Technol.* 8(5) : 146-50.
54. Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., et Schillinguer, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (Suppl) : 365-373.
55. HO Thi, N. (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. Pour obtenir le grade de docteur, *l'université bordeaux l'école doctorale de science de la vie et de la santé.* P 19-22.
56. Houteghem, N.V., Vereecken, K.M., Debevere, J., Devlieghere, F., Impe, J. (2007). Individual and combined effects of pH and lactic acid concentration on *L. innocua* inactivation,: Development of a predictive model and assessment of Experimental Variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(5), 1601-1611.
57. Hugenholtz, J., et al. (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the productoin of nutraceuticals. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82 : 217-235.

58. Huys, G., Vancanneyt, M., D'haene, K., Vankerckhoven, V., Goossens, H., Swings J. (2006). Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Research in Microbiology*. vol. 157, 803-810.
59. Ivanova, I., Miteva, V., Stefanova, T., Pantev, A., Budakov, I., Danova, S, et al. (1998). Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *Int J Food Microbiol.*, 42:147–58.
60. Jacoby, GA., Sutton, L., (1991). Properties of plasmids responsible for production of extended spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 35 : 164-9.
61. Jacob F., Lwoff A., Siminovitch A. et Woolman E. (1953). Définition de quelques termes relatifs il la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 84 : 222-224.
62. Janssen, M., Geeraerd, A.H., Cappuyns, A., Garcia-Gonzalez, L., Schockaert, G., Kobilinsky, A., Nazer, A.I., Dubois-Brissonnet, F. (2007). Modeling the inhibition of *Salmonella* Typhimurium growth by combination of food antimicrobials. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 95-109.
63. Ko, S-H., Ahn, C. (2000). Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA2386 isolated from white kimachi. *Food Sci Biotechnol.*, 9:263–9.
64. Jay, M.J., (1992). Modern Microbiology, Van Nostrand Reinhold, 4th ed., *New York*. 371-409.
65. Juillard, V., et Richard J. (1994). Mixed cultures in milk of a proteinase-positive and a proteinase-negative variand of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* : Influence of initial percentage of proteinase-positive cells on the growth parameters of each strain and on the rate of acidification . *Lait*. 74 : 3-12.
66. Juillard, V., Furlan S., Foucaud C. et Richard J. (1996). Mixed cultures in milk of a proteinase-positive and a proteinase-negative strains of *Lactococcus lactis* in milk. *J. Dairy Sci.* 79 : 964-970.

67. Juillard, V., et Richard, J., (1990). Indirect interaction in milk between proteolytic and isogenic non proteolytic strains of *Lactococcus lactis*. I. Effect of pre-culturing by a non-proteolytic variant. *Lait*. 70 : 425-438.
68. Juillard, V., et Richard J. (1991). Indirect interaction in milk between proteolytic and isogenic non proteolytic strains of *Lactococcus lactis*. II. Effect of pre-culturing by a non-proteolytic strain. *Lait*. 71 : 55-64.
69. Kalchayand, N., Hanlin, M.B., RAY, B. (1992). Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Let. Appl. Microbiol.*,15 : 239-243.
70. Kandler, O., and Weiss, N. (1986) : Regular, non-sporing Gram-positive rods : Bergey's Manue of Systematic Bacteriology. *P.H.A Sneath, N. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt. Williams and Wilkin, Baltimore*. 2 : 1208-1234.
71. Karthikeyan, V., et Santosh, S.W. (2009). Isolation and partial characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. *Afr J Microbiol Res*. Vol. 3 (5), pp. 233-239.
72. Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Logan Buck, B., Azcarate-Peril, M.A. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev*. 29, 393-409.
73. Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev*. 12(1-3), 39-85.
74. Klaenhammer, T.R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337-349.
75. Klein, G., Pack A., Bonaparte, C., et Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol*. 41 : 103-125.
76. Kong, S., et Davison, A.J. (1980). The role of interactions between O₂, H₂, OH⁻ and O₂ in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys*. 204 : 13-29.

77. Koort, J., Coenye, T., Santos E.M. *et al.* (2006). Diversity of *Weissella viridescens* strains associated with "Morcilla de Burgos". *International Journal of Food Microbiology*. vol. 109, 164-168.
78. Koort, J., Vandamme, U., Schillinger, U., Holzappel, W.H., et Bjorkroth, J. (2004). *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* is a later synonym of *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 : 1621-1626.
79. Law. J., et Kolstard, A., (1997). Preteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. *Apply. Sci.* 1 : 365-365.
80. Lasagno, M., Beoletto, V., Sesma, F., Raya, R., Font De Valdez, G., Eraso, A. (2002). Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment. *Microbiologia.*, 25: 37- 44.
81. Leisner, J.J., Vancanneyt, M., Goris, G., Christensen, Het Rusul, G. (2000). Discription of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp.nov., a new lactic acid bacterium isolated from chilli bo. *a Malisian food ingredient*. *Int. J. Sys Evol. Microbiol.* 50 : 19-24.
82. Lindgren, S.E., et Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87 : 149-164.
83. Liu, S., (2003) Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 83(2), 115-131.
84. Mami, A., Henni, J.E. et Kihal, M. (2008). Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*. *World J. Dairy and Food Sci.*, 3 (2): 39-49.
85. Martin., L. (2000). Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* mjc15. Université Laval. Québec.
86. Marteau, P., Seksik, P. (2004). Place des probiotiques dans la prevention et le traitement des diarrhees postantibiotiques. *Revue Francaise des Laboratoires.* 73-76.

87. Masuda, S., Yamaguchi, H., Kurokawa, T., Shirakami, T., Tsuji, R.F., Nishimura, I. (2008). Immunomodulatory effect of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from soy sauce moromi grown in high-salt medium. *International Journal of Food Microbiology*. vol. 121, 245-252.
88. Mechai, A. (2009). Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones : études physiologiques et biochimiques. Thèse de Doctorat de l'université de Badji Mokhtar –Annaba. 151 pp.
89. Mechai, A., Debabza, M., et Kirane, D. (2014). Screening of Technological and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Traditional Fermented Milk Products. *International Food Research Journal*, 21(6): 2451-2457.
90. Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, Rod., Manicardi, G. (2001). Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *Int J Food Microbiol.*, 64:193–8.
91. Moreno, M.R.F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. vol. 106, 1-24.
92. Mora, D., Scarpellini, M., Franzitti, L., Colombo, S., et Galli, A. (2003). Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al., 1973) DMS 20342 (T) and DMS 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al., 1987) DSM 20730 (T) and DSM 20722 *carnobacterium maltoromanicum comb. Nov. Int. J. S vst. Evol. Microbiol.* 53 : 675-678.
93. O'Sullivan, L., O'Connor, E. B., Ross, R. P., and Hill, C. (2006). Evaluation of live-culture reproducing lacticin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *J Appl Microbiol.*, 100: 135-143.
94. Oxford, A.E. (1944), Diplococcin, an anti-microbid protein elaborated by certain milk streptococci. *Biochem. J.*, 38 :178-182.
95. Pagès, JM. (2004). Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *Médecine/Sciences*. 20(3) : 346-351.

96. Papagiannin, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties : biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv.*, 21(6) : 465-499.
97. Paterson, DL., Bonomo, RA. (2005). Extended-spectrum beta lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev.*, 18: 657-86.
98. Peirson, M.D., Guan, T.Y., Holley, R.A. (2003). Aerococci and carnobacteria cause discoloration in cooked cured bologna. *Food Microbiology*. 2003, 149 - 158.
99. Piraino, P., Ricciardi, A., Salzano, G., Zotta, T., Parente, E. (2006). Use of unsupervised and supervised artificial neural networks for the identification of lactic acid bacteria on the basis of SDS-PAGE patterns of whole cell proteins. *Journal of Microbiological Methods*. vol. 66, 336- 346.
100. Rantsiou, K., Comi, G., Cocolin, L. (2004). The rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics during food fermentations. *Food Microbiology*. 2004, vol. 21, 481-487.
101. Reddy, Y., Aranha, K.V., Gupta, C.S.M., et Yedery, R.D. (2004). Evaluation of Antimicrobial Peptide Nisin as a Safe Vaginal Contraceptive Agent in Rabbits: In Vitro and in Vivo Studies. *Reproduction.*, 128: 117-126.
102. Rodriguez, J.M., Martínez, M.I., et Kok, J. (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 42: 91-121.
103. Rossetti, L., Giraffa, G. (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*. vol. 63, 135-144.
104. Ruiz-Moyano, S., Martin, A., Benito, M.J., Nevado, F.P., Cordoba, M.G. (2008). Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*. 2008, In Press, Corrected Proof.
105. Sabia, C., De Niederhäusern, S., Messi, P., Manicardi, G., Bondi, M. Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria*

- monocytogenes* in Italian sausages ("cacciatore"). *International Journal of Food Microbiology*. 2003, vol. 87, 173-179.
106. Sabia, C., Manicardi, G., Messi, P., De Niederhäusern, S., Bondi, M. (2002). Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. *International Journal of Food Microbiology*. vol. 75, 163-170.
107. Schved, F., Lindner, P., Juven, B.J. (1994). Interaction of bacteriocin pediocin SJ-1 with the cytoplasmic membrane of sensitive bacterial cells as detected by ANS fluorescence. *J. Appl. Bacteriol.*, 76: 30-35.
108. Schleifer, K.H. (1987). Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 46, 201-203.
109. Scharek, L., Guth, J., Reiter, K. *et al.* (2005). Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. vol. 105, 151-161.
110. Shewmarker, P.L., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Carvalho, MdGS., Elliott, A.J., Joyce, K., Barrett, T.J., Teixeira, L.M., et Facklam, R.R. (2004). *Vagococcus carniphilus* sp. Nov., isolated from ground beef. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 : 1505-1510.
111. Simpson, W.J., et Taguchi, H. (1995). The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. In *the Genera of lactic acid bacteria; Wood BJB., Holzabef HW, Eds; Chapman & Hall, London, 125-172.*
112. Strompfová, V., Laukova, A. (2007). In vitro study on bacteriocin production of enterococci associated with chickens. *Anaerobe*. 13 : 228-237.
113. Stevens, KA., Klapes, NA., Sheldon, BW., Klaenhammer, TR. (1992). Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides mutants. *Appl Environ Microbiol.*, 58 : 1786-8.

114. 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 : 3613-3615.
115. Stropfova, V., Laukova, A. (2007). In vitro study on bacteriocin production of *Enterococci* associated with chickens. *Anaerobe*. vol. 13, 228-237.
116. Stropfova, V., Marcinakova, M., Simonova, M. et al. (2006). *Enterococcus faecium* EK13--an enterocin Aproducing strain with probiotic character and its effect in piglets. *Anaerobe*. vol. 12 : 242-248.
117. Sullivan, A., and Nord, C. E. (2005) : Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal of Internal Medicine*, 257, 78-92.
118. Tagg, J.R., hjana, AmS., et WannPniriker, L.W. (1976). Bacteriocins of É~ram-
psitive bactena *Bacteriological Reviews*, 40(3) : 722-756.
119. Teuber, M. (1995). The genus *Lactococcus*. In *The genera of lactic acid bacteria*. Wood B.J.B., Holzapfel W.H. Chapman & Hall. 420 : 173 – 234.
120. Teixeira, L.M., Carvalho, M.G.S., Facklam, R.R. (1999). *Vagococcus*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*. Robinson R.K. Oxford, Elsevier. 2215-2220.
121. Thonart, P. (2011). Action des cultures protectrices : cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable, *Biotechnol, Agron, Soc. Environ.* 15(2) : 339-348.
122. Thapa, N., Pal *et al.* (2005). Phenotypic identification ans thechnological propreties of lactic acid bacteria isolated frome traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *Int. J. of Food Microbiol.* 107 : 33-38.
123. Todorov, SD., Dicks, LMT. (2004). Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. *World J Microbiol Biotechnol.*, 20 : 643–50.

124. Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A. *et al.* (2000). Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primer. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 66 : 297–303.
125. Yoon, M.Y., Kim, Y.J., Hwang, H.-J. (2008). Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product. *LWT.*, 41 : 925-933.
126. Zacharof, M.P., et Lovittb, R.W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *Review Article APCBEE Procedia.*, 2 : 50-56.
127. Zhang, Z., Tao, X., Shah, NP., Wei, H. (2016). Antagonistics against pathogenic *Bacillus cereus* in milk fermentation by *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its antiadhesion effect on Caco-2 cells against pathogens. *J Dairy Sci.*, 99 : 2666e74.

Annexes

Milieux de cultures :

1-Milieu MRS : (de Man, Rogosa & Sharpe, 1960)

Composition

Préparation

Dissoudre les composants dans de l'eau bouillante, laisser refroidir à 50°C ± 1°C, ajuster le pH, à l'aide des réactifs en utilisant un pHmètre, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6.2 à 25°C. Répartir dans des flacons de 250 ml et stériliser à 121°C ± 1°C pendant 15 mn (Leveau *et al.*, 1991) :

2. Milieu M17 : (Terzaghi & Sandine, 1975) :

Composition du milieu de base :

- Sulfate de magnésium héptahydraté (MgSO₄, 7H₂O) 0.25g
- Acide ascorbique 0.5 g
- Agar-agar 9 à 18 g
- Eau distillée q.s.p 950ml

Préparation :

Dissoudre les composants dans 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 7.1 à 25°C ± 1°C.

Répartir à raison de 95 ml par fiole de 125 ml et stériliser à 120°C pendant 20 mn.

3. GN : gélose nutritive

- Peptone 10g
- Extrait de viande 5g
- Chlorure de sodium 5g
- Gélose 12g
- Gélose 12g
- Eau distillé q.s.p. 1000 ml

pH 5,5. Stérilisation à 105°C pdt 20min.

4. Bouillon MRS (BIOKAR, France)

- Polypeptone 10,00 g/l
- Extrait de viande 10,00 g/l
- Extrait autolytique de levure 5,00 g/l
- Glucose 20,00 g/l
- Tween 80 1,08 g/l
- Phosphate dipotassique 2,00 g/l
- Acétate de sodium 5,00 g/l
- Citrate d'ammonium 2,00 g/l
- Sulfate de magnésium 0,20 g/l
- Sulfate de manganèse 0,05 g/l

pH du milieu : 5,7 ± 0,1

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

5. Muller Hinton (Muller Hinton, 1941)

Pour 1 litre de milieu :

- Hydrolysate acide de caséine 17,5g
- Infusion de viande 2,0g
- Amidon soluble 1,5g
- Agar –agar bactériologique 17g

PH=7,3 ± 0,2. Stérilisation à 105°C pdt 20min.

Eau physiologique : pour les dilutions :

- Chlorure de sodium 8,5g
- Peptone 0,5g
- Eau distillée q.s.p 1000ml

PH=7 Autoclavage :120⁰C pendant 20 minute

Tableau 09 : L'antibiogramme de souches pathogènes

Souche pathogène ATB	<i>Staphylococcus aureus</i> 07	<i>Staphylococcus aureus</i> 09
Kanamycine (k)	30mm S	20mm S
Céfoxitine (Fox)	15mm R	22mm S
Pénicilline (p)	/ R	/ R
Gentamycine (Gen)	36mm S	28mm S
Tobramycine (Tob)	31mm S	15mm R
Erythromycine (E)	8mm R	/ R
Clindamycine (DA)	13mm R	/ R
Fosfomycine (FO)	32mm S	12mm R
Acide furique(FA)	15mm R	20mm R
Rifampicine (RA)	/ R	36mm S
Cloranphénicol (C)	10mm R	26mm S
Tétracycline (TE)	30mm S	31mm S
Oflaxacine(OF)	30mm S	30mm S
Triméthoprime+sulfaméthoxazole (SXT)	27mm S	12mm R
Ciprofloxacine (CIP)	34mm S	35mm S

S : sensible **R** : résista



Université Larbi Tébessi - Tébessa



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie.

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : *BENARFA Takieddine*

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : *Biologie Appliquée*

N° de carte d'étudiant : *40.15.600.1.2018*

Année universitaire : *2017 / 2018*

Domaine : *Sciences de la nature et de la vie*

Filière : *Sciences biologiques*

Spécialité : *Microbiologie appliquée*

Intitulé du mémoire : *Inhibition des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques par des bactéries lactiques autochtones isolées de produits laitiers*

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le *16/05/2018*

Signature de l'étudiant(e) :



Université Larbi Tébessi - Tébessa

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessi - Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : Zouari Souad

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : des sciences de la nature et de la vie

N° de carte d'étudiant : 34.01.5850

Année universitaire : 2017-2018

Domaine : des sciences de la nature et de la vie

Filière : sciences biologique

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé du mémoire : Inhibition des Bactéries multiresistantes aux antibiotiques par des Bactéries lactiques autochtones isolées de produits laitiers

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

2018 جوان 04



Fait à Tébessa, le : 04.06.2018

Signature de l'étudiant(e) :

