



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ ABBAS LAGHROUR KHENCHELA

INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE LA BIOLOGIE

## Mémoire

Présenté pour l'obtention de diplôme de master microbiologie

Option : microbiologie et biologie moléculaire

### Thème

---

**Sélection des Bactéries Lactiques Productrices Des  
Bactériocines Isole a Partir d'un Produit  
Traditionnellement Fermente (Jben) de la Région  
de Khenchela.**

---

**Devant le jury :**

**Président : Mr. Derbouche Abd Elhak**

**Examineur : M<sup>elle</sup> Labani**

**Promoteur : Mr. Thabet Rachid**

**Présenté par :**

Nouna Sabah

Saidane Nassima

2011/2012

## Liste des figures

Numéros de figure	Titre de figure	Reference
01	Arbre phylogénétique des bactéries lactiques	Axelsson, 1998
02	Les principaux effets bénéfiques attribuées aux probiotiques	Mercenier et al, 2002

## Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	Référence du tableau
01	Les testes phénotypique Les plus pertinents pour identifier les bactéries lactiques au niveau du genre	Schaw et harding, 1984, holzapfel et schillinger, 1992, wood et holzapfel, 1995, axelsson, 1998, leisner etal, 2000
02	Quelque bactériocines de la classe I produites par les bactéries lactiques	Par dany morsset, jean-marc berjeaud, jacques frere et yann hechard, beteriocines des bacteries lactiques in bacteries lactiques et probiotiques par francois-marie luquel, george corrieu, edition tec & doc-lavoisier 2005115 ; 116
03	Bactériocines de la classe II produites par les bactéries lactiques	Par dany morsset, jean-marc berjeaud, jacques frere et yann hechard, beteriocines des bacteries lactiques in bacteries lactiques et probiotiques par francois-marie luquel, george corrieu, edition tec & doc-lavoisier 2005
04	Bactériocines de la classe III produites par les bactéries lactiques	Par dany morsset, jean-marc berjeaud, jacques frere et yann hechard, in beteriocines des bacteries lactiques p 120 bacteries lactiques et probiotiques par francois-marie luquel, george corrieu, edition tec & doc-lavoisier 2005
05	Mode d'action des bacteriocines de classe I	Par dany morsset, jean-marc berjeaud, jacques frere et yann hechard, beteriocines des bacteries lactiques p 145, bacteries lactiques et probiotiques par francois-marie

		luquel, george corrieu, edition tec & doc-lavoisier 2005
06	Mode d'action des bacteriocines de classe II	Par dany morsset, jean-marc berjeaud, jacques frere et yann hechard, bacteriocines des bacteries lactiques p 155 bacteries lactiques et probiotiques par francois-marie luquel, george corrieu, edition tec & doc-lavoisier 2005
07	Mode d'action des bacteriocines de classeIII	Par dany morsset, jean-marc berjeaud, jacques frere et yann hechard, bacteriocines des bacteries lactiques p 161 bacteries lactiques et probiotiques par francois-marie luquel, george corrieu, edition tec & doc-lavoisier 2005

## Liste d'abréviations

ADH : Arginine dihydrolase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Acide triphosphoique

CO<sub>2</sub> : désoxyde de carbone

G+C : Guanine+cytosine

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène

kDa :Kilo dalton

Kpb : Kilo paire de base

LA : Lactobacilli Agar

Lb : Lacobacillus

Lc : Lactococcus

Mdal : Mégadalton

Na Cl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

# Sommaire

## Introduction générale

## Partie bibliographique

### Chapitre I : les bactéries lactiques

1/Définition.....	03
2/Caractéristiques.....	03
3/Habitat.....	03
4/Taxonomie.....	04
5/Classification des Genres.....	07
6/ l'aspect génétique des bactéries lactiques.....	10
6-1/structure de la matérielle génétique.....	10
6-1-1-chromosome des bactéries lactiques.....	10
1-lactobacillus delbruku subsp bulgaricus.....	10
2-lactococcus lactis subsp lactis il 1403.....	11
3-lenconostoc mesenteroi des atcc 8293.....	11
4-pediococcus pentosaceus atcc 25745.....	11
6-1-2-plasmide des bacteries lactiques.....	11
6-2-principales fonctions codées par les plasmides.....	12
6-2-1-métabolisme du lactose ou du galactose.....	12
6-2-2-métabolisme des protéines.....	13
6-2-3-métabolisme des citrates.....	13
6-2-4-production des facteurs antimicrobiens.....	13
6-2-5-autre caractères porte par des plasmides.....	14
7-différents application des bactéries lactique.....	14
7-1-les probiotiques.....	14
7-2-différentes utilisations des bactéries lactiques en alimentation.....	16
7-3-la biopreservation des aliments.....	17
8-intérêts biotechnologique des bactéries lactiques.....	17
<b>Chapitre II : les bactériocines</b>	
1/bref historique et définition.....	20
2/nomenclature et classification.....	20
2-1-classe I-lantibiotique.....	21
2-2-classe II-peptide nom modifies.....	22

2-3-classe III-protéine.....	24
2-4-classe VI.....	25
3-la biosynthèse des bactériocines.....	25
4-mode d'action des bactériocines.....	26
4-1-bactériocine de la classe I.....	26
4-2-bactériocine de la classe II.....	28
4-3-bactériocine de la classe III.....	30
5-application industrielle des bactériocines des bactéries lactiques.....	31
5-1-protection alimentaire.....	31
5-1-1-additif alimentaire.....	32
5-2-hygiène et sante.....	33
<b>Partie pratique</b>	
<b>Matérielles et méthodes utilisées</b>	
1-matériels.....	34
1-1-verrerie.....	34
1-2-outils.....	34
1-3-appareillage.....	34
1-4-le jben.....	35
2-méthodes.....	36
2-1-méthodes d'isolement, de purification et de conservation des souches.....	36
2-1-1-isolement.....	36
2-1-2-purification.....	36
2-1-3-conservation.....	37
2-2-méthode d'identification.....	37
2-2-1-les tests communs.....	38
2-2-1-1-coloration de gram.....	38
2-2-1-2-catalase.....	39
2-2-1-3-cytochrome-oxydase.....	39
2-2-1-4-mobilité en tube.....	39
2-2-2-les tests spécifiques.....	40
2-2-2-1-production de CO <sub>2</sub> à partir du glucose.....	40
2-2-2-2-température de croissance.....	40
2-2-2-3-test de croissance en milieu hostiles.....	40
2-2-2-4-recherche de la citratase.....	41

2-2-2-5-l' épreuve de l'argininedihydrolase(ADH).....	41
2-2-2-6-fermentation des hydrates de carbone.....	41
2-3-méthode de détection de l'activité antagoniste des isolats.....	42
2-3-1-méthode de double couche.....	42
2-3-2-méthode de diffusion en puits.....	42
2-4-mesure de l'activité antibactérienne de l'extrait de culture.....	43
2-5-identification de la substance antibactérienne produite.....	43
<b>Résultats et discussion</b>	
1-isolement et identification des souches lactiques.....	44
1-1-examen macroscopique.....	44
1-2-examen microscopique.....	44
1-3-identification des souches.....	44
1-3-1-espèces du genre lactobacillus.....	45
1-3-2-espèces du genre lactococcus.....	49
1.4. Sélection de souches bactériennes productrices d'un facteur antimicrobien autre que les acides organique ou le peroxyde d'hydrogène .....	51
1.6. Identification des substances antibactériennes comme étant des bactériocines :.....	53
2. Facteurs antibactériens produits par les lactobacilles : .....	55
2.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> ST <sub>2</sub> :.....	55
2.1.1. Sensibilité aux enzymes :.....	55
2.1.2. Spectre d'activité : .....	55
2.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> TH <sub>1</sub> :.....	58
2.2.1. Sensibilité aux enzymes :.....	58
2.2.2. Spectre d'activité .....	58
3. Facteurs inhibiteurs produits par les lactocoques :.....	58
3.1. <i>Lactococcus lactis</i> LCL <sub>2</sub> :.....	59
3.1.1. Sensibilité aux enzymes :.....	59
3.1.2. Spectre d'activité :.....	59
Conclusion générale	
Référence Bibliographie	
Annexe	

## **Introduction générale :**

Depuis toujours, les bactéries sont présentes dans notre alimentation. Certaines d'entre elles dont les bactéries lactiques, sont utiles, d'autres, comme les bactéries pathogènes ne le sont pas. Ces derniers sont très nombreuses; en effet, la plupart des salmonelles (plus de 2100 espèces différentes), des *Clostridium*, des *Listeria* ainsi que bien d'autres ont été identifiées comme étant des agents pathogènes présents dans notre alimentation (Francis et *al.*, 1999). Elles posent beaucoup de problèmes car en plus de causer diverses maladies, elles peuvent altérer et dégrader la nourriture (Sillet' et Fonythe, 1996; Cintas et *aL.*, 1998). La préservation de l'innocuité alimentaire constitue donc un combat constant contre ces micro-organismes.

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis plusieurs siècles comme agent protecteur dans les aliments fermentés. Ces bactéries sont présentes dans une grande variété d'aliments, tels les yaourts, les saucisses fermentées et les fromages. Ainsi, différentes souches d'intérêt commerciale ou scientifique y sont couramment isolées (Rodriguez et *al.*, 1995; Cardinal et *al.*, 1997). Les bactéries lactiques, comme les lactuloses et les lactobacilles, sont utilisées pour leurs différentes propriétés, surtout celle de pouvoir fermenter le lactose. Cette propriété permet d'améliorer les qualités organoleptiques d'un aliment grâce aux différents composés de la fermentation (diacétyl, divers acides organiques, etc.). La fermentation permet également d'augmenter la durée de vie des aliments (Daeschel et *al.*, 1987). En effet, l'acidification des aliments par la production d'acide lactique permet d'inhiber la croissance de la plupart des bactéries indésirables. Certaines bactéries lactiques sont par ailleurs susceptibles si les conditions de développement sont favorables de synthétiser des bactériocines. Ces derniers sont des peptides synthétisés par les ribosomes et elles possèdent une activité bactéricide ou bactériostatique envers d'autres micro-organismes.

(Klaenhammer, 1993). Ceci permet à la bactérie productrice de pouvoir éliminer certains compétiteurs potentiels présents dans son environnement. Certaines bactériocines ne sont pas uniquement efficaces envers des bactéries phylogéniquement semblables (Tagg et *al.*, 1976).

Elles peuvent avoir un spectre d'activité étendu et sont en mesure d'affecter une grande variété de bactéries sans pour autant se limiter à celles qui lui sont semblables (Banks et *al.*, 1986; Stevens et *al.*, 1991; Klaenhammer, 1993).

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

Le but de cette étude a donc été sélectionné des bactéries lactiques productrices des bactériocines isolé a partir d'un produit traditionnellement fermenté (JBEN) de la région de Khenchela.

### 1. Définition:

Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (requièrent des molécules organiques complexes comme source énergétique) (Deroissart, 1986).

### 2. Caractéristiques:

Les bactéries lactique sont un groupe de bacilles ou coques gram positif, qui ont moins de 55% de contenu G+C dans leurs ADN à l'exception des bifidobacterium .elles sont asporuleés, habituellement non mobiles, anaérobies mais aérotoleurants elles ont des exigences nutritionnelles complexe en ce qui concerne des hydrates de carbone les vitamines, les acides aminés, les peptides et les acides gras.

En autre, elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase en plus de cela ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux, n'ont pas de cytochrome-oxydase.

Il est possible de les classer suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides. En effet les bactéries homolactiques strictes produisent uniquement de l'acide lactique, alors que les bactéries hétérolactiques peuvent produire de l'acide acétique, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> en plus de l'acide lactique.

Les bactéries lactiques sont utilisées pour la fermentation d'un grand nombre de produits d'origine animale ou végétale. Seuls les cinq genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* *Pediococcus* et *Streptococcus* sont communément propagés dans les salles à ferments des industries laitières (Champagne, 1998). Le rôle principal des bactéries lactiques est la production d'acide lactique qui influence la texture, le goût et la qualité microbiologique des produits fermentés. En effet, la production d'acide facilite la coagulation des protéines par la présure ainsi que la synérèse. L'abaissement du pH limite aussi la croissance des bactéries indésirables (Gilliland, 1985a).

### 3. Habitat :

Les bactéries lactiques sont des microorganismes très exigeants de point de vue nutritionnel. C'est la raison pour laquelle on les trouve associées à des environnements particulièrement riches. Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques.

Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou

Animale mai également retrouvées dans le sol, les engrais, et les eaux d'égout

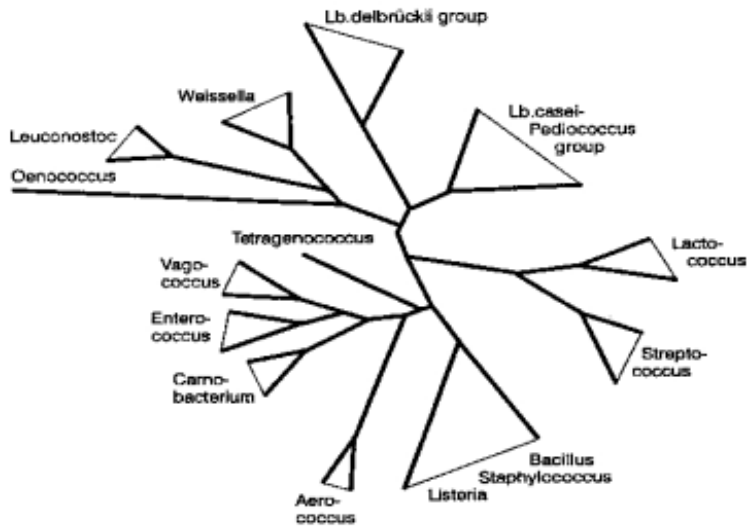
((Larpent, 1991)

### 4. Taxonomie e classification

Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries unies par une constellation de caractéristiques morphologiques, métaboliques, et physiologiques Le tableau (1) présente les principaux tests utilisés pour identifier les bactéries lactiques au niveau du genre.

Elles appartiennent à la lignée des Firmicutes, à la classe des Bacilli, et à l'ordre des Lactobacillales (Garrity et holt, 2001). Phylogénétiquement, elles appartiennent au phylum des Clostridium des bactéries gram-positif (G+C < 50 mol%). Traditionnellement le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu G+C > 50 mol% et affecté au phylum des *Actinomyces*. Néanmoins, les bifidobactéries sont également considérées comme des bactéries lactiques, en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables et du fait qu'elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques tel que le tractus gastro-intestinal (Klein et *al* ;1998). En outre, bien qu'il y ait des applications de certaines souches du genre *Sporolactobacillus*, en l'occurrence *S. cellulosolvans* ou *S. inulinus*, dans la fermentation conduisant à la production d'acide lactique (Kanwar et *al* ; 1995; Abelyan et Abelyan, 1997), les sporolactobacilles ne sont pas des bactéries lactiques.

Selon Stiles et Hozaptel (1997) et Axelsson (1998), les bactéries lactiques englobent les genres suivants: *Aerococcus*, *alloeococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* et à grande échelle Lactobacilles, qui ont une certaine importance dans les aliments (Vandamme et al ; 1996). Récemment 15 nouveaux genres lactiques ont été décrits (*Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Ignavigranum*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Desemzia*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Marinilactibacillus*, *Trichococcus*, *Atopobacter*, *Paralactobacillus*, *Oscillospira*. 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).



**Figure 01** : arbre phylogénétique des bactéries lactiques (d'après Axelsson, 1998). Les distances évolutives sont calculées par comparaison des séquences des ADN16S. La distance évolutive

## Partie bibliographique : bactéries lactiques

**Tableau 1:** Les tests phénotypiques les plus pertinents pour identifier les bactéries lactiques au niveau du genre

	<i>Lactobacillus</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Weissella</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Paralactobacillus</i>
Morphologie	Bacilles	Bacilles	Coques ovales	Coques/bacilles	Coques	Coques	Coques	Coques	Bacilles
Gaz à partir de glucose	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-
Croissance à									
10°C	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	-	-
45°C	+/-	-	-	+/-	+	-	+/-	+	-
Isomère d'acide lactique	D, L, DL	L	D	DL, D	L	L	L, DL	L	DL
Hydrolyse d'arginine	+/-	+	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-
<i>m</i> DAP	+/-	+	-	-	-	-	-	-	ND <sup>b</sup>
Croissance sur gélose Rogosa SL	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Dérivé à partir de Shaw et Harding, 1984; Holzapfel et Schillinger, 1992; Wood et Holzapfel, 1995; Axelsson, 1998; Leisner et *al.*, 2000.

<sup>b</sup>ND, non déterminé.

### 4.1. Classification des genres

La classification la plus récente des bactéries lactiques suggère la subdivision de groupe lactique en plusieurs genres :

#### ▶ Le genre *Streptococcus*:

Ce genre comprend la majorité des espèces et en particulier :

- Le groupe pyogènes : comprend 5 espèces  $\alpha$  et/ou  $\beta$  hémolytique, pathogènes pour l'homme et/ou les animaux.
- Le groupe oralis comprend : *Sc. viridans*, *Sc. mitior*, *Sc. intermedius*, *Sc. pneumoniae* souvent  $\alpha$  hémolytiques pathogènes opportunistes.
- Le groupe des autres streptocoques et en particulier *Sc. salivarius* subsp. *salivarius* qui est étroitement apparenté à *Sc. thermophilus*. C'est la raison pour laquelle Farrow & Collins, (1984) et Axelsson, (1992) proposent de considérer *Sc. thermophilus* comme sous espèce de *Sc. salivarius*. Cette proposition était renforcée par les résultats d'étude de l'hybridation ADN / ADN (Axelsson, 1992).

#### ▶ Le genre: *Lactococcus* :

Le groupe des Lactocoques correspond aux streptocoques mésophiles de la flore lactique. En dehors des cinq espèces actuellement reconnues (Larpen, 1991 ; Teuber, 1992) seule l'espèce *Lactococcus lactis* est utilisée en industrie laitière.

Trois sous espèces peuvent être distinguées : *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* ( Farrow, 1982 ) . Seules les deux premières *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* sont importantes dans l'industrie laitière (Axelsson , 1992).

La capacité des lactocoques à croître à une température de 10°C et pas à 45°C est une caractéristique qui les distingue des autres *Enterococcus* des *Streptococcus*. La plupart des lactocoques réagissent avec les anti-sérums du groupe N (Desmazeaud, 1992).

#### ▶ Le genre *Pediococcus* :

Renferme des espèces dont les cellules sont sphériques et de diamètre compris entre 1 $\mu$ m – 2  $\mu$ m. 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 , 1986 ; Holt *et al.* , 1994 ) .

La 9<sup>ème</sup> édition du *Bergey's manual of determinative Bacteriology* définit 8 espèces appartenant au genre *Pediococcus* (Holt *et al.*, 1994). Toutefois l'espèce *Pc.cerevisiae* qui a été mentionnée dans l'ancienne classification de 1974, est actuellement équivalente à *Pc.damnosus* reconnue comme espèce type (Larpent, 1991).

L'étude de la composition en bases de l'ADN, montre que les pedicoques 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 (Larpent, 1991).

### ▶ Le genre *Leuconostoc* :

Il regroupe des bactéries sphériques et souvent lenticulaires, ce qui rend difficile leur distinction des lactobacilles hétérofermentaires (Leveau *et al* ; 1980 ; Axelsson , 1992) .

Les cellules font 0,5–0,7x 0,7–1,2 µm, le plus souvent par groupe de deux et rarement en chaîne, ce qui les différencie des lactocoques et des Streptocoques (Deroissart, 1986).

La dernière classification de *Bergey* (Holt *et al* ; 1994) fait apparaître 9 espèces du genre *Leuconostoc* .

### ▶ Le genre *Lactobacillus* :

Les lactobacilles sont des bactéries Gram<sup>+</sup>, polymorphes asporogènes , non pigmentées , immobiles (sauf *Lb. agilis*), catalase - ,nitrate- ,gélatine- ,leur morphologie va de cocci plus ou moins allongés à des formes longues, ce qui les rend parfois difficile à les distinguer des *Leuconostoc*. Leur GC% varie de 32 à 53% (Cowan *et al* ; 1984 ; Larpent , 1990 ; Axelsson , 1992) .

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's manuel* (Kandler & Weiss, 1986). Cette même classification à été reprise, mais sous une forme numérotée et les 44 espèces de *Lactobacillus* sont réparties en trois groupes comme suit :

### - le groupe I (ex sous genre *Thermobacterium*) homofermentaire strict :

Ce groupe comprend 18 espèces, dont nous distinguons deux complexes d'espèces (Leveau *et al.*, 1991 ; Larpent , 1991) :

1. Le premier complexe regroupe principalement, *Lb. delbrueckii* avec ses trois sous espèces, *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*.
2. Le second complexe est très hétérogène, on y trouve notamment *Lb. acidophilus* , *Lb.gasseri* , *Lb. crispatus* et *Lb. helveticus*.

### - Le groupe II (ex sous genre *Streptobacterium*) :

Hétérofermentaire facultatif, ce genre comprend les espèces mésophiles, incapables de se cultiver à une température de 45°C et donnant une homofermentation du glucose et une hétérofermentation des pentoses et du gluconate. Ce groupe est formé de deux sous-groupes d'espèces (Axelsson, 1992) :

Le premier correspond à *Lb. plantarum*.

Le deuxième est composé de *Lb. casei* et de ses sous espèces :

*Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *tolerans*, *Lb. casei* subsp .*rhamnosus* .

### - Le groupe III (ex sous genre *Betabacterium*) hétérofermentaire strict :

Ce groupe comprend les espèces qui fermentent les hexoses en produisant l'acide lactique, l'acide acétique (ou l'éthanol) et le CO<sub>2</sub>. Nous pouvons distinguer dans ce groupe un seul complexe d'espèces, axé sur les espèces suivantes :

*Lb. bifermens*, *Lb. brevis*, *Lb. bchniri*, *Lb. fermentum*, *Lb. kefir*, *Lb. confuses*,  
*Lb. viridescens*.

## **5- Aspect Génétique des bactéries lactiques.**

Les progrès de l'instrumentation scientifiques autorisent aujourd'hui la détermination moléculaire, la connaissance de la séquence de l'ensemble du génome d'organisme, y compris les bactéries lactiques.

Donc les connaissances actuelles des génomes des bactéries lactiques, *Lactococcus* streptocoque thermophile, les membres des genres des *Lactobacillus*, *Leuconostocs* et *Pediococcus* sont passés en revue et ont subi un spectaculaire avancement dans les dix dernières années.

Ces progrès ouvrent la voie à une amélioration des performances des souches dans ce domaine, les recherches ont avancé beaucoup plus vite sur les lactocoques que sur les lactobacilles.

### **5-1 Structure du matériel génétique:**

Les gènes des bactéries lactiques sont organisés dans deux structures:

- principalement dans une longue molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN), le chromosome.
- Secondairement dans des fractions d'ADN pouvant se répliquer de façon autonome, les plasmides.

#### **5-1-1 Chromosomes des bactéries lactiques**

Préalablement, pour mieux comprendre le séquençage de bactéries lactiques, on va citer quelques exemples notamment les espèces des genres étudiés.

##### **1- *Lactobacillus delbruku subsp bulgaricus* :**

Le génome de la bactérie *Lb. bulgaricus*, est constitué d'environ 1,9 millions de bases. Il présente plusieurs caractéristiques d'une évolution et d'une adaptation rapide à l'environnement laitier. La plus évidente est l'inactivation de plus de 250 gènes sur 1800.

L'inactivation de nombreux gènes a aussi été observée chez *S.thermophilus*. Les fonctions perdues témoignent de la spécialisation du lactobacille qui semble être passé d'un habitat végétal à un milieu laitier. Plusieurs voies de sucres d'origine végétale ont été inactivées pour favoriser l'utilisation spécifique du lactose, le sucre du lait. De même, quasiment toute la capacité de biosynthèse d'acides aminés a été perdue en faveur de l'utilisation des protéines du lait. Enfin, l'abondance d'opérons ribosomiques, éléments

génétiques essentiels à la vie de la bactérie, suggère que celle-ci a connu une importante réduction de la taille de son génome.

Cette évolution contribue à différencier *Lb. bulgaricus* des lactobacilles proches : la comparaison des contenus génétiques révèle environ 2/3 de gènes communs à la famille des lactobacilles et 1/3 de gènes spécifiques à *Lb. bulgaricus*. Certains de ces gènes spécifiques pourraient jouer un rôle dans l'adaptation de la bactérie au lait.

### **2- *Lactococcus lactis subsp lactis* IL1403:**

Le génome de *Lactococcus lactis* est un chromosome circulaire riche en AT avec 2.365.589 paires de bases et une teneur moyenne en G + C de 35.4 %.

Où 86 % du génome code pour les protéines (2310 protéines), 1.4 % pour les ARN et 12.6 % pour les régions non codantes.

Sachant que, 64.2 % des gènes codent pour des protéines fonctionnelles connues et 20.1 % des gènes code pour des protéines connues mais dont les fonctions non connues. Les 15.7 % restant des gènes codent pour des protéines non identifiées qui peuvent être considérées spécifiques au *Lactococcus*.

### **3- *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293 :**

Le génome de *Leuconostoc mesenteroides* est un chromosome circulaire avec 2.038.295 paires de bases et une teneur moyenne en G + C de 37.71 % où 87.8 % du génome code pour les protéines, dont 54.27 % des gènes codent pour des protéines fonctionnelles connues et 43.099 % des gènes codent pour des protéines connues mais dont les fonctions non connue, les 1.77 % restant des gènes codent pour des protéines non identifiées qui peuvent être considérées spécifiques au *Leuconostoc*.

### **4- *Pediococcus pentosaceus* ATCC25745:**

Le génome de *Pediococcus pentosaceus* est un chromosome circulaire avec 1.832.387 paires de bases et une teneur moyenne en G + C de 37.4 %. Le génome à 1755 gènes code pour les protéines et 72 gènes d'ARN.

#### **5-1-2 Plasmides des bactéries lactiques:**

Les plasmides des bactéries lactiques: ce sont les éléments qui ont été les plus étudiés, car ils peuvent coder pour des fonctions technologiques et parce que leur étude était plus aisée que celle du chromosome.

### ➡ Chez *Lactococcus lactis*:

Les souches de *Lactococcus lactis subsp lactis* et *cremoris* portent au moins 2 plasmides; généralement, chaque souche possède un de 4 à 7, voir 11 à 12 plasmides (Davies et Gasson, 1981; Ramos et al, 1983; Mckay, 1983; Fujita et al ; 1984; Andersen et al ; 1984).

Ces plasmides diffèrent par leur taille qui varie d'environ 1MDa à 80 MDa (Klaenhammer et al., 1978;; Davies et Gasson, 1981; Mckay et Baldwin, 1982. b; Tsai et Sandine, 1987).

### ➡ Chez les *Lactobacillus*:

- *Lactobacillus plantarum*: de 2 à 6 plasmides, de taille comprise entre 2.1 et 65 kpb).
- *Lactobacillus fermentum*: 4 plasmides, de 12.75 à 56.25
- *Lactobacillus sake*: deux plasmides (2.7 et 8.3 kpb (Fujita et al ; 1984)

### ➡ Chez les *Leuconostoc*:

- 1 à 7 plasmides ont été décelés dans les souches analysées, leur taille s'echelonne de 2.1 à 26.25 kpb et pouvant atteindre 120 kpb (Cavin et al ; 1988).
- *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides*: de 1 à 6 plasmides de taille 2.1 à 26.25 kpb (Cavin et al ; 1988).

### ➡ Chez les *Pediococcus*:

De 3 à 6 plasmides selon Mckay (1985). Gonzalez et Kunka (1983, 1986, 1987) ont trouvé de 1 à 5 plasmides chez *Pediococcus pentosaceus* dont la taille (de 1.8 à 45 kpb).

## 5-2 Principales fonctions codées par les plasmides:

### 5- 2-1 Métabolisme du lactose ou du galactose:

Dans beaucoup de souches de *Lactococcus*, certaines protéines, (enzyme II et facteur III) intervenant dans le transport du lactose à travers les enveloppes cellulaires, et la phospho - *B* galactosidase, scindant le lactose-phosphate, sont codées par des gènes portés par des plasmides; dans certains cas, ces plasmides peuvent même être intégrés dans le chromosome, ce qui stabilise les caractères des souches. La perte du plasmide entraîne donc l'impossibilité pour la souche d'utiliser le lactose et de se développer dans le lait.

Ce type de plasmide a aussi été trouvé chez *Lactobacillus casei* ou chez *Lb. helveticus*. L'utilisation du galactose est aussi affectée par la perte du "plasmide lactose".

### 5-2-2 Métabolisme des protéines:

Les bactéries lactiques ont des besoins nutritionnels complexes, et les quantités d'acides aminés ou de courts peptides trouvées dans le lait sont insuffisantes pour une croissance optimum. Ces bactéries utilisent donc une certaine fraction des caséines pour leur nutrition azotée, grâce à des protéinases liées à leur paroi. La perte de cette enzyme entraîne une croissance ralentie et une acidification faible du lait. Il a été montré que la perte de cette activité protéolytique, liée à la paroi cellulaire, était corrélée à la perte d'un plasmide. Chez certaines souches, les gènes codent pour la synthèse du lactose. Ainsi, les détections résultant de ces pertes partielles de plasmide peuvent générer des phénotypes Lac-Prt-, Lac-Prt+ et Lac+Prt-.

### 5- 2-3Métabolisme des citrates:

Ils sont connus depuis longtemps que la capacité de *Lc. Lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* à fermenter le citrate est une propriété instable.

Après cure plasmidique par l'acridine orange, on voit que les variants Cit<sup>-</sup> ont perdu aussi la capacité à transporter le citrate (mais ils ont encore la citratase clivant le citrate) et que ces changements sont en corrélation avec la perte d'un plasmide de 5,5 Megadaltons (Mdal). Un plasmide de 14,6 Mdal codant pour la même fonction peut être retrouvé chez *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*.

### 5- 2-4 Production des facteurs antimicrobiens:

Certaines souches de *Lactococcus lactis subsp. lactis* produisent un antibiotique polypeptidique: la nisine. Ce caractère peut être transmis simultanément avec la capacité à fermenter le saccharose, dans des souches dépourvues de plasmides, par le transfert d'un plasmide de 28 Mdal. D'autre part, des souches de *Lc. Lactis subsp. cremoris* produisent un bactériocine: la diplococcine. Des preuves partielles tendent à montrer que cette production pourrait être codée par un plasmide.

De même, de nombreuses souches de *Lactococcus* produisent d'autres bactériocines. Pour certaines, on a formellement identifié un plasmide de 8 Mdal ou de 75 Mdal codant pour ces substances.

### 5- 2-5 Autres caractères portés par des plasmides:

Au moins deux plasmides, chez les lactocoques, codent pour des mécanismes de résistance aux bactériophages, comme les systèmes intracellulaires de restriction-modification ou l'inhibition de l'absorption sur la surface cellulaire. D'autre part, la formation de polysaccharides épaississant les cultures sur lait a été rapportée à la présence de plasmide. Ceci est important chez les lactocoques utilisés pour la fabrication des laits épaissis scandinaves.

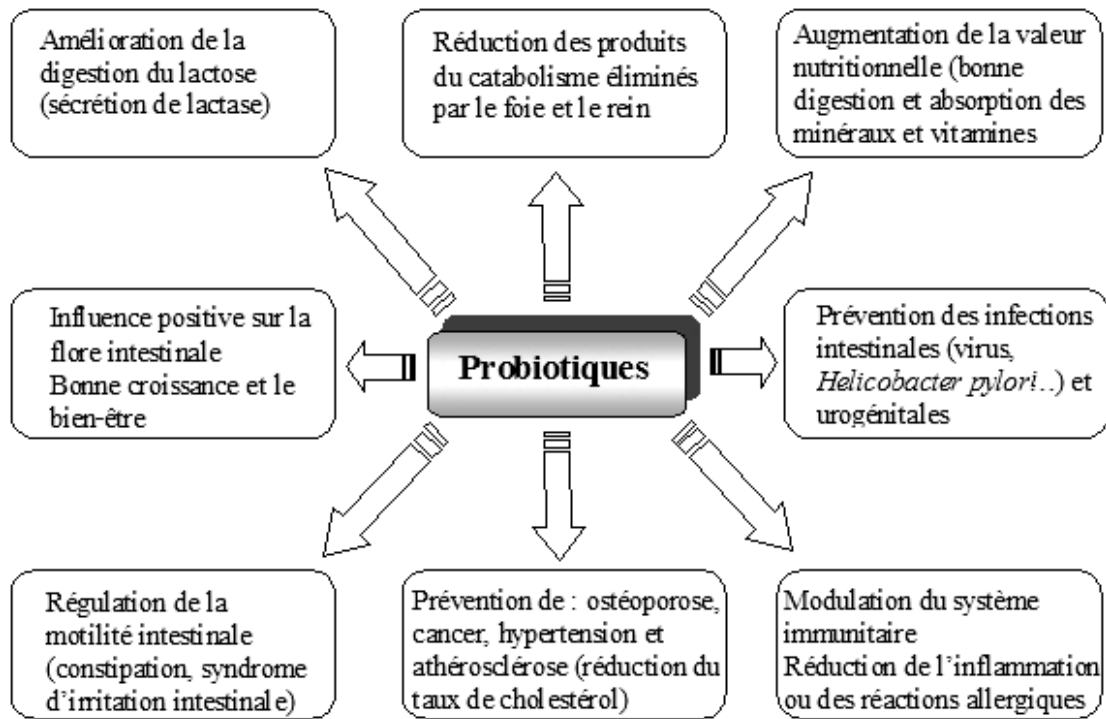
### 6- Différentes application des bactéries lactiques :

#### 6-1 Les probiotiques :

La notion de probiotiques a été développée grâce aux travaux de Metchnikoff (1907) qui avait constaté que les paysans bulgares, grands consommateurs de lait fermenté, vivaient très vieux et en/bonne santé. Metchnikoff avait alors proposé l'ingestion de bactéries vivantes, plus précisément de bactéries lactiques, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive et, donc, augmenter l'espérance de vie.

Le terme probiotique dérive de deux mots grecs, *pros* et *bios*, qui signifient littéralement « pour la vie ». Depuis, plusieurs définitions ont été données. Selon celle adoptée par l'ONU et l'Organisation mondiale pour la santé, les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, administrés en quantité adéquate, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte.

- Les infections gastro-intestinales.
- Diarrhées associées aux antibiothérapies.
- Infections intestinales à *Helicobacter pylori*.
- Renforcer le système immunitaire.
- Allergies – eczéma.
- Infections de l'appareil respiratoire.
- VIH – immunité compromise.
- Les maladies inflammatoires de l'intestin.
- Syndrome du côlon irritable.
- Un effet sur le cholestérol.
- Des effets anticancéreux.
- Intolérance au lactose.



**Figure02** : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques. Adapté de Mercenier et al. (2002).

## 6- 2-Différentes utilisations des bactéries lactiques en alimentation :

- **En domaine alimentaire :**

Les bactéries lactiques sont fréquemment associées de manière positive à l'alimentation humaine, à travers la fermentation d'une grande variété de produits (Ross et al ; 2002). Elles sont présentes en temps que flore technologique dans les produits laitiers (yaourts, fromages), les produits carnés (charcuteries),

Les produits végétaux (choucroute, pickles, olives fermentées), les levains de panification et les boissons alcoolisées (vins, bières blanches, saké) (Leroy & De Vuyst, 2004)

- **Produits laitiers :** fromages, yaourts, laits fermentés, kéfirs

*Lactococcus lactis subsp. lactis* et biovar *diacetylactis*

*Lc. Lactis subsp. cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuc. lactis Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*

*Lactobacillus helveticus*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* et *subsp. lactis Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. kefir*, *Lb. hilgardii*

*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*

- **Fermentation des végétaux:** "pickles", choucroute, "miso", "gari", olives

*Lactobacillus plantarum*, *Lb. brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus damnosus*

- **Pains spéciaux aux levains :**

*Lactobacillus plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. Sanfrancisco*

- **Fermentation des produits carnés**

*Carnobacterium divergens*, *Cb. Piscicola*

*Lactobacillus sake*, *Lb. curvatus*

- **Fermentation des produits de la pêche**

*Pediococcus halophilus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lb. Brevis*

*Leuconostoc mesenteroides*

- **Boissons:** vin, bière, cidre

*Leuconostoc oenos (Oenococcus oeni)*, *Lactobacillus delbrueckii*

### 6-3 La biopréservation des aliments :

La biopréservation consiste à inoculer sur un produit des souches bactériennes sélectionnées, de manière à inhiber la flore indésirable qui pourrait s'y trouver, sans modifier les caractéristiques organoleptiques de ce produit.

- **Les bactéries lactiques dans la biopréservation**

Les bactéries lactiques sont les bactéries les plus intéressantes pour la biopréservation. De nombreuses études ont montré leur potentiel dans toutes sortes de produits alimentaires. Certaines bactéries lactiques peuvent se développer rapidement dans les produits réfrigérés et emballés sous vide ou sous atmosphère modifiée. Certaines souches produisent des composés antimicrobiens (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl et bactériocines) sont généralement reconnues sans risques dans l'alimentation. (Larpen, 1987; 1993).

### 7- Intérêts biotechnologiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques jouent plusieurs rôles dans leur milieu de culture et ceci grâce à leurs propriétés métaboliques. L'industrie laitière est le domaine d'exploitation des ferments lactiques le plus important, ils sont utilisés pour leurs différentes activités.

#### 7-1 Activité acidifiante

Le rôle fondamental des bactéries lactiques utilisées en industrie laitière est d'acidifier plus ou moins le lait selon le produit recherché (Hemme&Desmazeaud, 1993).

En industrie laitière, l'activité acidifiante aboutit à la coagulation du lait et en activant la synérèse du caillé, et la solubilisation du calcium micellaire qu'ont une influence déterminante sur la texture des fromages (Choisy et al ; 1987; Hemme&Desmazeaud, 1993). Cependant ce rôle est déterminant dans le cas du lait fermenté (yoghourt), dont le pH se situe à une valeur inférieure à 4, car il empêche le développement du germe indésirable producteur de gaz putréfiant et de germes pathogènes éventuellement présents.

D'autre par l'activité acidifiante des bactéries lactiques dans les produits laitiers favorise la croissance d'autres micro-organismes producteurs d'arômes, et ce en agissant sur de nombreuses activités enzymatiques (Accolas et al ; 1980 ; Larpen, 1987; 1993).

#### 7-2 Production d'arômes ou de leurs précurseurs :

Les bactéries lactiques sont aussi à l'origine de nombreux arômes ou de leurs précurseurs. Il avère que le métabolisme du citrate en diacétyl et en acétoïne est la fonction la plus importante de certaines souches conduisant à des arômes qui participent largement aux caractéristiques organoleptiques des produits fermentés (Larpen, 1993).

De plus ces bactéries sont à l'origine aussi d'autres composés aromatiques, qui peuvent être présents dans les produits fermentés, notamment les acides volatils (acide acétique), les composés carbonylés (acétaldéhyde) et les composés divers (alcools, esters), issus de la dégradation des acides aminés (Choisy et al., 1987 ; Desmazeaud & Adda, 1989).

C'est essentiellement pour cette raison que l'on fait appel, en technologie laitière aux espèces *Lactococcus lactis subsp diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* et éventuellement à des espèces de genre *Lactobacillus* de groupe II ou III (Chamba et al ; 1994).

### 7-3 Activité gazogène :

L'activité gazogène résulte de la dégradation du citrate, dans le cas des bactéries homofermentaires. *Lactococcus lactis subsp diacetylactis* produit des quantités abondantes de CO<sub>2</sub> à partir du citrate, par contre les bactéries hétérofermentaires *Leuconostoc* et *Lactobacillus* du groupe II et III produisent du CO<sub>2</sub> à partir de la dégradation du lactose.

Cette activité gazogène conduit à la formation de bulles ou d'ouvertures dans les produits fermentés.

Ces souches sont très utilisées dans la fabrication des fromages à pâte cuite et persillée à titre d'exemple *Leuconostoc mesenteroides*. L'utilisation de telles souches provoque une ouverture régulière du caillé et permet un développement correct de *Penicillium roqueforti*.

### 7-4 Production de la viscosité :

La viscosité est un caractère très recherché dans la fabrication du yaourt et des petits laits. Elle est due à la sécrétion des gommés (polysaccharides, galactanes) et mucines (substances glucido-azotées) qui donnent l'aspect filant au produit (Fiess, 1994). Les souches responsables de cette sécrétion sont appelées «ferments filants», on peut citer l'exemple de *Streptococcus thermophilus* dans le yaourt (Anonyme, 1992).

### 7-5 Activité protéolytique :

L'activité protéolytique des bactéries lactiques constitue l'une des caractéristiques qu'il est indispensable de prendre en compte dans leur sélection. Cette activité qui est d'abord nécessaire au métabolisme azoté des bactéries lactiques, intervient sur les caractéristiques organoleptiques des produits laitiers fermentés (Choisy et al ; 1987; Desmazeaud, 1992).

### 7-6 Production de facteurs antimicrobiens :

#### 7-6-1 L'acidité :

Par leur présence impérative dans les produits fermentés, les bactéries lactiques créent des conditions d'acidité inhibant d'autres microorganismes. Cette inhibition est due à deux facteurs principaux qui doivent être pris en compte : le pH et les acides notamment l'acide lactique et l'acide acétique.

Les deux acides agissent en synergie : l'acide lactique contribue à diminuer le pH du milieu, augmentant ainsi la toxicité de l'acide acétique, ce qui va conduire à l'inhibition des germes sensibles aux pH inférieurs à 5,5 tels que *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Clostridia* et *Listeria monocytogenes* (Desmazeaud, 1992; Benthin&Villadsen, 1995).

### **7-6-2 Le peroxyde d'hydrogène :**

Il a été démontré que dans certaines conditions, notamment en présence d'oxygène, les bactéries lactiques peuvent produire du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui est un composé toxique pour différentes bactéries et surtout sur celles dépourvues de catalase ou de pseudocatalase capable de dégrader ce composé toxique (Chamba et al., 1994tg).

D'autre part Piard&Desmazeaud (1992) et Desmazeaud(1987) ont montré que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> active le système lactopéroxydase thiocyanate dans le lait en produisant un dérivé oxydé du thiocyanate qui en plus de son action bactéricide sur les germes Gram négatifs, induit l'inhibition des enzymes de la glycolyse, des systèmes de transport des sucres et des acides aminés.

### **7-6-3 Production des bactériocines :**

Les bactéries lactiques sont de très bons producteurs de ces substances antibactériennes, de nature peptidique ou protéique, qui sont capables d'inhiber la croissance de germes indésirables rencontrés dans les produits fermentés (Mc Kay & Baldwin, 1990 ; Lindgren et al ; 1990; Desmazeaud, 1994 ; 1992; Desmazeaud, 1996 ; Muriana, 1996 ; Kim, 1996).

## 1. bref historique et définitions

La découverte de la première bactériocine remonte à 1925. Cette dernière, isolée d'*Escherichia coli*, possédait une activité bactéricide envers une autre souche d'*E. Coli*. Elle fut nommée colicine V (Gratia 1925). À cette époque. Le concept de compétition entre diverses bactéries était instauré et bien accepté. Par contre, celui où des bactéries inhibent la croissance de souches de la même famille direre des conceptions établies.

La découverte d'une bactériocine chez les lactocoques remonte il 1933. À cette époque, Whitehead (1933) avait observé dans un lot de lait spécifique que la présence de deux souches de lactocoques inhibait la croissance d'un ferment de culture fromagère. L'étude démontra que les deux lactocoques produisaient une substance de nature protéique résistante au traitement thermique. Ce n'est qu'en 1944 que la première bactériocine d'origine lactique, la diplococcine, fut identifiée (Oxford, 1944). C'est en 1951 que l'utilisation de bactériocine pour protéger les aliments fut proposée. En effet, démontrèrent que la nisine inhibait la croissance de *Clostridium* lors de la maturation d'un fromage de type suisse.

Le terme plus général de bactériocine Fut proposé en 1953 pour englober tous les agents de type colicine caractérisés par une activité bactéricide .A cette époque. Les bactériocines étaient encore définies comme ayant un spectre d'action limité.

En 1963, Hamon et Peron observèrent que certaines bactériocines produites par les bactéries à Gram positif pouvaient avoir un spectre d'activité étendu.

Malgré cela, Tagg et al. Proposent en 1976 une définition selon laquelle les bactériocines ne regroupent que celles qui ont un spectre d'action limite. Bien que cette définition soit appropriée pour la majorité des bactériocines, elle fut par la suite élargie pour englober les bactériocines qui ont un spectre d'action étendue (Klaenhammer, 1993).

## 2. Nomenclature et classification :

Chez les bactériocines, différentes règles de nomenclature ont déjà été proposées (Hamon, 1964). Par contre, aucune n'a réellement été adoptée de façon unanime. Bien que l'addition du suffixe « ine » soit généralement employée, il demeure qu'il y a beaucoup de variabilité dans la nomenclature. En fait, la nomenclature d'une bactériocine est parfois basée sur le genre bactérien (Takeya et Tokiwa, 1972) ou parfois sur l'espèce .Il est même arrivé que pour une même espèce, la bactériocine soit nommée selon les deux méthodes désignées. C'est notamment le cas de *Corynebacterium diphtheriae* où les bactériocines sont nommées corycine ou diphthericine selon l'équipe qui a isolé la bactériocine .Malgré tout, et pour des raisons de simplification, ils arrivent fréquemment que la désignation donnée aux nouvelles

bactériocines inclut le nom de souche de la bactérie productrice. Afin de faciliter leur identification, différentes méthodes de classification ont été proposées.

En 1976, une méthode de classification des bactériocines isolées des bactéries à Gram positif fut proposée (Tagg *et al*, 1976). Compte tenu du nombre important de bactériocines et de leurs multiples origines, une première classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques fut proposée (Klaenhammer, 1988) et remise à jour en 1993 (Klaenhammer, 1993).

Essentiellement, cette méthode classe les bactériocines selon leur résistance à la chaleur, leur taille, certaines propriétés physico-chimiques, leur spectre d'activité et la présence ou non d'acides aminés modifiés. Pour ce faire, elle sépare les bactériocines produites par les bactéries Lactiques en quatre classes distinctes.

### **2.1. Classe I : Lantibiotiques:**

Il s'agit de peptides de taille réduite (<5kDa), contenant des acides aminés inhabituels obtenus par modification post- traductionnelle dont le plus caractéristique est la lanthionine. Pour souligner la présence de ce type d'acides aminés, les bactériocines de classe I ont été nommées lantibiotiques. La structure des lantibiotiques varie essentiellement en fonction de la localisation de ponts établis entre les acides aminés modifiés, ce qui permet de distinguer les types A (lantibiotiques linéaires) et B (lantibiotiques globulaires).

#### **2.1.1. lantibiotiques de type A:**

Le type A rassemble les lantibiotiques linéaires et cationiques structurés en hélice  $\alpha$ -amphiphile et de masse moléculaire <4 kDa. Ces peptides présentent des similitudes d'arrangement de leurs ponts "lanthionine". Ces bactériocines sont principalement synthétisées par les genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et également par des genres n'appartenant pas aux bactéries lactiques comme *Staphylococcus* ou *Bacillus*. Les membres les plus étudiés de cette classe sont la nisine produite par *Lc. lactis*, l'épidermine produite par *Staphylococcus epidermis* et la subtilise produite par *Bacillus subtilis* (McAuliffe *et al*, 2001b).

La nisine est considérée comme l'archétype des lantibiotiques de type A. À l'heure actuelle, la nisine est le seul peptide antibactérien à être utilisé comme additif Alimentaire, et a récemment été proposée comme alternative aux antibiotiques. Le terme nisine provient de "group N inhibitory substance" car la molécule est produite par *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, appelé auparavant streptocoque du groupe N ou streptocoque lactique.

### 2.1.2. Lantibiotiques de type B:

Les lantibiotiques de types B sont des peptides de 1,8 à 2,1 kDa adoptant une structure globulaire et plus rigide que celle des peptides de type A et une charge globalement nulle ou négative. Ces molécules agissent en inhibant certaines enzymes comme celles intervenant dans la biosynthèse de la paroi cellulaire. Cette sous-classe de lantibiotiques regroupe les duramycines, la merscidine, l'actagardine (Sahl et Bierbaum, 1998) et la mutacine A (Woodruff *et al*, 1998).

### 2.1.3. Autres lantibiotiques:

Enfin, il faut citer le cas particulier des lantibiotiques à deux composants comme la cytolysine la lacticine 3147 et la plantaricine W. Certains de ces lantibiotiques à deux composants montrent des peptides s'apparentant à chacun des types A et B décrit par Jung (1991b), ce qui rend difficile leur classification. De plus, d'autres lantibiotiques à simple peptide montrent des caractéristiques structurales et/ou fonctionnelles communes à ces deux types, ce qui laisse penser que cette classification devra être remaniée, au fur et à mesure de la caractérisation de nouvelles molécules (McAuliffe *et al*, 2001).

**Tableau 02:** Quelques bactériocines de la class I produites par les bactéries lactiques In (bactéries lactiques et probaiques par François marie Luquet Georges Corrieu édition TEC & DOC -- Lamisier 2005,115 ; 116.)

Lantibiotique	Producteur	Références
<b>Lantibiotiques de type A</b>		
La nisine A	Lactococcus lactis NIZO5	Buchman et al ; 1988
Lactocine S	Lactobacillus sake L 45	Skaugen et al ; 1994 Skaugen et al ; 1997
Salivaricine A	Stréptococcus salivaricus	Ross et al ; 1993
<b>Lantibiotiques de type B</b>		
Mutacine II	Stréptococcus mutans	Woodruff et al ; 1998

### 2.2. Classe II- Peptides non modifiés:

La classe II est constituée de petites bactériocines (<10 kDa) thermostables et sans modification post- traductionnelle.

Ces bactériocines agissent principalement en perméabilisant la membrane de la cellule cible (Hechard et Sahl, 2002). Cette catégorie est la plus largement représentée avec plus de 50 bactériocines caractérisées, ce qui a conduit à la création de trois sous-classes:

### **2.2.1. Sous-classe IIa:**

Les bactériocines de sous-classe IIa sont des peptides ayant une structure similaire à celle de la pédiocine, qui fut la première bactériocine de ce groupe décrite (Klaenhammer, 1993; Ennahar et al, 2000). En outre, toutes les bactériocines de cette sous classe tels que leucocineA etC, Méésentéricine Y105, Sakacine P, Entéroisine A et autre ont la particularité d'avoir une activité anti-Listeria.

### **2.2.2. Sous-classe IIb:**

La classe IIb correspond à des bactériocines à deux composants. L'activité optimale dépend de l'action conjuguée des deux peptides. Ces peptides peuvent être soit actifs individuellement, mais ils agissent de façon synergique quand ils sont associés (comme l'entéroisine L50A/L50B) (Cintas et al, 1998) soit inactifs individuellement, et leur activité antagoniste est subordonnée à l'association des deux peptides (exemples des lactococcine Ga /G /3, lactococcine M/N et des plantaricines E/F et J/K (Nissen-Meyer et al.,1992).

### **2.2.3. Sous-classe IIc:**

La classe IIc était initialement réservée par Klaenhammer (Klaenhammer, 1993) aux bactériocines activées par réduction de groupements thiol ("Thiol ctivated"), dont le représentant est la lactococcine B (Venema et al, 1993). Cependant, il a été depuis montré que la réduction d'un groupement thiol n'était pas indispensable à l'activité antibactérienne de cette bactériocine (Venema et al.,1996).

**Tableau 03:** bactériocines de la class II produites par les bactéries lactiques par (dany Manset, Jean-Marc berjeaud, Jacques Frère et Yann Héchard,-bcteriocines)

Bactériocine de la classII	Producteur	Références
<b>Sous class II a</b>		
Mésentéricine Y105	Leuconotoc mesenteroides ssp. Mesentéroïdes Y10R	Hachar et al 1992
Sakacine 5x	Lactobacillus sake 5	Vaughan et al ; 2001
pédiocinePA-1	Pédiococcus acidilactici PAC1.0	Chikindas et al ; 1993
<b>Sous class II b</b>		
Lactococcine MN (Len Met N)	Lactococcus lactis 9B4	Van belkum et al 1991a
Theemophiline 13 (thm A et B)	Ptréptococcus thermophilus sfi 13	Marciset et al ; 1997
Plantaricine S (Pls A et B)	Lactobacillus plantarum LCP 10	Jimenez-diaz et al ; 1995 ; stephens et al1998
<b>Sous class II c</b>		
Acidocine B	Lactobacillusacidophilus M46	Leer et al ; 1995
Lactococcine A	Lactococcus lactis	Van belkum et al 1991c : morgan et al ; 1995.

### 2.3. Classe III — Protéines:

Les bactériocines de classe sont caractérisées par leur grande taille, il s'agit de protéines dont la masse est supérieure à 30kDa. De ce point de vue, elles sont proches des colicines produites par E. coli, la plupart d'entre- elles sont produites par le genre *Latobacillus* comme l'helvétienne J produite par *Lb. helveticus* 481 et la lacticin B produite par *Lb. acidophilu* .

**Tableau 04:**

Bactériocines	Producteur	Références
Hévéticine J	Lactobacillus helveticus 48I	Joerger et klaenhammer 1990
Milléricine B	Streptococcus milleri NMSCC 061	Beukes et al ; 2000
Zonncine A	Streptococcus zooepidermicus	Simmonds et al ; 1996

#### **2.4 Classe VI :**

Présente des protéines complexes et hétérogènes sur le plan structurelle elle renferme une partie non protéique indispensable à l'activité biologique le plus souvent oligosaccharidique ou lipidiques (Twomex et al ; 2000).

#### **3. La biosynthèse des bactériocines**

La biosynthèse d'une bactériocine nécessite l'interaction de plusieurs facteurs qui sont généralement contrôlés par des protéines. L'induction de la synthèse d'ARN, la maturation, l'exportation et finalement l'immunité de la souche productrice sont toutes contrôlées par des familles de protéines distinctes. De façon générale, la biosynthèse d'une bactériocine débute par le signal provoqué par un facteur d'induction. En générale, ces facteurs d'induction provoquent un signal chez une histidine-kinase située à la surface de la membrane.

Celle-ci provoque la phosphorylation d'un régulateur de réponse qui interagit directement avec les différents promoteurs présents sur l'opéron de la bactériocine. Quelques facteurs d'induction sont bien connus. Par exemple, la biosynthèse de la nisine est induite par la nisine elle-même alors que pour les bactériocines de classe II, c'est un peptide similaire à la bactériocine qui induira la biosynthèse. Ces peptides sont généralement inactifs. Par contre, le facteur d'induction de la plantaricine démontre une activité bactéricide.

Suite à l'induction, les bactériocines sont synthétisées par la voie ribosomique sous forme de pré peptides. Ces derniers possèdent un peptide signal en N-terminal qui doit être clivé pour que la bactériocine mature soit active. La présence du peptide signal joue un double rôle.

En premier lieu, tout indique que la présence du peptide signal inactive la bactériocine (Ennahar et al, 2000). De plus, cette séquence en N-terminal garantit que le pré-peptide sera exporté via le transporteur dédié ou sec-dépendant approprié (Nes et al.. 1996). Ainsi, le peptide signal pourra être clivé par une peptidase spécifique ou, comme c'est le cas pour la plupart des bactériocines de classe II, il sera cliver par le domaine protéolytique du transporteur lors de la sécrétion de la bactériocine par ce même transporteur. Cette reconnaissance du peptide signal est due principalement à sa séquence.

En effet, chez les bactériocines de classe II, il est très fréquent d'observer un doublet glycine à la position -1 et -2 du site de clivage. C'est ce doublet qui garantit une reconnaissance du site de clivage par la peptidase dédiée.

La sécrétion des bactériocines peut s'effectuer par deux voies, celle des transporteurs dédiés ou par la voie sec dépendante. Cette dernière est une voie de transport générale qui n'est

pas spécifique aux bactériocines. Les protéines de transport dédiées chez les bactériocines sont presque toutes de types ABC. Ces protéines jouent plusieurs rôles dans la biosynthèse des bactériocines. En plus de leur rôle évident de transporteur, elles participent. Comme il a été mentionné préalablement, au clivage du peptide signal des bactériocines lors du transport de celles-ci. Pour les lantibiotiques, le transport s'effectue seulement lorsque les réactions de modification post-traductionnelles ont eu lieu (DeVuyst et Vandamme, 1994). Suite Si la sécrétion de bactériocines matures, l'immunité doit être confinée à la souche productrice. Pour les bactériocines de classe I identifiées chez les lactocoques. Deux systèmes participent à l'immunité.

La majorité de l'immunité est attribuable à des protéines d'immunité dont le mode d'action exact demeure inconnu. Il est cependant postulé que ces dernières sont présentes sur la surface externe de la membrane bactérienne et que leur structure est modifiée par des lipides (Kuipers *et al.*, 1993).

Le deuxième système semble être utilisé par la nisine, la lacticine 3147 et la lacticine 481. En fait, cette deuxième barrière est attribuée à un second transporteur de type ABC qui participe à l'immunité de la souche productrice. En effet, il a été démontré par transformation de souche sensible que le phénotype d'immunité est en partie attribué à ce transporteur. Ce système est similaire à celui impliqué dans la résistance à la subtiline et la microcine B17 (Parente et Ricciardi, 1999).

Pour les bactériocines de classe II qui ont été suffisamment caractérisées, ce système de transporteur de type ABC ne semble pas être présent. L'immunité serait en fait attribuée à une seule protéine de surface. Ces protéines sont généralement de petite taille et montrent un faible degré d'homologie entre elles. Par contre, (Eijsink *et al.*; 2000) stipulent que ces dernières pourraient avoir une conformation structurelle similaire.

#### **4. Mode d'action :**

Le mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques est étudié depuis une quinzaine d'années. La grande majorité de ces bactériocines induisent une perméabilisation des bactéries cibles, caractérisée par la fuite de composés cellulaires, et dissipent la force proton – motrice (PMF) en agissant sur l'un et/ou l'autre des deux composants de la PMF : un composant chimique, le gradient de pH ( $\Delta\text{pH}$ ). Il est généralement admis que ces effets des bactériocines sur les bactéries sont la conséquence de la formation de pores par ces peptides dans la membrane cytoplasmique.

##### **4.1. Bactériocines de classe I:**

Au regard du mode d'action, les lantibiotiques du type A semblent former des pores dans la membrane des cellules cibles alors que ceux du type B inhibent l'activité de certaines enzymes (Twomey et al, 2002).

Le tableau ci-après résume les informations récoltées pour les bactériocines de classe I.

**Tableau 05:** Mode d'action des bactériocines de classe I:

Nom	Mode d'action	Cible	Références
Type A			
Nisine	Preméabilisation inhibition synthèse du PG	Lipide II	(Rhur et sahl, 1985 ; sahl er al., 1987 ; Gao et al., 1991 ;
Carnocine U149	Preméabilisation		Brotz et al., 1998b ;
Plantaricine C	Preméabilisation		Breukink et al.,
Streptococcine A- FF22	Preméabilisation		1999a) ; Stoffels et al., 1994 ; Jack et al., 1994
Type B			
Cinnamycine	Preméabilisation	phosphatidyléthanolamine	(Makino et al., 2003)
Duramycine	Preméabilisation	phosphatidyléthanolamine	(Marki et al., 1991)
Mersacidine	inhibition synthèse du PG	Lipide II	(Brotz et al., 1998a) ; McAuliffe et al., 1998.
Lacticine 3147	Preméabilisation		

#### 4.1.1. Activité des lantibiotiques de type A:

La nisine, produite par *Lc.lactis*, présente un spectre d'action relativement large contre certains souche des genres *lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphilococcus*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Bacillus* et *Clostridium*. Son mode d'action au niveau moléculaire fait encore l'objet de nombreuses publication (Sahl et Biérbaum, 1998 ; McAuliffe et al., 2001a ; Hechard et Sah1, 2002). La nisine et les lantibiotiques de sa famille ont été décrits depuis longtemps comme responsable de la formation de pores dans la membrane des cellules cibles (tableau08).

#### 4.1.2. Activité des lantibiotiques de typeB:

A notre connaissance, aucun mode d'action de l'antibiotique de type B n'a été décrit chez les bactéries lactiques.

#### **4.2. Bactériocines de classe II:**

##### **4.2.1. Bactériocines de sous classe IIa:**

La plupart des études relatives au mode d'action concernent les bactériocines de sous-classe Ha (Ennahar et *al*, 2000 ; Hechard et Sahl, 2002).

Ces bactériocines ont un spectre d'activité relativement faible, limité à *Listeria*, quelques bactéries lactiques, comme *Enterococcus* et *Lactobacillus*, et certains *Clostridium*. Toutes ces bactériocines de sous-classe Ha, dont le mode d'action a été étudié, dissipent la PMF (tableau06). Certaines de ces bactériocines ont montré une activité contre des membranes lipidiques artificielles suggérant une action non médiée par un récepteur, cependant des travaux récents ont montré que l'expression d'une protéine membranaire, une perméase au mannose, était indispensable à l'activité des bactériocines de sous-classe Ha *in vivo*. Filmand a finalement proposé que le pédiocine PA-1 modifie la perméabilité des cellules sensibles en forant des pores dans la membrane cytoplasmique et qu'elle requiert une molécule cible à la surface des bactéries pour être active. (Filmand, 2002).

**Tableau06:** Mode d'action des bactériocines de classe II

nom	Mode d'action	cible	Références
<b>Sous classIIa</b>			
Bavracine MN	Perméabilisation	Nd	Kaiser et montville, 1996
Entéroccine p	Perméabilisation	Nd PTS mannose	Cintas et al : 1997, Herranz et al ; 2001
Mésentéricine y105	Perméabilisation	PTS mannose	Hécharde et al 1992 maftah et al ; robichon et al 1997
Pédiocine PA-1	Perméabilisation	PTS mannose	Bhunja et al 1991 ; chinkindad et al 1993 ; chen et al 1997b 1998 ; fimland et al 1998
<b>Sous classIIb</b>			
Lactacine F	Perméabilisation	ND	Abee et al ; 1994
Lactococcine G	Pores cationiques	ND	Nissen-meyer et al ; 1992 ; moll et Al ; 1996 ; 1998
Plantaricine EF	Pores cationiques	ND	Moll et al ; 1999
Plantaricine JK	Pores cationiques	ND	Moll et al ; 1999
<b>Sous classIIc</b>			
Lactococcine A	perméabilisation	ND	Van bzlkum et al ; 1991
Lactococcine 972	Inhibition de la formation du septum	ND	Martinez et al ; 1996 ; 1999.2000
Plantaricine A	perméabilisation	ND	Hauge et al 1998

**4.2.2. Bactériocines de sous classe II b):**

A l'heure actuelle, toutes les études concernant le mode d'action de ces bactériocines hétérodimériques ont montré une activité de dépolarisation de la membrane cytoplasmique et de perméabilisations, avec cependant des différences de sélectivité des pores formés (tableau06).

A titre d'exemple, la lactococcine G est produite par *Le. Lactis* et active contre diverses

bactéries lactiques et certaines souches de *Clostridium*. Cette bactériocine dissipe le potentiel de membrane alors qu'elle n'a pas d'effet sur le pH (Nissen-Meyer et al, 1992). Ceci suggère qu'elle serait capable de former des pores imperméables aux protons. En revanche, cette étude a montré un efflux important potassium et d'autres cations monovalents. La lactococcine G induit une fuite d'acides aminés. La concentration d'ATP intracellulaire est également fortement diminuée (Moll et al, 1996). Membranaires indiquant qu'une molécule associée à la paroi est nécessaire pour l'activité de cette bactériocine (Moll et al, 1998).

#### **4.2.3. Bactériocines de sous classe IIc:**

Hechard et Shal proposent dans cette sous classe les bactériocines de classe II N'appartenant pas aux bactériocines "anti-listeria "ou "à deux composantes (Hechard et Shal, 2002).

La lactococcine A est une des premières bactériocines dont le mode d'action a été étudié (Van Belkum et al, 1991b). Cette bactériocine, synthétisée par *Lc. Lactis*, est constituée de 54 résidus et possède un spectre activité étroit, limité à certaines souches de la lactococcus. Son étude a montré que la lactococcine A dissipe le  $\Delta\psi$  et induit la sortie et l'entrée d'acides aminés des bactéries sensibles. Cela suggère que le lactococcine A affecte la perméabilité de la membrane cytoplasmique, les auteurs ont donc proposé que la bactériocine forme des pores dans la membrane des cellules cibles.

#### **4.3. Bactériocines de classe III:**

Peu d'études sur le mode d'action des bactériocines de classe III ont été publiées (Tableau 10) Les parties N-terminale de la zoocine A, la milléricine B et l'entérolysine A ont des similitudes de séquences avec des endopeptidases comme la lysostaphine, ces bactériocines agissent en clivant la partie peptidique du peptidoglycane des cellules cibles et sont bactéricides. L'entérolysine A et la milléricine B possèdent un spectre d'action relativement large tandis que la zoocine, comme la lysostaphine, a un spectre limité au même genre ou à la même espèce que le producteur. Il a été proposé que ce spectre limité pourrait être le résultat de la spécificité de ces enzymes pour la nature du pont peptidique inter — chaîne dans le peptidoglycane.

**Tableau 07:** Mode d'action des bactériocines de classe **III**:

Nom	Mode d'action	Cible	Références
Enterolysine A	Hydrolyse du péptidoglycane endopeptidase	Peptide tronc ou interchaîne	Nislen et al ; 2003
Zoocine A	Hydrolyse du péptidoglycane endopeptidase	Peptide interchaîne	Simmonds et al ; 1996 ; 1997
Milléricine B	Hydrolyse du péptidoglycane endopeptidase	Peptide tronc ou interchaîne	Beukes et al ; 2000 ; beukes et Hastings .2001

## 5. Applications industrielles des bactériocines de bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont depuis des millénaires utilisées pour leur qualité de "préservateurs" alimentaire. Cette préservation vis-à-vis des contaminants bactériens peut s'exercer selon deux schémas non exclusifs qui sont la compétition pour les nutriments et la production des métabolites antimicrobiens.

Parmi ces métabolites se retrouvent les acides organiques, dont bien entendu l'acide lactique, mais également le di-acétyle, l'acétyle, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines. Tous ces composés participent au contrôle de la flore bactérienne et ont un impacte important sur la durée de la vie de l'aliment ainsi que sur ses qualités gustatives (Schillinger *et al*, 1996).

Nous nous focaliserons dans un premier temps sur l'utilisation, potentielle ou effective, des bactériocines en protection alimentaire. Le dernier volet abordé portera sur les potentialités de ces molécules antibactériennes dans les autres secteurs industriels comme l'hygiène ou la santé.

### 5.1. Protection alimentaire:

Les bactériocines de bactéries lactiques sont actives contre des bactéries Gram positives, phylogénétiquement proches de la souche productrice. Un très grand nombre d'entre elles ont une action anti-*Listeria* qui les rend intéressantes pour la protection alimentaire.

Toutefois, il a été montré que leur association avec des composés qui déstabilisent la membrane externe leur confère une activité contre des bactéries Gram négatives (Stevens et al. 1991).

C'est toutefois sur leur action contre *Listeria* principalement qu'elles ont été sélectionnées et analysées. L'ajout de bactériocine à un aliment peut s'envisager selon plusieurs stratégies. D'une part l'ajout de la bactériocine pure, partiellement purifiée ou comme constituant d'un produit préalablement fermenté par une bactérie productrice de bactériocine. Elle est alors considérée comme additif alimentaire.

D'autre part l'inoculation de l'aliment avec une souche, appelée culture protectrice, qui produira une bactériocine directement dans l'aliment. Cet ensemencement peut intervenir aussi bien au début du processus de fabrication que sur le produit fini.

### **5.1.1. Additif alimentaire:**

L'inconvénient actuel de la première de ces stratégies réside dans la nécessité de faire accepter légalement la molécule antibactérienne comme additif. Aujourd'hui la nisine est la seule bactériocine ayant reçu l'agrément de nombreux pays pour son utilisation en préservation alimentaire (Schillinger et al, 1996; ennahar et al, 1999).

La nisine A est un antibiotique de type I caractérisé par un spectre d'action large qui lui confère un intérêt dans la mesure où son utilisation peut-être élargie à presque toutes les bactéries Gram positives. Cependant, de fait, elle ne peut pas être employée sans précaution en conjugaison avec des bactéries lactiques qui pourraient être sensibles. D'autre part, il a été démontré que les paramètres physicochimiques (active à pH acide) pouvaient influencer grandement son action. De plus, son action anti-*Listeria monocytogenes* est relativement faible et ce particulièrement dans les pays ayant limité sa concentration d'application (Ennahar et al, 2000), Néanmoins, ce antibiotique est largement utilisé et recommandé pour la protection d'aliments variés vis-à-vis des contaminations par divers germes.

Ainsi, en application fromagère, l'efficacité de la nisine a été démontrée dans le "cottage cheese" comme dans la Ricotta pour inhiber la croissance de *L. monocytogenes*. L'efficacité de la nisine pour protéger les produits carnés est controversée. En effet, certains autres pensent que ce antibiotique n'est pas efficace dans ces aliments du fait de leur pH élevé (Rayman et al, 1981,1983) et de la distribution des composants de l'aliment, comme les phospholipides qui interagissent avec la bactériocine (De Vuyst et Vandamme, 1994). Cependant certains autres ont montré que dans certaines conditions la nisine était efficace

pour la protection d'aliments carnés

## **5.2. Hygiène et santé :**

Il est peu probable que les bactériocines de bactéries lactiques puissent être utilisées en tant que médicaments en alternative aux antibiotiques. En effet, ces molécules sont très largement répandues dans l'alimentation et ainsi fortement susceptibles de conduire à l'apparition de résistants.

En effet, en protection alimentaire les bactériocines sont utilisées de façon sont parvenus à inhiber *Bacillus coagulans* dans des canettes de fruit et légume en y incorporant la souche productrice de l'enterocine AS-48.

Sur les plans cliniques d'autre bactériocines pourraient jouer un rôle clé en thérapie humaine dans la lutte contre les pathogènes multi résistants. C'est le cas de la mersasedine utilisé avec succès contre staphylocoque doré résistant à la méthicillines, et de lacticine 3147 contre les entérocoques résistants à la vancomycine.

Dans le même sens, les bactériocines présentent une alternative pour le contrôle et la prévention des infections nosocomiales. Nascimento at al (2005) ont réussi à inhiber des souches de staphylocoque doré méthicilline résistant et coagulasse négative avec l'aureocin A53 et l'épidermine. Dans le domaine cosmétique, l'épidermine, bactériocine produite par *Staphylococcus epidermidis* Tu 3298 est utilisée en remplacement de germicides chimiques courants pour lutter contre l'acné.

## **Matériel et méthodes utilisés :**

### **1- Matériel:**

#### **1-1-Verrerie :**

- Tubes à essai
- Béchers 250ml
- Béchers 500ml
- Béchers 50ml
- Cristalliseur pour atmosphère anaérobie
- Erlenmyer 250ml
- Erlenmeyer 500ml
- Fioles 250 —conservation des milieux de culture -
- Lames et lamelles pour microscope optique
- Pipettes graduées 5ml : 10ml.
- Pipettes Pasteur.
- Tubes d'hémolyse - centrifugation

#### **1-2-Outils :**

- Anse de platine
- Portoir pour tubes a essai
- Barreaux magnétiques
- Bec bunsen
- Autoclave 160 °C
- Boite de pétri
- Ecovillons
- Huile à immersion
- Pince

#### **1-3-Appareillage**

- Balance électronique de précision
- centrifugeuse électronique réfrigérée
- Etuve électrique
- microscope optique Zutu objectifs:( X10, X40\_ X60. X 100)
- pli mètre électronique
- plaque chauffante

- Réfrigérateur (-20 °C à 5°C)
- Microscope binoculaire

#### 1-4-Le Jben :

Fromage traditionnel, très répandu en Afrique du nord spécialement au Maroc, Algérie et en Tunisie. Obtenu principalement par l'ajout d'un agent de coagulation (chymotrypsine présente dans l'intestin du veau ou bien la présure) au lait frais (vache, brebis, chèvre) qui est sous mis à la cuite à petit feu ;

Le jben de la région de Khenchela est préparé selon ce même principe : la coagulation du lait frais se fait le contact du lait à l'intestin du veau contenu dans un filtre laissant le contact entre lait-intestin sans pour cela qui est diffusion de DOTH (appellation de la partie de l'intestin ; séché et transformé en une mixture presque poudreuse), selon les villages on peut ajouter des condiments tel que poivre ou piment

La qualité du lait ( lait de vache : lait de brebis lait de chèvre) d'où le jben a été fabriqué influe sur la flore, la croissance et l'activité des bactéries lactiques existante dans le jben qualitativement et quantitativement ; par exemple les lactobacilles sont plus dominante dans le jben fabriqué à base de lait de chèvre qu'un d'autre type du jben ; et cela est du clairement selon ta race de l'animai , type d'alimentation et la saison de la récolte du lait et par conséquent selon les composants nutritionnel de chaque type du lait et les exigence nutritionnels de chaque souche des bactéries lactiques .

Autre facteurs control la flore des bactéries lactiques du jben est du jben lui- même frais doux ou bien ancien préparé pendant quelques jours peu acide et par conséquent dans ce dernier on trouve majoritairement des bactéries lactiques qui peuvent tolérées des valeurs de pH un peu basses.

Les échantillons de jben analysés sont pris directement du marché, il s'agit de 05 prélèvement de 100 g puis transporté jusqu'au laboratoire dans des conditions D'aseptise satisfaisante.

**Tableau08:** Répartition des prélèvements au cours de l'année 2011/2012 :

Prélèvement	date
1 <sup>er</sup>	10/04/2012
2 <sup>ème</sup>	21/04/2012
3 <sup>ème</sup>	02/05/2012
4 <sup>ème</sup>	16/05/2012
5 <sup>ème</sup>	29/05/2012

## 2. Méthodes :

### 2.1. Méthodes d'isolement, de purification et de conservation des souches :

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

#### 2.1.1. Isolement :

A partir de l'échantillon du jben, nous avons effectué initialement des dilutions décimales allant de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  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 (Terzaghi *et al*, 1975) ce milieu convient pour l'isolement des streptocoques lactiques et MRS (De Man *et al*, 1960) utilisé pour l'isolement du genre *Lactobacillus* 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 Streptocoques lactiques sur M17.

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

Les boîtes sont lues après 48 et 72 heures d'incubation. Pour chaque échantillon de jben, l'observation des colonies est réalisée simultanément pour toutes les dilutions.

#### 1.1.2. 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 M 17 sont repiquées respectivement sur bouillon MRS et bouillon Elliker (utilisé pour l'enrichissement du genre *Lactobacillus* et du genre Streptocoques lactiques).et puis sont 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 *Streptocoques lactiques* et *Lactobacillus* 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 (milieu pour l'enrichissement constitué à 10% (P/V) par du lait écrémé) stérile réparti en tubes.

Le lait écrémé inoculé par les cultures est incubé à 37°C pendant 18h, toutefois la coagulation du lait après incubation indique la présence de bactéries acidifiantes ce qui laisse supposer qu'il s'agit des souches lactiques. De ce fait elles seront conservées pour subir les différents tests d'identification.

**Remarque:**

Tout au long des différentes étapes d'isolement et de purification, il est nécessaire de réaliser une coloration de Gram afin de vérifier l'absence des germes contaminants Gram négatif et les boîtes contaminées sont éliminées

**2.1.3. Conservation:**

Cette opération est nécessaire pour le maintien de la viabilité des souches isolées jusqu'à l'étape d'identification. Les souches isolées sont conservées dans un milieu de conservation proposé par (Accolas et al, 1972 ; Accolas et al, 1980). Ce milieu est constitué d'un mélange de 75%, de lait écrémé à 10% et de 25% de glycérol.

Elle consiste à introduire dans 5ml du milieu de conservation 0.5ml du lait écrémé récupéré à la fin de l'étape de purification de la souche isolée puis incubée à 37°C pendant 6-12h et enfin conservé au congélateur à -30°C.

**2.2. Méthodes d'identification**

Après l'activation des souches isolées par des repiquages successifs sur milieu Elliker, les cultures des souches à étudier sont prises en phase exponentielle de croissance pour subir les différents tests d'identification

Les bactéries lactiques isolées sont identifiées par les méthodes classiques, basées sur la connaissance d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques proposés par Guiraud et Galzey (1980), Deroissart, (1986) et Leveau *et al*, (1989; 1991) et aussi selon les normes de la fédération internationale du lait FIL-norme (1991).

L'identification des isolats des bactéries lactiques au stade genre a été réalisée en deux étapes :

1- La première consiste à tester tous les isolats par la coloration gram, la production de la catalase, la recherche d'un cytochrome oxydase, la recherche d'une nitrate

réductase et le test de mobilité.

2- La deuxième est basée sur l'étude morphologique (macroscopique et microscopique)

Les isolats de bactéries lactiques ont été identifiés au stade espèce sur la base des critères d'identification rapportés par plusieurs auteurs comme suit :

1- La détermination du type fermentaire (homo-hétérofermentation) et la température optimale de Croissance.

2 - Les tests de croissance en milieux hostiles telles que la croissance en présence de différentes concentrations en Na Cl et la croissance sur le lait de Sherman et la thermorésistance.

3- Les caractères biochimiques par l'étude du métabolisme enzymatique et fermentaire, tels que le profil glucidique, la recherche de la citratase et de l'acétoïne.

Les tests utilisés pour l'identification des souches isolées sont décrits comme suit:

### **2.2.1. Les tests communs:**

#### **2.2.1.1. Coloration de Gram :**

Ce test permet de distinguer les bactéries Gram + et Gram — en fonction de la teneur en lipides de la paroi.

Principe : Basé sur la composition chimique de la paroi des bactéries. Le Gram différencie les bactéries selon qu'elles aient conservé le cristal violet après le traitement à l'alcool ou non.

Préparation du frottis : mettre une goutte d'eau distillée à l'aide d'un fil bouclé au centre d'une lame. Avec un fil droit prendre une petite partie d'une colonie isolée, la déposer à côté de la goutte pour la visualiser et la mélanger avec l'eau. Faire sécher complètement sur plaque chauffante.

Technique de coloration :

- 1- Colorant : Cristal violet 30 sec et rincer à l'eau
- 2- Mordant : Iode gram 30 sec et rincer à l'eau
- 3- Décolorant : Alcool (compter 1-2-3 si fait à partir d'un bouillon et 1-2-3-4-5 si fait à partir d'une gélose) en inclinant la lame et rincer immédiatement
- 4- Contre-colorant : Safranine 30 sec et rincer à l'eau
- 5- Sécher la lame avec du papier buvard.

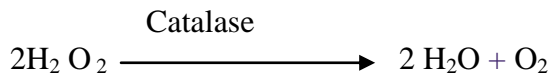
Lecture : À l'immersion : 100x

Gram positif (+) : violet

Gram négatif (-) : rose (Schleifer et Kilpper-Balz, 1987)

**2.2.1.2. Catalase :**

Cet est permet de Vérifier si la bactérie possède l'enzyme catalase. Cette enzyme Décompose le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en eau et en oxygène ( $\text{O}_2$ )



Principe : lors du métabolisme oxydatif des sucres, il y a formation de peroxyde d'hydrogène. Si celui-ci s'accumule dans la cellule bactérienne, il serait rapidement létal pour la bactérie.

L'enzyme catalase assure la dégradation du peroxyde en eau et en oxygène. Ce dernier se présente sous la forme de bulles dans le liquide (Leveau et al, 1989).

Technique : Avec un fil bouclé, déposer quelques colonies sur une lame. Ajouter une goutte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sur les colonies.

Réactif : Peroxyde d'hydrogène à 3% ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Lecture : immédiate — présence ou absence de bulles

Résultat : catalase positive (+)-présence de bulles

: Catalase négative (-) - absence de bulles

**2.2.1.3. Cytochrome\_ Oxydase :**

Ce test permet de Mettre en évidence le cytochrome oxydase chez une bactérie donnée. Le système des cytochromes se retrouve chez les bactéries aérobies et anaérobies facultatives.

Principe : Dans le test cytochrome oxydase, on utilise certains réactifs colorants que l'on substitue à l' $\text{O}_2$  comme receveur d'électron. À l'état réduit, le réactif est incolore, en présence de l'enzyme cytochrome oxydase et de l'oxygène de l'air, le phénylènediamine est oxydé et forme un composé bleu-pourpre.

Technique : Déposer une goutte de réactif sur un papier filtre placé dans un pétri. Avec un fil bouclé, placer une ou plusieurs colonies sur le papier à un endroit où il y a du réactif Réactif : di ou tétraméthyl-p-phénylène diamine dihydrochlorure.

Lecture et résultat: Immédiate.

Oxydase Positive (+) : coloration violette ou pourpre

Oxydase négative (-) : aucune coloration (Dellaglio et al, 1994)

**2.2.1.7. Mobilité (mobilité en tube) :**

Ce test permet de Détecter si la bactérie est mobile ou non.

Technique : À partir cultures des souches tests sur bouillon Elliker on ensemence par piqûre centrale le milieu gélosé semi-solide de mannitol mobilité coulé en tubes (Dellaglio et al, 1994).

Incubation : 24 heures à 37°C

Lecture :

Mobile (+) : diffusion de la bactérie dans le tube à partir du trait d'inoculation.

Non-mobile (-) : absence de diffusion

## **2.22. Les tests spécifiques :**

### **2.2.2.1. Production de CO<sub>2</sub> à partir du glucose :**

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la formation de CO<sub>2</sub>. Pour réaliser ce test, il suffit d'utiliser des tubes de milieu liquide glucosé dans lesquels on introduit préalablement des cloches de Durham qui permettent la mise en évidence du gaz produit (Carbannelle et al ; 1990).

On ensemence le milieu de culture par les souches testées et on incube à 30°C (souche mésophile) et à 37°C (souches thermophiles), pendant 24 h. Pour les streptocoques et les lactobacilles, la réaction positive se traduit par la présence du gaz à 1/10 du volume de la cloche (Leveau et al, 1991).

### **2.2.2.2. Températures de croissance :**

Ce test est très important car il permet de différencier les bactéries mésophiles de celles qui sont thermophiles. D'autre part, ce test permet aussi de distinguer entre les deux sous-genres homofermentaires du genre *Lactobacillus* : *Thermobacterium* et *Streptobacterium* (Mitruka, 1976).

Les tubes à essais contenant soient le M17 soit le MRS sont ensemencés à l'aide d'une anse de platine bouclée, par les souches supposées appartenir aux genres *Streptococcus* et *Lactobacillus*.

*I: incubation* est réalisée à des températures et des durées différentes.

Les streptocoques

Les lactobacilles

10°C pendant 7 à 10 jours 15°C pendant 7 à 10 jours

30°C pendant 24 à 48 h 45°C pendant 24 à 48 h

40°C pendant 24 à 48 h

45°C pendant 24 à 48 h

La croissance bactérienne est estimée, par l'apparition du trouble dans le bouillon (Leveau et al, 1991; FIL-norme, 1991).

### **2.2.2.3. Test de croissance en milieux hostiles :**

#### **> Croissance sur bouillon hypersalé :**

Ce test permet de voir l'aptitude des souches à se développer en présence de chlorure de

sodium (NaCl). Il nous donne des renseignements précieux pour l'identification.

Cette aptitude est vérifiée par ensemencement du bouillon Elliker additionné respectivement de 2.5%, 4% et 6.5% de NaCl. L'incubation est réalisée à 30°C pour les souches mésophiles et à 37°C pour les souches thermophiles et ce pendant 48 heures. La présence d'une trouble indique la croissance bactérienne (FIL-norme, 1991)

> ***La thermorésistance :***

Les Streptocoques sont testés sur bouillon M17 par chauffage du milieu ensemencé au bain marie à une température de 63 °C pendant 30 min.

Les tubes sont refroidis rapidement après chauffage, l'incubation est réalisée à 30°C (souches mésophiles) et à 37°C (souches thermophiles) pendant 24 à 48 h

**2.2.2.4. Recherche de la citratase :**

Elle à pour but de mettre en évidence l'enzyme citrate perméase chez certaines souches bactériennes, cette recherche est faite en inoculant le germe à étudier dans du lait écrémé autoclave additionné de citrate de sodium stérilisé et gélosé grâce à un apport de gélose blanche elle-même stérilisée préalablement. L'incubation est faite à 30°C pendant 3 à 5 jours.

La décomposition du citrate se manifeste par la production de gaz dans la masse du milieu ce qui à pour effet l'apparition de fissures au niveau de la gélose (Guiraud & Galzey, 1980).

**2-2-2-5-1' épreuve de l'arginine dihydrolase (ADH).**

La mise en évidence de cette enzyme est très intéressante pour la caractérisation des bactéries lactique, cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline a partir de l'arginine pour cela on ensemence avec la germe à tester un tube de milieu de base sans arginine et un tube additionne d'arginine, on recouvra la surface du milieu de 1 ml d'huile de paraffine stérile. Les résultats sont interprétés après 3 jours d'incubation. Le témoin doit avoir une coloration jaune elle traduit la fermentation du glucose, l'arginine est transformée quand le milieu a une coloration violette. Elle ne l'est pas s'il est jaune comme le témoin (leveau et bouix, 1980).

**2.2.2.7. Fermentation des hydrates de carbone :**

Il s'agit d'apprécier l'aptitude des souches à métaboliser divers composés, en particulier des sucres (Arabinose, Amylose, fructose, Galactose, Glucose, Glycérol, Lactose, Maltose, Mannitol, Mannose, Mélibiose, Raffinose, Rhamnose, Ribose, Saccharose, Sorbitol, Tréhalose et Xylose ) (Larpent, 1993). La faculté d'une bactérie à utiliser comme source d'énergie la dégradation d'un glucide s'accompagne généralement de la production d'acide qui

conduit à l'abaissement du pH dans le milieu. (Leveau *et al*, 1991).

La technique consiste à ensemercer les souches testées dans des tubes correspondants aux différents sucres et renferment comme indicateur de pH le rouge de phénol, par la suite on incube aux températures appropriées pendant 2 à 3 jours.

Le virage du milieu du rouge au jaune indique l'acidification du milieu donc dégradation du sucre (Carbonnelle *et al*, 1990).

### **2.3. Méthodes de Détection de l'activité antagoniste des isolats:**

Méthodes de détection de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques ont été utilisées. Leur principe est basé sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans des milieux de culture semi-solides pour inhiber la croissance d'un micro-organisme indicateur sensible.

#### **2.3.2. La méthode de double couche :**

Le prélèvement est effectué sur toute l'épaisseur du fromage (il n'est pas spécifique au cœur ou à la croûte). La préparation des homogénats et l'isolement des bactéries lactiques sont réalisés de la manière décrite précédemment. Toutefois, l'incubation ne dure que 18 à 24 h (obtention de colonies de petite taille).

Les bactéries isolées sont testées pour leur activité antagoniste vis-à-vis de *L. monocytogenes* 3a par la méthode de détection directe de Barefoot et Klaenhammer (1983), avec utilisation d'une double couche constituée de deux géloses différentes (MRS ou M17 avec LA (Lactobacilli Agar)) au lieu de deux couches de MES. Les boîtes de MES ou M17 présentant des colonies bien isolées (jusqu'à 100 unités) sont recouvertes de 10 ml d'une gélose de LA préalablement préparée de la façon suivante : la gélose fondue est refroidie à 45°C, puis ensemencée d'une culture de *L. monocytogenes* 3a de 18 h dans un bouillon TSL à 37°C (dilution 1/100) de façon à obtenir environ 10<sup>6</sup> UFC/ml. Après solidification, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 h à 37°C.

Les colonies entourées d'une zone claire dans la nappe de culture de *L. monocytogenes* 3a sont purifiées par des repiquages successifs sur une gélose MRS titi M I V, incubation à 30°C pendant 48 à 72h.

#### **2.3.1. Méthode de diffusion en puits:**

Les souches purifiées sont testées pour la production de substances antimicrobiennes suivant la méthode des puits (méthode indirecte) de Tagg et McGiven (1971). Dix ml du milieu Mueller-Hinton Agar (MHA) est coulé dans des boîtes de Pétri vides. Sur cette couche basale, on dépose des petits cylindres (moules en acier inoxydable) d'un diamètre de 6 mm. Un volume de 6 ml d'un milieu approprié (contenant 0.75 % d'agar, et maintenu en sur-fusion

à 45 °C) est, d'abord,ensemencé par 100 µl d'une culture fraîche de la souche indicatrice *Listeria monocytogène3a*, puis coulé, délicatement pour ne pas renverser les moules, sur la couche basale de MHA.

Après solidification, les moules cylindriques sont enlevés en laissant à leur emplacements des puits de 6 mm de diamètre. Un bouillon MRS est inoculé par la souche à tester au  $1/10^6$  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 incube pendant 18 h à 37°C la culture obtenue est centrifugée à 2700 g pendant 10 min et à 4°C. Puis filtré (filtre d'ester mixte de cellulose ,0.4511m, Costar). Le filtrat obtenu constitue l'extrait de culture.

Ces puits sont remplis par environ 40 µl des surnageant déjà préparés. La diffusion des agents antimicrobiens dans le milieu gélosé est améliorée par une pré-incubation des boîtes à 4 °C pendant 2 h.

Après 10 à 16 h d'incubation à la température optimale de la souche indicatrice, l'activité antimicrobienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits.

#### **2.4. Mesure de l'activité antibactérienne de l'extrait de culture :**

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

#### **2.5. Identification de la substance antibactérienne produite :**

##### **2.5.1. Hydrolyse enzymatique de la substance antibactérienne :**

Les extraite de culture des souches sélectionnées sont traités par différentes enzymes : Trypsine, a-chymotrypsine), pepsine, et catalase. Tous les échantillons sont ajustés à pH 7 par addition de NaOH 1M (Merck), filtrés (filtre d'ester mixte de cellulose, 0,45µm Costar) et incubés pendant 1h à 37°C lors du traitement par, la pepsine et la lipase et à 25°C lors du traitement par les autres enzymes les extraits de culture, traités sont ensuite testés par la méthode des puits, la sensibilité d'une substance antibactérienne à une enzyme donnée est appréciée en déterminant l'activité résiduelles par mesure du diamètre de zone d'inhibition (Wanda et Bonita, 1991).

##### **2.5.2. Spectre d'activité antibactérienne :**

La substance antibactérienne est testée pour son activité à l'égard de souches appartenant à différents genres de bactéries Gram+ et de bactéries Gram- (tableau IX) par la méthode des puits détaillée précédemment. La température d'incubation est de 37°C pour toutes les bactéries (Stevens et al, 1991).

**Résultats et discussion :**

**1. Isolement et identification des souches lactiques :**

Nous avons réussi à isolé et purifié 13 souches de bactéries lactiques appartenant à différents genres : lactobacilles, lactocoques.

**1.1. Examen macroscopiques :**

L'examen macroscopique des colonies isolées sur le M17 a révélé que ces colonies sont en générale rondes, lenticulaire à contours réguliers, de coloration blanche crème, de petite taille. Celui des colonies isolées sur le milieu MRS, sont généralement de contours réguliers, rondes, Parfois lenticulaires de coloration blanches, crème, transparentes, parfois jaunâtres, de taille Moyenne ou grandes.

**1.2. Examen microscopiques :**

L'examen microscopique des bactéries provenant de M 17 des coccis isolées montre des formes en diplocoques, en chaînettes plus au moins longues ou sous forme des amas de cellules .ces dernières ont en général une forme sphérique, parfois ovoïde. De diamètre variable.

L'observation microscopique des bactéries provenant de MRS révèle la présence de cellules en forme de bacilles bâtonnets plus au mois courtes (coccobacilles) isolées, en paire et ne chaînette plus au moins longues

**1.3. Identification des souches :**

Les isolats ont été rattachés à deux groupes distribués comme suit :  
Lactobacilles (77%) lactocoques (23%) et rapportés dans le (tableaux09).

**Tableau 09 :** caractères morphologiques et physiologiques des genres présumés des bactéries lactiques isolées :

Groupes (nombre d'isolats)	Type de Fermentation	Micro morphologie	Macro morphologie
Lactobacillus(10)	Homo/hétéro fermentaire	Batonnets longs enrroulés, Batonnets prtits en chainettes ou filamenteux ,isolés ou en chainettes	Petites Colonies blanches à centre marron et bombé
Lactococcus (3)	homofermentaire	Coccis,diplocoques et en chainettes	Colonies blanches,rondes lenticulaires

### 1.3.1. Espèces du genre *Lactobacillus* :

Les isolats de *Lactobacillus* ont été classés dans six espèces. Normalement, ils ont été différenciés par le type de fermentation des carbohydrates .mais le profil de la fermentation des sucres de ces isolats a été comparés avec celles de souches de référence de la clef d'identification établit par Larpent (1993). Cependant, les résultats des testes préliminaires des lactobacilles sont regroupés dans le tableau (10).

Ces résultats montrent clairement que nos souches isolées répondent aux caractéristiques des bactéries lactiques qui sont gram+, immobiles, catalase", Cytochrome-Oxydase".

Les résultats des tests d'identifications basés sur les caractères physiologiques et biochimiques tableau (03compares aux données bibliographiques de Deroissart (1994), Larpent (1991) nous ont permis de repartir les souches prés identifiés dans les deux sous genres : *Streptobacterium* .*thermobacterium*, leur répartition par genre est la suivante :

#### 1.3.1.1. Les lactobacilles thermophiles et homofermentaires strictes

##### **Thermobacterium) :**

Les isolats de ce groupe fermentent les hexoses en produisant exclusivement du lactate, mais ne fermentent pas les pentoses .les espèces associés sont :

Une (1) souche isolée se rapproche de l'espèce *Lactobacillus acidophilus* par les propriétés suivantes : elle est homofermentaires, ne possède pas une ADH capable de se cultiver à 45°C mais pas à 15°C. L'analyse de leur profil glucidique a montré que cette souche est capable de fermenter le glucose, le saccharose, le mélibiose, le fructose et le lactose. Par contre elle est incapable de fermenter le sorbitol, le ribose, le rhamnose et le mannitol .utilisant la clef d'identification établie par Larpent (1993) pour comparer cette souche avec la souche de référence, il ressort que la différence persiste au niveau de la capacité de la souche testée à fermenter le mélibiose. Pour ce caractère, notre rapprochement est justifié si nous nous referons aux données de Larpent (1991) et Kandler et Weiss (1986) qui ont souligné que l'espèce *Lactobacillus acidophilus* donne une réponse variable concernant la fermentation du mélibiose.

#### 1.3.1.2. Les lactobacilles mésophiles et homofermentaires facultatif

##### **(Streptobacterium) :**

Les isolats de ce groupe fermentent les hexoses en produisant exclusivement du lactate et ne produisent pas du gaz à partir du glucose .ils peuvent fermenter les pentoses .quatre espèces appartenant à ce groupe ont été isolées :

Trois (3) souches isolées ont été rapprochées de l'espèce de *Lactobacillus plantarum* par les caractéristiques suivantes : elles sont homofermentaires, se cultivent à 15°C mais pas à

45°C ne possède pas une ADH, fermente le glucose, le saccharose, le raffinose, le galactose, le fructose, le tréhalose et le sorbitol. Par contre les trois souches appartenant à cette espèce se différencient de l'espèce type par les caractères dits « variables », il s'agit par exemple de la capacité des souches à fermenter l'arabinose et l'xylose les souches étudiées ont données des réactions positives avec les deux sucres cité précédemment.

A ce propos, Teuber (1992) a montré qu'entre 61.89% des souches appartenant à l'espèce *Lactobacillus plantarum* sont capable de fermenter les deux sucres en question.

**Deux (2) souches** isolées ont été rapprochées de l'espèce *Lactobacillus casei* et plus particulièrement à la sous espèce *Lactobacillus casei subsp.casei* par les mêmes caractéristiques physiologiques que celles de l'espèce *Lactobacillus plantarum*. cependant, l'analyse de leurs profils glucidiques montre que ces souches se différent de l'espèce type par leur pouvoir fermentaire sur le saccharose, le fructose, le glucose et le tréhalose.

Concernant le premier sucre, les résultats concordent avec les données de Kandler et Weiss (1986), Leveau et al (1991), qui ont remarqués qu'entre 61-89% des souches apparentées avec l'espèce *Lactobacillus casei* sont capables de fermenter le saccharose. cependant l'incapacité des souches isolées vis-à-vis de la fermentation de la maltose pourrait être justifié par les données de Larpent (1991), qui a cité la variabilité de l'espèce *Lactobacillus casei subsp.casei* envers la dégradation du maltose.

**Deux (02) souches** isolées ont été rapprochées de l'espèce *Lactobacillus bavaricus* par les caractéristiques suivantes : elles sont homofermentaires, se cultivent à 15°C mais pas à 45°C, ne possèdent pas une-ADH, hydrolyse l'esculine, fermentent le glucose, le maltose, le galactose, le fructose, le ribose et le lactose. Concernant la deuxième et la troisième souche ont été rapprochées de l'espèce *Lactobacillus bavaricus* avec un degré de parenté de 95%, la variation a concerné la capacité de ces souches à fermenter le raffinose.

**Deux (02) souches** isolées se rapprochent de l'espèce *Lactobacillus curvatus* par l'analyse des résultats suivants : elle est homofermentaires, ne possède pas une ADH, hydrolyse l'esculine, capable de se cultiver à 15°C mais pas à 45°C. L'analyse de leur profil glucidique a montré que cette souche est capable de fermenter le glucose, le mannose, le maltose, le galactose et le fructose. Par contre ces souches sont incapables de dégrader le mélibiose, le raffinose et le rhamnose.

Concernant le lactose, Larpent (1991), Kandler et Weiss (1986), qui ont cités la variabilité de l'espèce *Lactobacillus curvatus* envers la dégradation du lactose. Pour le critère de l'halotolérance et la capacité de ces souches à croître à 6,5% de NaCl, notre rapprochement demeure inexplicable.

## Partie pratique : Résultats et discussion

**Tableau 10** : identification biochimique et physiologique des souches appartenant au genre *Lactobacillus*

Groupe	<i>Streptobacterium</i>									<i>Thermobacterium</i>
Espèce	<i>Lb. plantarum</i>			<i>Lb. casei</i>		<i>Lb. curvatus</i>		<i>Lb. bavaricus</i>		<i>Lb. acidophilus</i>
Nombre des souches	ST <sub>1</sub>	ST <sub>2</sub>	ST <sub>3</sub>	ST <sub>4</sub>	ST <sub>5</sub>	ST <sub>6</sub>	ST <sub>7</sub>	ST <sub>8</sub>	ST <sub>9</sub>	TH <sub>1</sub>
<b>Tests préliminaires:</b>										
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
La catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Le cytochrome oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La morphologie	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
<b>Tests physiologiques:</b>										
La croissance à 15 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
La croissance à 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
La croissance à 40 °C	±	±	±	+	+	±	±	±	±	+
La croissance à 45 °C	-	-	-	-	±	-	-	-	-	+
La production de CO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L'ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L'halotolérance à 2 % NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L'halotolérance à 4 % NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L'halotolérance à 6.5 % NaCl	-	±	-	±	-	±	+	+	+	-

**Partie pratique : Résultats et discussion**

**Suite du tableau (10)**

<b>Fermentation des sucres :</b>											
Arabinose	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	+
Amylose	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	nd	nd	nd	nd
fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	±	-	+	+	+	+	+	nd
Lactose	±	±	±	-	-	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	-
Mannitol	-	±	±	±	+	-	-	-	-	-	-
Mannose	±	±	+	+	+	±	±	+	+	+	-
Mélibiose	+	±	+	+	±	+	+	-	-	-	+
Raffinose	+	+	+	±	-	-	+	-	-	-	-
Rhamnose	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	±	±	+	+	+	±	+	+	-
Saccharose	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Tréhalose	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	±
Xylose	±	±	+	±	-	±	-	-	-	-	-

+: résultat positif, ±: résultat variable, -: résultat négatif, nd: résultat non définie, B : bacille

### 1.3.2. Espèces du genre *Lactococcus* :

Les résultats préliminaires et des caractères biochimiques et physiologiques des Streptocoques lactiques sont regroupés dans le tableau (11). Ces résultats montrent que les souches isolées répondent aux caractéristiques des bactéries lactiques qui sont gram+, immobiles, catalase-, Cytochrome-Oxydase-, Cependant, les tests spécifiques d'identification nous ont permis de regrouper les souches en espèces et sous espèces.

#### 1.3.2.1. *Lactococcus lactis subsp.lactis* :

**Deux (2) souches** ont été identifiées et attribués à l'espèce *Lactococcus lactis subsp.lactis* par les propriétés suivantes : toutes sont homoférmementaires, cultivées à 10°C mais pas à 45°C possèdent une ADH, hydrolyse l'esculine mais n'hydrolyse pas la gélatine ,elle sont capables de fermenter la mannose , le saccharose , le maltose , le xylose, le tréhalose et le lactose mais incapables de fermenter, le fructose , le raffinose ,l'arabinose , le mélibiose , le sorbitol et le mannitol.

Toute fois, nous avons constaté que ces deux souches appartenant à cette ont répondu à tous les tests caractérisent l'espèce .par contre se différencie de l'espèce type par au moins l'un des critères suivant : l'halotolérance à 6,5% de NaCl, leur capacité de fermenter le saccharose et/ou le xylose .pour le 1 er caractere, notre rapprochement est justifié si nous nous basons sur les données de Deroissart (1994) qui a suggère que certaines souches apparentées à l'espèce *Lactococcus lactis subsp.lactis* peuvent croître en présence de 6,5% de NaCl, cependant Leveau et al (1989) ont rapporté l'espèce en question ainsi que l'espèce *Lactococcus lactis subsp.cremoris* donnent une réponse variable selon les souches . Concernant la capacité de ces souches à métaboliser le saccharose, nos résultats ne se concordent pas avec les données de Leveau et al, (1989) ; Teuber (1992) qui ont souligné que l'espèce *Lactococcus lactis subsp.lactis* est incapable de dégrader le saccharose. En revanche, seul Larpent (1987) en se basant sur le mode de transport du saccharose chez l'espèce *Lactococcus lactis subsp.lactis*, a montré que le system inductible, et que le saccharose est transporté par un saccharose - PTP spécifiques, il a également noté que le system est inductible, et que la plupart des souches de *Lactococcus lactis subsp.lactis* sont incapables de métaboliser le saccharose. Enfin, le même auteur a suggéré un codage plasmidique de l'utilisation du saccharose et xylose.

#### 1.3.2.2. *Lactococcus lactis subsp.cremoris* :

**Une souche (1)** : D'après les résultats obtenus des différents tests tableau (11), effectués sur les souches isolées des Streptocoques lactiques nous avons pu identifier une souche appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis subsp.cremoris*.

Cette souche est homofermentaire, se cultivé 10°C mais pas à 45°C ne possède pas une

## Partie pratique : Résultats et discussion

ADH, non halotolérante à 6,5 % n'hydrolyse pas l'esculine ni la gélatine.

Toutefois, leur profil de dégradation des glucides montre qu'elles ont le pouvoir de fermenter le mannose, le saccharose, le maltose, le xylose, le tréhalose et lactose.

**Tableau11** : identification biochimique et physiologique des souches appartenant aux genres : *Lactococcus*.

Espèce	<i>Lc. lactis</i>		<i>Lc. cremoris</i>
	LCL 1	LCL 2	LCC <sub>1</sub>
<b>Tests préliminaires:</b>			
Gram	+	+	+
La catalase	-	-	-
Le cytochrome oxidase	-	-	-
La mobilité	-	-	-
Morphologie	C	C	C
<b>Tests physiologiques:</b>			
La croissance à 10 °C	+	+	+
La croissance à 37 °C	+	+	+
La croissance à 40 °C	+	±	-
La croissance à 45 °C	-	-	-
La production de CO <sub>2</sub>	-	-	-
L'ADH	+	+	-
La thermorésistance à 63°C pendant 30 mn	-	-	-

**Suite du tableau (11)**

La croissance sur lait de SHERMAN	+	+	+
La croissance à 2 % de NaCl	+	+	+
La croissance à 4 % de NaCl	-	-	-
La croissance à 6.5 % de NaCl	-	-	-
<b>Fermentation des sucres:</b>			
Arabinose	-	-	-
Amylose	nd	nd	nd
<u>fructose</u>	-	-	+
Galactose	±	+	+
<u>Glucose</u>	-	-	-
<u>Glycérol</u>	nd	nd	nd
Lactose	+	+	+
Maltose	+	+	-
Mannitol	-	-	±
<u>Mannose</u>	+	+	+
Mélibiose	-	-	-
Raffinose	-	-	-
<u>Rhamnose</u>	±	±	-
Ribose	±	+	-
Saccharose	+	+	-
<u>Sorbitol</u>	-	-	-
Tréhalose	+	+	-
Xylose	+	+	-

**1.4. Sélection de souches bactériennes productrices d'un facteur antimicrobien autre que les acides organique ou le peroxyde d'hydrogène :**

Dans le but d'éliminer la possibilité d'un antagonisme vis-à-vis les souches indicatrices par la production d'acides organiques, ce qui est le cas des bactéries lactiques en général, le surnageant d'une culture de 18 h à 37°C des souches isolées est ajusté à pH 6 (à ce pH la croissance de la majorité des souches indicatrices est optimale). L'extrait de culture (surnageant) neutralisé et filtré sur ester mixte de cellulose, 0,45 µm est alors testé par la méthode des puits déjà décrite. L'inhibition qui pourrait être due à la production de peroxyde d'hydrogène a été de même exclue par l'ajout de la catalase directement sur la colonie de la bactérie productrice (cas de double couches et méthodes des disques) ou bien additionnée au surnageant de la bactérie productrice.

## Partie pratique : Résultats et discussion

---

Sur un totale de 13 souches lactiques criblées pour la production des substances antimicrobiennes en employant la méthode de diffusion en puits, la méthode des disques et la méthode de double couche, 3 souches ont présenté une activité antagoniste dirigée contre *Listeria monocytogenes* 3a pour lesquelles l'inhibition des souches indicatrices est donc due à un facteur antibactérien autre qu'un acide organique ou de peroxyde d'hydrogène.

La sélection de souches bactériennes productrices d'un facteur antimicrobien dans l'extrait de culture (pH 6) et en présence de catalase a montrée que les 3 bactéries retenues sont identifiées comme suit :

*Lactobacillus plantarum* désignée ST<sub>2</sub>

*Lactobacillus acidophilus* désignée TH<sub>1</sub>

*Lactococcus lactis* Subsp.*lactis* désignée LCL<sub>2</sub>

L'activité antimicrobienne de l'extrait de culture des 3 souches productrices de substances antibactériennes disparaît cependant complètement en présence d'au moins 2 enzymes protéolytiques (Tableau 12) ce qui indique la présence d'une structure protéique dans la substance antibactérienne et exclut donc la présence d'eau oxygénée dont l'activité ne serait pas inhibée par de telles enzymes. L'absence d'eau oxygénée est confirmée par un test à la catalase négatif. Les substances antibactériennes produites sont donc, selon toute vraisemblance, des bactériocines ou des antibiotiques.

**Tableau 12: effets** des traitements enzymatiques sur les substances antibactériennes produites par les souches isolées (tests effectués avec *Listeria monocytogenes* 3a comme souche indicatrice).

Enzyme	Diamètre de zone d'inhibition (mm)		
	<i>Lactobacillus plantarum</i> ST <sub>2</sub>	<i>Lactobacillus acidophilu</i> TH <sub>1</sub>	<i>Lactococcus lactis</i> LCL <sub>2</sub>
Témoins	17	15	17
α-chymotrypsine	0	0	02
Pepsine	0	0	06
α-amylase	17	15	00
Catalase	17	12	16.5

**1.6. Identification des substances antibactériennes comme étant des bactériocines :**

Afin de vérifier s'il s'agit ou non de substances antibactériennes de type bactériocine, il convient d'abord de soulever le problème complexe de la définition de ces substances. En effet, les bactériocines, définies parmi les bactéries Gram- et les bactéries Gram+, représentent un groupe hétérogène de substances antibactériennes dont le poids moléculaire, les propriétés biochimiques, le spectre d'activité et le mode d'action peuvent être très différents.

A la suite de leurs travaux sur les colicines (bactériocines de bactéries Gram-), Tagg *et al.* (1976) citent 5 critères requis pour qu'une substance chimique soit dénommée bactériocine: la présence d'une partie biologiquement active de nature protéique, un spectre d'activité inhibitrice étroit et centré sur les espèces homologues, un mode d'action bactéricide, l'adsorption à des récepteurs spécifiques et la nature plasmidique des déterminants génétiques codant pour la production de la bactériocine et pour l'immunité à celle-ci. Des études ultérieures ont montré que parmi les bactériocines produites par des bactéries Gram+, et spécialement parmi celles produites par des bactéries lactiques, les exceptions à ces critères sont nombreuses.

En effet, la production de substances antibactériennes établies comme étant des bactériocines est déterminée dans de nombreux cas par des gènes situés sur le chromosome. C'est notamment le cas de la lactacine B (*Lb. acidophilus* N2) (Barefoot et Klaenhammer, 1983), de l'helvécine J (*Lb. helveticus* 481) (Joerger et Klaenhammer, 1986) et de la

lactacine F (*Lb. acidophilus* 11088) (Muriana et Klaenhammer, 1987). Aussi la condition de la détermination génétique par un plasmide n'est-elle plus retenue pour définir les bactériocines.

D'autre part, la majorité des bactériocines des bactéries lactiques s'adsorbent à des récepteurs non spécifiques, se trouvant aussi bien sur les bactéries sensibles que sur les bactéries résistantes (Desmazeaud, 1994, Bayoub *et al*, 2006). De plus, il a été montré que certaines bactériocines agissent sur des protoplastes ou des sphéroplastes (Andersson, 1986), ce qui montre que les sites de réception ne sont pas spécifiques.

Certaines bactériocines dont l'effet est bactéricide dans un milieu de culture de laboratoire peuvent montrer une action bactériostatique dans des milieux moins favorables à leur activité, comme c'est le cas dans les aliments (Pucci *et al*, 1988 ; Berry *et al*, 1990 ; Schillinger *et al*, 1991).

Par ailleurs, le spectre d'activité des bactériocines peut ne pas être restreint aux espèces proches taxonomiquement ou même occupantes la même niche écologique que la bactérie productrice. D'un point de vue pratique, le champ d'activité d'une bactériocine peut être plus ou moins large suivant les conditions du milieu et la concentration en substance active (Klaenhammer, 1993).

La nature protéique des bactériocines semble être le seul critère immuable. Cela est généralement démontré par l'inactivation de celles-ci par un traitement avec des protéases. Toutefois, la bactériocine peut prendre la forme d'un complexe hétérogène incluant des groupements lipidiques ou saccharidiques (Jimenez-Diaz *et al*, 1993) ou d'une combinaison de protéines ou peptides distincts (Nissen-Meyer *et al*, 1992).

En définitive, deux définitions sont actuellement admises :

1-selon Konisky (1982), les bactériocines ont une nature protéique et sont inactives vis-à-vis des bactéries qui les produisent (il ne s'agit donc pas de "substances suicides") ;

2-selon Klaenhammer (1988), les bactériocines ont une nature protéique, un spectre d'activité limité aux espèces taxonomiquement proches, ou occupant la même niche écologique, et un mode d'action bactéricide.

Il apparaît nécessaire de noter que la limite séparant les bactériocines et les peptides antibiotiques n'est pas très bien définie. Selon Reeves (1972), les antibiotiques, contrairement aux bactériocines, possèdent un spectre d'activité généralement large, et même lorsque celui-ci est relativement étroit, il ne montre pas cet aspect préférentiel, retrouvé chez les bactériocines, pour les souches taxonomiquement proches de la bactérie productrice. Cependant, comme cela a été mentionné, beaucoup de bactériocines récemment caractérisées,

spécialement parmi celles des bactéries lactiques, montrent des spectres d'activité qui ne sont pas toujours limités aux espèces proches (Quintavalla et al, 2002). Selon Montville et Kaiser (1993), les antibiotiques sont des métabolites secondaires, synthétisés par des réactions enzymatiques, qui n'ont pas de fonctions apparentes dans la croissance de l'organisme producteur. La plupart des peptides antibiotiques connus (gramicidine S, bacitracine A et polymyxine par exemple) répondent à cette définition. Par contre, la majorité des bactériocines caractérisées sont de "vraies protéines", c'est à dire qu'elles sont synthétisées par voie ribosomale (présence d'un gène correspondant à la séquence de la bactériocine) (Klaenhammer, 1993)

Au cours de cette partie de notre travail plusieurs tests concernant la nature chimique (étude de la sensibilité enzymatique), le spectre d'activité (sensibilité de différentes souches bactériennes) des substances antibactériennes produites par les 3 souches isolées seront réalisés. Leurs résultats devraient permettre de dire si ces substances satisfont à la définition la plus utilisée pour les bactériocines, celle donnée par Klaenhammer (1988).

## **2. Facteurs antibactériens produits par les lactobacilles :**

### **2.1. *Lactobacillus plantarum* ST<sub>2</sub> :**

#### **2.1.1. Sensibilité aux enzymes :**

La substance inhibitrice produite par *Lactobacillus plantarum* ST<sub>2</sub> est inactivée par toutes les enzymes protéolytiques testées: pepsine,  $\alpha$ -chymotrypsine, et Trypsine. Aucune zone d'inhibition n'est détectée après mise en présence de ces enzymes, sachant que l'extrait de culture initial produit une zone d'inhibition avec *Listeria monocytogenes* 3a de 17 mm de diamètre (Tableau 12). L'extrait de culture de *Lactobacillus plantarum* ST<sub>2</sub> contient donc une substance de nature protéique qui est à l'origine de l'effet anti- souches indicatrices observé.

#### **2.1.2. Spectre d'activité :**

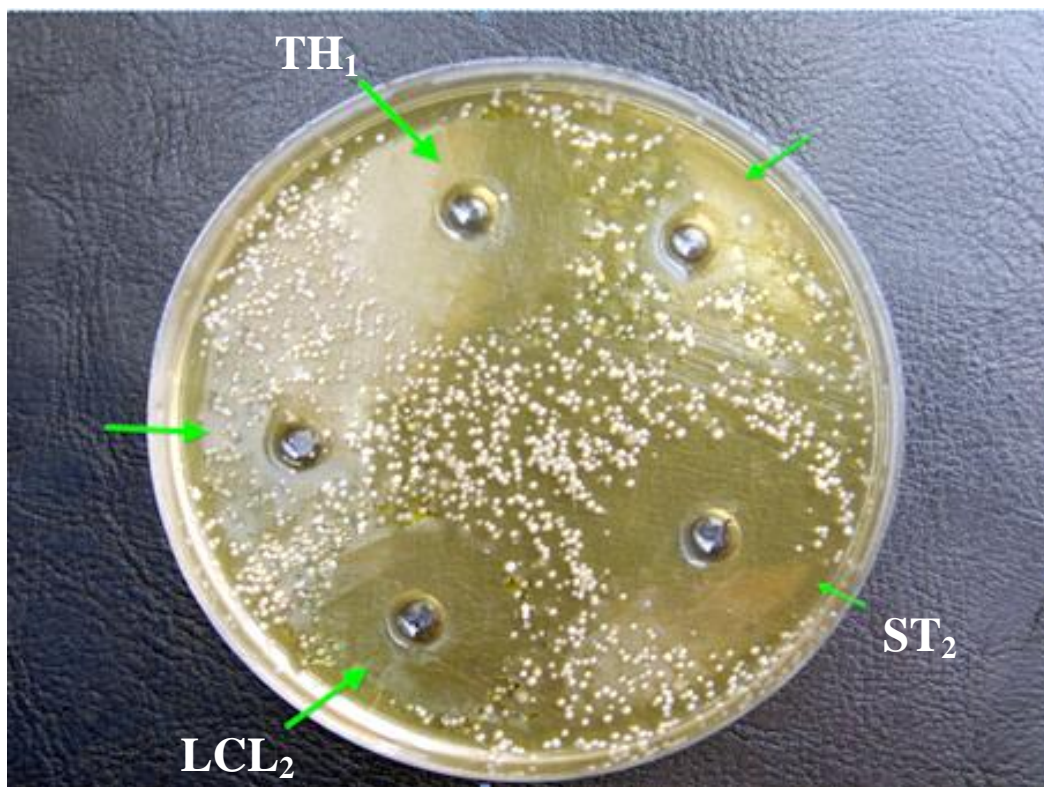
Selon Tagg et al. (1976), le spectre d'activité des bactériocines des bactéries Gram+, bien qu'il puisse être variable suivant les souches, ne concerne jamais les bactéries Gram-. Aussi, dans le but de déterminer le champ d'activité de la substance antibactérienne produite par *Lactobacillus plantarum* ST<sub>2</sub>, la sensibilité de différentes souches bactériennes à cette substance antibactérienne est évaluée. Les souches bactériennes testées font partie d'espèces et de genres différents ; les bactéries Gram+ et Gram- sont représentées par la méthode des puits (Tableau 13).

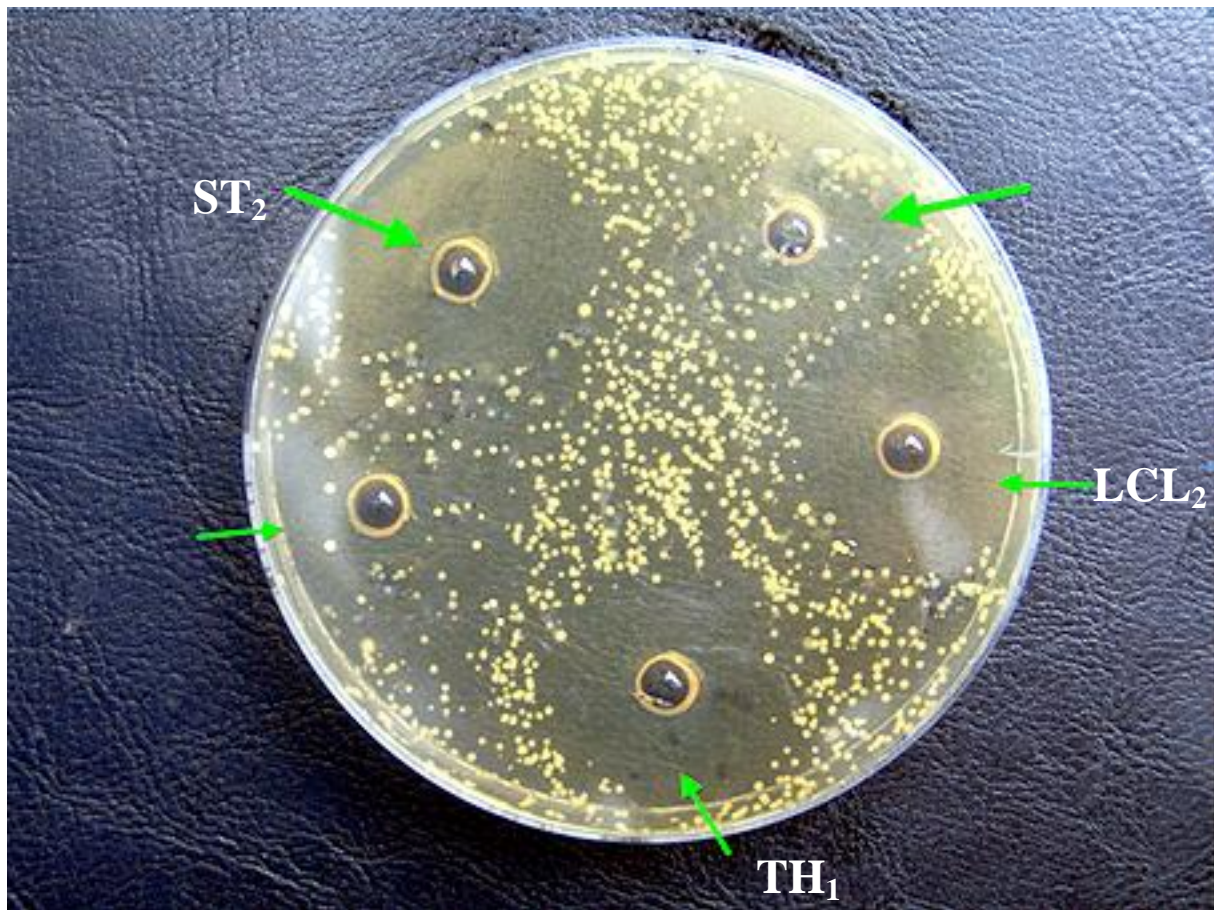
## Partie pratique : Résultats et discussion

**Remarque :** nous signalons que seule la méthode de diffusion en puits a été retenue comme méthode de référence pour expliquer les résultats de cette partie.

**Tableau13:** spectre d'activité antimicrobienne présente dans l'extrait de culture (pH 6) souches sélectionnées. (Méthode des puits).

Souches indicatrices	Diamètre de zone d'inhibition (mm)		
	ST <sub>2</sub>	TH <sub>1</sub>	LCL <sub>2</sub>
<i>Lactobacillus brevis</i> LB05	10	01	12
<i>Lactobacillus plantarum</i> JB20	00	11	04
<i>Bacillus cereus</i> ATCC14578	12.5	10	07
<i>Staphylococcus aureus</i> TCC25293	17	15	17
<i>Escherichia coli</i> ATCC25422	00	00	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	00	00	00





Toutes les bactéries Gram+ (*Lactobacillus*, *Bacillus* et *Staphylococcus*) sont sensibles à l'action du facteur antibactérien produit par *Lactobacillus plantarum* ST<sub>2</sub> sauf *Lactobacillus plantarum* JB20 avec des diamètres de zone d'inhibition variés de 10 à 17 mm. (Tableau 16).

L'inhibition des souches indicatrices Gram+ par des bactériocines de lactobacilles est bien connue : des bactériocines telles que la curvacine A produite par *Lb. curvatus* (Tichaczek *et al*, 1992) ou la sakacine A et la sakacine M produites par *Lb. sake* (Nettles et Barefoot, 1993) montrent une action inhibitrice vis-à-vis des souches indicatrices Gram+. Cette propriété serait liée, selon Schillinger et Lüke (1989), à la position taxonomique des souches indicatrices, proche de celle des lactobacilles (Ludwig *et al*, 1984 ; Ruhland et Fiedler, 1987 ; Stackebrandt et Teuber, 1988).

Il est à signaler que, les 2 genres de bactéries Gram- testées (*Pseudomonas* et *Escherichia*) ne sont pas affectées par la substance inhibitrice produite par *Lactobacillus plantarum* ST<sub>2</sub>, ce qui est une caractéristique des bactériocines des bactéries Gram+ en général, et lactiques en particulier. La résistance des bactéries Gram- 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.

La largeur du spectre d'activité des bactériocines de lactobacilles peut être assez variable. Certaines bactériocines en effet ont des spectres d'activité pouvant être restreints à une ou deux espèces du genre *Lactobacillus*, ce qui est le cas de l'helvéticine J (*Lb. helveticus* 481) et de la lactacine B (*Lb. acidophilus* N2) (Barefoot et Klaenhammer, 1983 ; Joerger et Klaenhammer, 1986). D'autres bactériocines de lactobacilles possèdent un champ d'activité pouvant regrouper n'importe quel genre de bactérie Gram+ : ce sont par exemple les plantaricines C19, A et B (*Lb. plantarum* C19, C-11 et NCDO1103) (Atrih *et al.*, 1993 ; Nettles et Barefoot, 1993), la curvaticine A (*Lb. curvatus* LTH1174) (Sudirman *et al.*, 1993) ou la lacidine A (*Lb. acidophilus* OSU133) (Liao *et al.*, 1993). Le facteur antibactérien produit par *Lactobacillus plantarum* ST<sub>2</sub> possède un spectre d'activité qui le placerait dans cette deuxième catégorie.

### **2.2. *Lactobacillus acidophilus* TH<sub>1</sub> :**

#### **2.2.1. Sensibilité aux enzymes :**

Le facteur antimicrobien contenu dans l'extrait de culture de *Lactobacillus acidophilus* TH<sub>1</sub> engendre une zone d'inhibition de 15 mm de diamètre à l'encontre de *Listeria monocytogenes* 3a. Aucune activité n'est détectée une fois que la substance antibactérienne est incubée en présence d'une protéase. (Tableau 12). Le facteur antibactérien produit est donc de nature protéique.

#### **2.2.2. Spectre d'activité :**

La bactériocine produite par la souche *Lactobacillus acidophilus* TH<sub>1</sub> possède un large spectre d'activité, qui inclut notamment les genres : *Staphylococcus*, *Lactobacillus* et *Bacillus* avec des diamètres de zone d'inhibition variés entre 1 et 15 mm. L'inhibition des souches indicatrices Gram+ (lactobacilles) par des bactériocines de lactobacilles est bien connue, ce qui concorde avec la définition des bactériocines qui sont actives essentiellement contre les bactéries très proches de l'organisme producteur.

Cependant, aucune zone d'inhibition n'a été observée dans le cas des souches à Gram- (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). La résistance des bactéries Gram- à l'encontre de bactériocines de lactobacilles s'explique par les mêmes raisons que celles avancées pour *Lactobacillus plantarum* ST<sub>2</sub>.

### **3. Facteurs inhibiteurs produits par les lactocoques :**

### 3.1. *Lactococcus lactis* LCL<sub>2</sub> :

#### 3.1.1. Sensibilité aux enzymes :

L'extrait de culture de *Lactococcus lactis* LCL<sub>2</sub> est sensible à l' $\alpha$ -chymotrypsine, Pepsine et Trypsine mais l'inactivation n'est pas totale. La substance antibactérienne produite est donc de nature protéique.

#### 3.1.2. Spectre d'activité :

La substance antibactérienne produite par *Lactococcus lactis* LCL<sub>2</sub> possède un spectre d'activité large par rapport les souches indicatrices testées, avec des zones d'inhibition allant de 4 à 17 mm de diamètre (Tableau 13). Le facteur antimicrobien produit par cette souche a montré une inhibition contre les bactéries Gram+ y compris les souches lactiques et non lactiques (*Lactobacillus*, *Bacillus* et *Staphylococcus*) avec des profils différents d'inhibition, Cela a déjà été constaté pour plusieurs bactériocines, comme la nisine (*Lc. lactis* ssp. *lactis* 11454) (Benkerroum et Sandine, 1988) ,cette propriété serait liée, selon Schillinger et Lüke (1989), à la position taxonomique des souches indicatrices, proche de celle des *lactococcus* (Ludwig *et al.*, 1984 ; Ruhland et Fiedler, 1987 ; Stackebrandt et Teuber, 1988) .

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.* (1994c), 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.*, 1994c).

D'autre part, les bactéries gram-négatives testées (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) n'ont pas été touchées par la substance antibactérienne, cette résistance peut être justifiée par la nature particulière de l'enveloppe cellulaire.

En effet, Bhunia *et al.* (1991), montrent que 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

## **Partie pratique : Résultats et discussion**

---

bactériocines à traverser cette barrière est due à leur poids moléculaire et/ou à leur propriétés hydrophobes (Nikaido et Vaara, 1985 ; Schved *et al*, 1994a).

## **Conclusion générale :**

Les études faites sur les différentes bactériocines depuis une vingtaine d'années ont permis d'acquérir beaucoup de connaissances sur les propriétés et les différents modes d'action des bactériocines. À ce jour, la nisine est la seule à posséder le statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Ce statut fait qu'elle peut être ajoutée comme additif alimentaire dans plus d'une cinquantaine de pays (Sahl et Bierbaum, 1998). D'autres, comme la lacticine 3 147, visent aussi cet usage. De plus, l'usage de certaines bactériocines comme agent thérapeutique a même été soulevé.

Dans notre travail, nous avons d'abord isolé des bactéries lactiques à partir de fromage traditionnel (jben) de la région de Khenchela. Ces bactéries une fois isolées ont fait l'objet d'étude approfondi pour bien les identifier et les caractériser.

Les tests d'identifications aux quels l'ensemble des souches isolées étaient soumises ont permis de cribler 13 souches lactiques appartenant aux genres de *Lactobacillus* et Streptocoques lactiques.

La réalisation de l'isolement et de l'identification des souches lactiques et leurs caractérisations sur le plan technologique a attiré notre attention sur la possibilité d'exploiter les activités antimicrobiennes dans la bioconservation des produits alimentaires.

La recherche des activités antimicrobienne chez les bactéries lactique isolées nous à permis de constater que sur un total de 13 souches lactiques, seulement 3 souches présentent le pouvoir de produire des bactériocines dirigées contre *Listeria monocytogenes* 3a.

Les substances antimicrobiennes produites par les souches bactériennes isolées du fromage traditionnel (jben) répondent aux critères retenus par Klaenhammer (1988) et peuvent donc être considérées comme des bactériocines. De plus, il a été montré (tableau 5) que les souches productrices sont résistantes à leurs propres substances inhibitrices. Les

substances étudiées satisfont donc également à la définition des bactériocines donnée par Konisky (1982).

Suivant leur sensibilité aux différents traitements enzymatiques (tableau 4), les bactériocines étudiées sensibles uniquement aux protéases testées et donc à structure protéique probablement homogène (cas des bactériocines produites par les 3 souches).

Lors de la caractérisation des bactériocines, les spectres d'activité sont similaires dont la grande majorité de ces substances antimicrobiennes inhibent les différentes bactéries Gram+ testées (possèdent un large spectre d'activité). Il est également noté que la sensibilité d'une souche dépend du genre et de l'espèce. Cette sensibilité est due aux caractéristiques des souches (présence ou absence de sites récepteurs ou d'immunoprotéines) et donc aux niveaux de lésions occasionnées par le facteur inhibiteur (Kalchayanand *et al.*, 1992).

Les bactériocines connues (par exemple la nisine) n'agissant pas toujours sur les espèces taxonomiquement proches, des classifications des bactériocines suivant leurs spectres d'activité sont apparues nécessaires. Klaenhammer (1988) classe les bactériocines des bactéries lactiques en deux groupes : des bactériocines à spectre d'activité classique inhibant les espèces proches ou occupant la même niche écologique et des bactériocines à spectre d'activité englobant une large gamme de bactéries Gram+. Cette classification a été développée par Muriana (1993) qui divise les bactériocines des bactéries lactiques en 4 groupes : des bactériocines inhibant uniquement les espèces du même genre (ex : helvéticine J (Joerger et Klaenhammer, 1986), diplococcine (Nettles et Barefoot, 1993)) ; des bactériocines montrant un spectre d'activité visant prioritairement les bactéries lactiques (ex : brévicine 37 (Rammelsberg et Radler, 1990), lactocine S (Maertvedt et Nes, 1990)) ; des bactériocines à spectre d'activité visant les bactéries Gram+, même celles ne faisant pas partie des bactéries lactiques (ex : pédiocine AcH (Bhunia *et al.* (1988), nisine (Nettles et Barefoot, 1993)), et enfin des bactériocines à spectre d'activité pouvant inclure des bactéries Gram-. L'existence de

cette dernière catégorie est pourtant très contestée car les inhibitions qui sont parfois observées sont dues soit à un ensemble de facteurs agissant en synergie (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acides organiques,...) (Desmazeaud, 1994), soit à la combinaison de l'effet des bactériocines avec un traitement chimique (agents chélateurs) (Stevens *et al.*, 1991) ou physique (congélation, chauffage) (Kalchayanand *et al.*, 1992), ce qui facilite leur passage à travers la membrane externe. De plus, l'inhibition des bactéries Gram- n'a jamais été démontrée dans le cas des bactériocines purifiées des bactéries lactiques (Klaenhammer, 1988).

Les bactériocines produites par les 3 bactéries lactiques isolées (*Lactobacillus plantarum* ST<sub>2</sub>, *Lactobacillus acidophilus* TH<sub>1</sub>, et *Lactococcus lactis Subsp.lactis* LCL<sub>2</sub>) pourraient être classées dans la deuxième catégorie selon la classification de Klaenhammer (1988) et dans la troisième catégorie selon la classification de Muriana (1993).

La nomenclature des bactériocines n'obéissant pas à des règles bien établies (Tagg *et al.*, 1976), selon les résultats des tests de caractérisation des substances antimicrobiennes isolées, il a été décidé de désigner les bactériocines produites par les 3 souches isolées de la façon suivante:

- ✓ -plantaricine ST<sub>2</sub> pour la bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* ST<sub>2</sub>
- ✓ -acidocine TH<sub>1</sub> pour la bactériocine produite par *Lactobacillus acidophilus* TH<sub>1</sub>
- ✓ -lactococcine LCL<sub>2</sub> pour la bactériocine produite par *Lactococcus lactis Subsp.lactis* LCL<sub>2</sub>.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abelyan, V. A. et Abelyan, L.A. (1997).  
Production of immobilized tells of sporo lactobacillus inulus in a  
continously filling fermenter.  
AppL Biochem. Microbial., 33: 205-207.
- Accolas, J.P., Hemme. D., Desmazeaud, J.M., Vassal, L., Bouillanne, C.  
et Monique, V. (1980).  
Les levains lactiques thermophiles, propriétés et comportement en  
technologie laitière. Le lait., 60: 487-524.
- Andersen, D.A., Geis, A. Teuber, M. (1984).  
Plasmidmuster milchwirtschaftlich genutzter starterkulturen.  
Milchwissenschaft., 39: 140-143
- Anonyme, (1992).  
Utilisation des ferments en laiterie.  
Centre d'enseignement laitier par correspondance., E.N.I.L.I.A., pp.1-12.
- Axelsson, L. T. (1992).  
Lactic acid bacteria: classification and physiology .In-Lactic acid bacteria.  
( A. Salimonen,&V.Wright, éd.)  
New york, Baset. Hong kong , pp: 01-14.
- Barefoot, S.F. et Klaenhammer, T.R. (1983).  
Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by Lactobacillus  
Acidophilus.  
AppL Environ. Microbiol., 45: 1808-1815.
- Benthin, S. et Villadsen, J. (1995).  
Different inhibition of Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus by D-and  
L-lactic acid: effects on log phase, growth rate and cell yield.  
J. AppL Bacteriol., 87: 647-654
- Carbonnelle, B., Denis, F., Mannonier, A., Binon, G et Vargiver, K.(1990).  
Bactériologie médicale.  
Techniques visuelles., pp.23.
- Cavin, J.F., Schmitt, P., Arias, A., Lin, J., Divie, C. ( 1988) Plasmid profile in  
leuconostoc species.  
Microbiologie -Aliments-Nutrition., 6: 55-62.
- Chamba, J. F., Duong, C., Fazel, A & Prost, F. (1994).  
Sélection des bactéries lactiques. In-Bactéries lactiques: aspects  
fondamentaux et technologiques. (H. Deroisart, et E. M. Luquet, éd.).  
Technique & Documentation, Lorica, Paris., 01: 499-518.
- Champagne, C.P. (1998).  
Production de ferments lactiques dans l'industrie laitière.  
La Fondation des Gouverneurs et Edisem (ed), Sainte-Hyacinthe, Canada.

Biochemie., 70 : 303-315

- Choisy, C., Gueguen, M., Lenoir, J., Schmidt, J. L. et Tourneur, C.  
(1987) Les phénomènes microbiens. In-le fromage, 2<sup>nd</sup>. éd. (A. Eck, éd.),  
Technique & Documentation, Lavoisier, France, pp. 259-295
- Davies, F.L., Underwood, H.M., Gasson, M.J. (1981).  
The value of plasmide profiles for strain identification in lactic Streptococci  
and the relationship between Streptococcus lactic 712 ML3, and C2.  
J.Appl. Bacteriol., 51: 325-545.
- Daeschel, M. A., Anderson, Rm.E. et Fleming, H.P. (1987).  
Microbiai ecology of fermented plant materials. FEMS Microbiol.,  
41: 84-89.
- Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C. et Ganssens, D. (1994).  
Caractéristiques générales des bactéries lactiques, p. 25-116 in.  
De Roissart, H et Luket, F.M. (cd.), Bactéries lactiques, vol., 1.  
Lorica. Uriage.
- Delves-Broughton, J. (1990).  
Nisin and its uses as a food preservative. Food. Technoiogy.,  
44(11): 100-112, 117.
- Deroissart, H.B. (1986).  
Les bactéries lactiques. In-Laits et produits laitiers, Vol. 3. (F. M. Luquet ,  
éd.). Technique et documentation Lavoisier, Paris, pp. 343-407.
- Desmazeaud, M & Adda, M. (1989).  
La maîtrise des saveurs. In-Microbiologie alimentaires: les fermentations  
alimentaires, Vol. 2. (E. M. Bourgeois. et J. P. Larpent,éd..)  
Technique & Documentation, Lavoisier, Paris, pp. 265-279.
- Desmazeaud, M (1992).  
Les bactéries lactiques./n-Les groupes microbiens d'intérêt laitier  
(Hermier, J., Lenoir, J & Weber, F, eds.).  
C.E.P.I.L. Technique & Documentation. Lavoisier, pp.9-60.
- Desmazeaud, M. (1994).  
Les bactériocines des bactéries lactiques et leur utilisation dans l'industrie  
laitière. Revue Med, Vet., 145(10): 711-720.
- Desmazeaud, M. (1996).  
Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine: Utilisation et innocuité.  
Cahiers.. Agricultures, 5:331-343.
- De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (1994).  
Nisin, a lantibiotic produced by Lactococcus lactis subsp lactis:  
properties, biosynthesis and applications. In: de Vuyst and Vandamme,  
Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Blackie Academic and

- professional, London: 151-221.
- Ennahar, S., Sonomoto, K., Ishizaki, A. (1999).  
Class II a bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation.  
J. Biosci. Bioeng., 87: 705-716.
- Ennahar, S., Deschamps. N. et Richard. J. (2000). Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins.  
Curr-. Microbiol., 41(1): 1 -4.
- Farrow, J.A.E. et Collins, M.D. (1982)  
Int.J. Syst. Bacteriol. 38: 116.
- FIL-Norme, (1991).  
Yaourt, identification des micro-organismes caractéristiques:  
*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Sterptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Revue., (46): pp.1-4.
- Fimland. G., eijnsink, V.G., Nissen- Meyer, J. (2002). Comparative studies of Immunity proteins of pediocin- like bacteriocins.  
Microbiology., 148: 3661-3670.
- Fujita, Y., Okarnoto, T., [rie, R. (1984).  
Plasmide distribution in lactic streptococci.  
Agr. Boit Chers., 47: 1895-1898.
- Garrity, G. M. et Holt, J. G. (2001).  
Taxonomic outline of the Archea and bacteria p. 155-166. In Bonne, .D.R. et Castenholz, R.W. (ed.). *Bergey manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>ème</sup> ed, vol.1 (The Archea and the deeply branching and phototrophic Bacteria). Springer-Verlage, new York.
- Gilliland, S.E. (1985).  
Bacterial starter cultures for foods. CRC Press, boca raton, Florida.
- Gratia, A. (1925).  
Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. C. R. Seances Soc. Biol. Fil. 93: 1040-1041.
- Guiraud, J. et Galzey. P. (1980).  
Analyse micro biologique dans les industries alimentaires. Ed. Lusine nouvelle, Paris, 236p.
- Hamada, S. et Ooshima, T. (1975).  
Inhibitory spectrum of a bacteriocin-like substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*.  
I. Dent. Res., 54: 140- 145.

- Hamon, Y. (1964).  
Les bactériocines Ann. Inst. Pasteur. 107(5): 18.
- Hécharde, Y. et Sahl, H.G. (2002).  
Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria.  
Biochimie., 84: 545-557.
- Hemme, D. et Desnazeaud. M. (1993).  
Les levains lactiques et levains non lactiques: utilisation et perspectives. In-Biologie de la lactation, (J. Martinet et L. M. Houdebine, éd.).  
INRA, pp: 535-555.
- Holt J. G., Krieg, N. R. Sneath, P. H. A., Stanley, J.T. et Williams, S.T. (1994).  
Group 17, Gram-positive cocci. In-Bergey's manual of determinative bacteriology, Vol.1 ( P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt, éd.), Williams et Wilkins. Baltimore, pp. 527-557
- Kalchayanand, N., Hanlin, MB, et Ray, B(1992).  
Sublethal injury makes gram-negative and resistant gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin.  
Lett.appl. microbil.15 :239-243.
- Kandler, O. et Weiss, N. (1986).  
Regular, nonsporing Gram-positive rods bacteria. In-bergey's manual of systematic bacteriology, Vol.2. (P.H. A. Sneath, Mair, N., Scharpe, M. E., Holt. M. E., éd.). Williams. & Wilkins, Baltimore, pp.1208-1260.
- Kanwar, S. S., Chadha, B.S., Tewari, H. K., et Sharma, V. K. (1995).  
Continuous production of lactic acid from molasses by free and immobilized *Sporolactobacillus cellulosolvens*.  
World J. Microbiol. Biotechnol. 11: 687-688.
- Klaenhammer, T.R., McKay, L.L. et Baldwin, K.A. (1978).  
Improved lysis of group N streptococci for isolation and rapid characterisation of plasmid desoxyribonucleic acid.  
Appt. Environ, Microbiol., (35) :592-600.
- Klaenhammer, T. R. (1988).  
Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie., 70: 337-349.
- Klaenhammer, T.R. (1993).  
Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.  
FEAdS Microbiol. Rev., 12: 39-86.
- Klein, G., A. Pack, C. Bonapart, et G.Reuter. (1998).  
Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol., 41: 103-125.
- Larpent, J. P. (1987).

Micro-organismes intervenant dans la fabrication et la maturation des fromages: leur rôle sur les propriétés organoleptiques. in- Biotechnologie et industries laitières. Technique & Documentation, Apria, Paris, pp. 45-80.

Larpent, J. P. (1991).

Les ferments microbiens dans les industries agro-alimentaires: (produits laitiers et carnés).  
Technique & documentation, Lavoisier, Paris, 241p.

Larpent, J. P. (1993).

Aliments fermentés et ferments microbiens. L'information de Biotechnicien., 1:19-21.

Leisner, J. J., Vancarmeyt, M., Goris, J., Christensen, H. et Rusul, G. (2000).  
Paralactobacillus selangorensis gen. Nov., a new lactic acid bacterium isolated from Chilli bo, a Malaysian food ingredient  
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50: 19-24.

Leveau, J.Y., Bouix, M. (1980).

La flore lactique. in-Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires.Vol.3. (M. Bourgeois & J.V. Leveau, éd.).  
Technique & documentation, Lavoisier, Paris, pp. 106-129.

Leveau, J.Y., Bouix, M. (1989).

La flore lactique .In- Guide pratique d'analyse micro biologique des lait et produits laitiers. (Beerens, H & Luquet, F. M, édi.).  
Tech Documentation, Lavoisier, 250p

Leveau, J.V., Bouix. M et Deroissart. H. (1991).

Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires: le contrôle micro biologique, 2' édition.  
Technique & documentation, Lavoisier, Paris,pp. 125-183.

Lindgren, S. E et Dobrogos. W. J. (1990).

Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS'. Microbiol. , 87:149-164.

Maertvedt, C.I et nes ; (1990).

Plasmid- associated bactériocin production by a lactobacillus sak strain.  
J Gen microbil,136 :1601-1607.

McAuliffe, O., Ross. R.p., Hill, C. (2001).

Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FE/I/LS  
Mzcrobiol. Rev. , 25: 285-308.

Mc Kay, L. L., et Baldwin, K. A.

Application for biotechnology: present and future improvement in lactic acid bacteria FEMS Microbiol.Rev., 87: 3-14

- Mitruka, B. M. (1976).  
Methods of detection and identification of bacteria.  
R. C. Press. (Cleveland).
- Moll, G.N., Ubbink-kok, t., hildeng —hauge, H., Nissen- Meyer, J., Nes, I.F.,  
Konings, W.N.et Driessen, A.J. (1996).  
Lactococcin G is a potassium ion- conducting, two- component bacteriocin,  
J Bacteriol., 178: 600-605.
- Nascimento, J.S., Ceotto, H. Nascimento, S.B., Giambiagi-Demarval, M., Santos,  
K.R., Et Bactos, M.C. (2005).  
Lett.Appl. Microbiol., 42 : 215-221.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H. (1996).  
Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria.  
Antonie Van Leeuwenhoek, 70: 113-128.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K. et Nes, I.F. (1992).  
A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the  
complementary action of two peptides.  
J. Bacteriol., 174: 686-692.
- Oxford, A. E. (1944).  
Diplococcin, an anti-microbid protein elaborated b y certain milk streptococci.  
Biochem. J., 38: 178- 1 82.
- Sahl, H.G. et Bierbaum, G. (1998).  
Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified  
peptides from gram-positive bacteria.  
Annu Rev Microbiol., 52 : 41-79.
- Schillinger, U., Geisen, R .et Holzappel, W.H. (1996).  
Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological  
preservation of food.  
Trends Food Sci Tech., 7: 158-164.
- Simmonds, R.S.; Pearson, L., Kennedy, R.C. et Tagg, J.R. (1996).  
Mode of action of a lysostaphinlike bacteriolytic agent produced by  
Streptococcus zooepidemicus 4881.  
Appl Environ Microbiol., 62: 4536-4541
- Stevens, LA., Sheldon. B.W., Klapes, Nm-Let Maenbarnmer, T. R. (1991).  
Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other Gram-  
negative bacteria.  
Appl. Environ.Microbiol., 57(12): 36 13-3615

- Tagg, J.R. et McGiven, A.R. (1971).  
Assay system for bacteriocins.  
Appt Alicrobiol., 21: 943-948.
- Tagg, J. R., hjana, M.S. et WannPniriker, L.W. (1976).  
13acterioeins of Gram-psitive bacteria.  
Bacteriological Reviews., 40(3): 722-756.
- Takeya, K. et Tokiwa, A. (1972).  
Mycobacteriocin, classification of rapidly growing mycobacteria Int.1.  
BacterioL., ZZ (3): 178- 180.
- Ten Brink, B., Minekus M., Van der Vossen J. M. B. M., Leer R. J., Huis in't  
Veld J. H. J. (1994).  
Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and  
optimization O production of acidocin B, a novel bacteriocin produced  
by Lactobacillus Aidophilus M46.  
Appt Bacteriol., 77: 140-148.
- Teuber, M. (1992).  
Lactic acid bacteria.  
Eds. Anonyme, Munich, Swidserland. pp. 325-344.
- Tsai, H.J., Sandine, W.E. (1987).  
Conjugal transfer of nisin plasmid gens from Streptococcus lactis 7962 to  
Leuconostoc dextranicum 181.  
Appl Environ Microbiol., 53: 352-357.
- Twomey, D.P., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B., Hill, C. (2002b).  
Lantibiotics produced by lactis acid bacteria: structure, fonction and  
applications. Anionie Van Leeuwenhoek., 82: 165-185.
- Van Belkum, M.J., kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I.F., Konings, W.N.et  
Abee, T. (1991b).  
The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal  
cytoplasmic membranes in avoltage- independent, protein- mediated manner.  
J. Bacteriol., 173: 7934-7941.
- Vandamme, P., Pot, B., gillis, M., de Vos, P. Kersters, K. et Swings, J. ( 1996).  
PolypIpsic taxonomy, a consensus approach to bacterial ststematics. Microbiol. Rev. 60:  
407-438.
- Venema, K., Dost, M.H., Venema, G., Kok, J. (1996).  
Mutational analysis and chemical modification of Cys24 of lactococcin B, a  
bacteriocin produced by Lactococcus lactis.  
Microbiolog y., 142 : 2825-2830.

**Milieu de culture :**

**1/ M 17**

**Composition :**

- tryptone 5 g.
- peptone de soja 5g
- infusion de viande 5g
- extrait de levure 2.5g.
- glycerohydrogeneophosphate de sodium 19g.
- lactose 5 g.
- sulfate de magnesium 0.25g.
- agar 11g.

**Preparation :**

48.25g de poudre dans 950 ml d'eau distillée. Autoclavache classique (120c° pendant 15 min). Ajouter extemporanément 50 ml de solution de lactose a 100g par litre.

**2/MRS**(gelose de man, rogosa, sharpe).

**Composition :**

- peptone 10g.
- extrait de viande 8g.
- extrait de levure 11g.
- glucose 20g.
- acetate de sodium trihydrate 5g.
- citrate d' ammonium 2g.
- twin 80 1ml.

Hydrogenophosphate de potassium 2g.

-sulfate de magnesium heptahydrate 0.2g.

- sulfate de magnesium tetrahydrate 0.05g.

-agar 10g.

### **Preparation :**

62g par litre, stérilisation à l'autoclave (120° c pendant 15 min).

- Colorants de Gram

### **A- Préparation des colorants de Gram:**

#### **✓ Fuschine**

Fuschine basique      10g

Ethanol                      100ml

Phénol                      50g

Eau distillée              1000ml

#### **✓ Lugol**

**Lugol                      5g**

**Iodure de potassium      10g**

**Eau distillée              1000ml**

#### **✓ Violet de Gentiane**

Violet de Gentiane      10g

Phénol                      20g

Ethanol                      100 ml

**Eau distillée              1000 ml**

D 'après (Garvie I 984)

## Abstract

A total of 13 strains of lactic acid bacteria isolated starting from a traditionally fermented product (jben) was identified on the basis of some number of morphological, biochemical and physiological criteria.

The identification as of these strains revealed the presence of two genera: *Lactobacillus* (77%), *Lactococcus* (23%).

The screening of these 13 bacterial isolates for the production of antibacterial activities of the jben allowed us to select 3 bacterial strains producers of bacteriocins they were the strains (*Lactobacillus plantarum* ST<sub>2</sub>, *Lactobacillus acidophilus* TH<sub>1</sub> and *Lactococcus lactis* Subsp. *Lactis* LCL2).

The research of bacterial antagonism was carried out according to the method of double-layers and the method of wells diffusion agar under conditions that eliminate the effect of the lactic acid and hydrogen peroxide. In addition, we highlighted the experimental conditions that eliminate the effect of the lactic and hydrogen peroxide. In addition, we highlighted the experimental conditions to determine the spectrum of activity.

The strains bacteriocin-producing and its bacteriocins show a potentiality in the fight against the majority of the indicator bacteria tested (Gram+) in food systems particularly in the elaborate jben traditionally under uncontrolled hygienic conditions.

**Key words:** Lactic acid bacteria, bacteriocin, traditional cheese, jben, bioconservation.

## Résumé

Un total de 13 souches de bactéries lactique isolées à partir d'un produit fermenté traditionnellement (Jben) a été identifié sur la base de certains critères morphologiques, biochimiques et physiologiques.

L'identification des ces souches a révélé la présence de deux genres : *Lactobacilles* (77%) et *Lactococcus* (23%).

Le criblage de ces 13 isolats bactériens pour l'activité antimicrobienne nous a permis de sélectionner trois souches productrices des bactériocines, il s'agit des souches (*Lactobacillus plantarum* ST<sub>2</sub>, *Lactobacillus acidophilus* TH<sub>1</sub> et *Lactococcus lactis* *Subsp.lactis* LCL<sub>2</sub>).

La recherche de l'antagonisme bactérien a été réalisée suivant la méthode de doubles couches et de puits dans des conditions qui élimine l'effet de l'acide lactique et du peroxyde d'hydrogène. D'autre part, nous avons mis en évidence les conditions expérimentales pour déterminer le spectre d'activité.

Les souches bactériocinogènes et ses bactériocines montrent une potentialité dans la lutte contre la majorité des bactéries indicatrices testées (Gram+) dans des systèmes alimentaires notamment dans le jben élaboré de façon traditionnelle dans des conditions hygiéniques non contrôlées.

**Mots clés :** bactéries lactiques, bactériocines, fromage traditionnel, jben, bioconservation.

## ملخص:

مجموعة من بكتيريا حمض اللبن تقدر بـ 13 سلالة تم عزلها من منتج مخمر تقليديا (جبن) حيث تم تنقيتها على أساس العديد من الخصائص المورفولوجية، البيوكيميائية و الفيسيولوجية. سمح تحديد هذه السلالات عن وجود نوعين :  
*Lactobacillus (77%), Lactococcus (23%)*

سمح لنا الفرز من الـ 13 بكتيريا المعزولة للنشاط المضاد للجراثيم باختيار 5 سلالات منتجة للبكتيريوسينات، هذه السلالات هي :

*Lactobacillus plantarum ST<sub>2</sub>, Lactobacillus acidophilus TH<sub>1</sub>, Lactococcus lactis subsp.lactis LCL<sub>2</sub>*

البحث عن الصراع البكتيري تحقق تبعا لطريقة الطبقات المزدوجة و طريقة النشر في الآبار ، وفقا للشروط التي تلغي أثر حمض اللبن وفوق أكسيد الهيدروجين، و في المقابل سلطنا الضوء على الظروف التجريبية لتحديد مجال النشاط و أسلوب العمل.

السلالات المنتجة للبكتيريوسينات و البكتيريوسينات الخاصة بها أظهرت قدرة كبيرة على مكافحة أغلبية البكتيريا الدالة المختبرة (جرام +) في النظم الغذائية لاسيما في الجبن المحضر بطريقة تقليدية تحت ظروف صحية خارجة عن السيطرة.

**الكلمات الرئيسية :** بكتيريا حمض اللبن، جبن تقليدي، جبن، البكتيريوسينات، الحفظ الحيوي.