



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



Université Abbes Laghrour Khenchela  
Faculté des sciences de la nature et de vie  
Département de : biologie

## Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

## Master

**Filière :** science de la nature et de vie  
**Option :** Microbiologie Générale.

## THEME

Sélection des bactéries lactiques(Lactobacilles) productrices des  
bactériocines a partir des produits laitiers traditionnellement  
fermentés ( Jben)

### Présenté par :

- *Benabbes Rayene.*
- *Lakhneche souhila.*

### Encadré Par :

*Mr. Thabet Rachid.*

*Soutenu le : 14.06.2015*

### Jury de soutenance :

Présidente : Douaouia Leila **MAA Abbes laghrour khenchela**

Encadreur : Thabet Rachid **MAA Abbes laghrour khenchela**

Examinatrice : Benrdjem **MAA Abbes laghrour khenchela**

**Promotion : juin 2015**

Le travail a été réalisé au niveau du laboratoire de l'institut Abbes Laghrour Khenchela

---

## Remerciement

*Avant tout, Nos plus chers remerciements a notre Dieu, tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la volonté pour réaliser ce travail.*

*On remercie en deuxième lieu notre promoteur Monsieur Thabet Rachid pour la proposition de ce thème ainsi que pour sa compréhension et pour l'aide qu'il nous a donné.*

*Et aussi a l'ensemble du personnel travaillant au laboratoire du département de Biologie surtout Majda .*

*Nos remerciements vont également à Nos enseignants qui nous ont accompagné pendant notre cursus universitaire.*

*Nos plus vifs remerciements à nos parents, notre famille, et nos amies. Enfin nous adressons nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicaces*

*J'ai l'honneur de dédier ce mémoire ...*

*A mes chers parents pour leur patience, leur amour, leur soutien et leur encouragement.*

*Puisse dieu tout puissant vous garde et vous procure santé et bonheur*

*A mes deux chers frères Anis et Fahd.*

*A ma petite chère cousine que j'adore Chahinez.*

*A toutes mes tantes et mes tontons que j'aime tant*

*A mes copines Afaf , Chacha , Sarah , Narimene, Rihountii, mayssoun, baya et Rania <3*

*A tous mes amis et mes collègues.*

*Et surtout a ma binôme, ma sœur, ma cousine adorée Souhila ... que dieu la garde pour moi .*

*Rayene*

## Dédicaces

*Je dédie au premier lieu à Ma chère mère (MALIKA) qui m'a donné du courage, amour et qui a sacrifié pour moi, ainsi qu'elle m'a apporté la force, la volonté pour réaliser ce travail.*

*A mon père (RAFIK) qui a sacrifié et qui m'a donné du soutien moral et logistique.*

*Je souhaite que dieu les protège pour moi car sans eux je n'aurais pu faire de longues études.*

*A ma sœur CHAHI, ma petite princesse.*

*Mes Tantes et mes ancies*

*Mon cher frère : Ramzi.*

*Mes chères amies: Sarah, soumia, khadija.*

*Ma chère binôme et ma chère cousine : Rayene avec qui j'avais vraiment l'honneur et la chance de réaliser ce travail.*

*Enfin une dédicace spéciale à une personne vraiment spéciale dans ma vie merci de faire partie de ma vie c'est toi*

*Souhila*

| <b>Tableaux</b>  | <b>Pages</b> |
|--|--------------|
| <b>Tableau N°01</b> : Critères différentiels des trois groupes des lactobacilles.                                      | <b>10</b>    |
| <b>Tableau N°02</b> : Quelque exemple des espèces qui correspondent aux trois groupes de lactobacilles.                | <b>11</b>    |
| <b>Tableau N°03</b> : Quelque bactériocines de la classe 1 produites par les bactéries lactiques.                      | <b>20</b>    |
| <b>Tableau N°04</b> : Bactériocines de la classe 2 produites par les bactéries lactiques.                              | <b>21</b>    |
| <b>Tableau N°05</b> : Bactériocines de la classe 3 produites par les bactéries lactiques.                              | <b>22</b>    |
| <b>Tableau N°06</b> : Description des différentes classes des bactériocines.   | <b>22</b>    |
| <b>Tableau N°07</b> : Les prélèvements des échantillons.   | <b>30</b>    |
| <b>Tableau N°08</b> : Critères morphologiques et le test Gram des sept isolats.  | <b>43</b>    |
| <b>Tableau N°09</b> : Caractères préliminaires des sept souches isolées.   | <b>43</b>    |
| <b>Tableau N°10</b> : Résultats de croissance des isolats à différentes températures et la Thermorésistance.           | <b>44</b>    |
| <b>Tableau N°11</b> : Résultats de croissance des souches à des à différentes concentrations de NaCl.                  | <b>44</b>    |
| <b>Tableau N°12</b> : Résultats du test de type fermentaire sur milieu glucosé et du test ADH.                         | <b>46</b>    |
| <b>Tableau N°13</b> : Résultats du profil fermentaire des sucres.  | <b>46</b>    |
| <b>Tableau N°14</b> : Résultats du profil fermentaire des souches lactiques sur galerie API20E.                        | <b>47</b>    |
| <b>Tableau N°15</b> :Résultat de l'identification finale des souches.  | <b>50</b>    |
| <b>Tableau N°16</b> : Spectre d'activité Antibactérienne présente dans l'extrait de culture PH6 souches sélectionnées. | <b>52</b>    |

| <b>Figures</b>  | <b>Pages</b> |
|---|--------------|
| <b>Fig. 01-</b> Observation microscopique ×1000 des lactobacilles et des streptocoques colorés au bleu de méthylène.  | <b>02</b>    |
| <b>Fig. 02-</b> Les différentes formes cocci et bacilles des bactéries lactiques.                                     | <b>04</b>    |
| <b>Fig. 03-</b> Aspect microscopique de (A) <i>lactobacillus salivarius</i> et (B) <i>lactobacillus acidophilus</i> . | <b>09</b>    |
| <b>Fig. 04-</b> Aspect microscopique de l'espèce <i>Lactobacillus casei</i> .   | <b>09</b>    |
| <b>Fig. 05-</b> Aspect microscopique de (A) <i>lactobacillus brevis</i> et (B) <i>Lactobacillus sakei</i> .           | <b>10</b>    |
| <b>Fig. 06-</b> Aspect microscopique de (A) <i>Lactobacillus lactis</i> et (B) <i>Streptococcus faecalis</i> .        | <b>12</b>    |
| <b>Fig. 07-</b> Aspect microscopique de <i>Leuconostoc mesenteroide</i> ssp <i>cremorsis</i> .                        | <b>13</b>    |
| <b>Fig. 8-</b> Aspect microscopique de <i>Pediococcus pertocaseus</i> .   | <b>14</b>    |
| <b>Fig. 9-</b> Rôle industriel des bactéries lactiques dans la fabrication des yaourts.                               | <b>15</b>    |
| <b>Fig. 10-</b> Rôle industriel des bactéries lactiques dans la fabrication des fromage.                              | <b>15</b>    |
| <b>Fig. 11-</b> Rôle des bactéries lactiques dans le domaine thérapeutique chez l'être humain.                        | <b>16</b>    |
| <b>Fig. 12-</b> Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques.   | <b>24</b>    |
| <b>Fig. 13-</b> Jben traditionnel   | <b>30</b>    |
| <b>Fig. 14-</b> protocole d'isolement, de purification et d'identification des bactéries lactiques.                   | <b>36</b>    |
| <b>Fig. 15-</b> Méthode de double couche utilisée pour la recherche des substances antibactériennes.                  | <b>39</b>    |
| <b>Fig. 16-</b> Méthode de puits  | <b>40</b>    |
| <b>Fig. 17-</b> Préparation d'un produit laitier traditionnel   | <b>61</b>    |

| <b>Photos</b>  | <b>Pages</b> |
|--|--------------|
| <b>Photo 1</b> : Aspect microscopique des bactéries lactiques sur milieu MRS   | <b>41</b>    |
| <b>Photo 2</b> : Aspect des colonies des souches sur milieu MRS  | <b>42</b>    |
| <b>Photo 3</b> : Observation microscopique des bactéries lactiques après <b>coloration</b> de Gram.                  | <b>42</b>    |
| <b>Photo 4</b> : (A) Résultat de test de température, (B) Effet de concentration en NACL.                            | <b>45</b>    |
| <b>Photo 5</b> : Aspect microscopique des bactéries pathogènes   | <b>50</b>    |
| <b>Photo 6</b> : : Inhibition obtenue par la méthode des disques de la souche S3 contre <i>staphylococcus aureus</i> | <b>51</b>    |
| <b>Photo 7</b> : Absence d'inhibition de la souche S3 contre <i>Escherichia coli</i>                                 | <b>52</b>    |
| <b>Photo 8</b> : Inhibition obtenue par la méthode des disques de la souche S6 contre <i>Staphylococcus aureus</i>   | <b>53</b>    |
| <b>Photo 9</b> : : Absence d'inhibition par la méthode des disques de la souche S6 contre <i>Escherichia coli</i>    | <b>54</b>    |
| <b>Photo 10</b> : verre de montre  | <b>60</b>    |
| <b>Photo 11</b> : Becher   | <b>60</b>    |
| <b>Photo 12</b> : Pipette graduée  | <b>60</b>    |
| <b>Photo 13</b> : Anse de platine  | <b>60</b>    |
| <b>Photo 14</b> : .Bain marie  | <b>60</b>    |
| <b>Photo 15</b> :bec bunzen  | <b>60</b>    |
| <b>Photo 16</b> : Etuve  | <b>60</b>    |
| <b>Photo 17</b> :.bouillon MRS   | <b>60</b>    |
| <b>Photo 18</b> .Gelose MRS  | <b>60</b>    |

|                     |
|---------------------|
| <b>Abréviations</b> |
|---------------------|

|   |
|---|
| <b>ADH</b> : Hydrolyse de l'arginine.                 |
| <b>ADN</b> : Acide Disoxy-ribonucléique.              |
| <b>ARA</b> : Arabinose.                               |
| <b>AMY</b> : Amygdaline.                              |
| <b>ARN</b> : Acide-Ribo-Nucléique.                    |
| <b>ATCC</b> : American type culture collection        |
| <b>BL</b> : Bactéries lactiques.                      |
| <b>CIT</b> : Citrate.                                 |
| <b>CO2</b> : oxyde de carbone.                        |
| <b>En</b> : Entérocooccus.                            |
| <b>FDP</b> : Fructose 1-6 diphosphate aldolase.       |
| <b>G</b> : Grossissement.                             |
| <b>G+C</b> : Guanine et Cytosine.                     |
| <b>GEL</b> :Gélatinase.                               |
| <b>GLU</b> : Glucose.                                 |
| <b>GRAS</b> : Generally Recognized As Safe.           |
| <b>H2O2</b> : Eau oxygénée.                           |
| <b>H2S</b> : Sulfure d'hydrogène.                     |
| <b>IND</b> : Indole.                                  |
| <b>INO</b> : Inositol.                                |
| <b>Lb</b> : Lactobacillus.                            |
| <b>LDC</b> :Lysine Décarboxylase.                     |
| <b>MAN</b> : Manitol.                                 |
| <b>MEL</b> : Melibiose.                               |
| <b>MRS</b> : Gélose de Man,Rogosa,Sharpe.             |
| <b>Nacl</b> : Chlorure de sodium.                     |
| <b>Nd</b> : Non déterminé.                            |
| <b>NO2</b> : Nitrite.                                 |
| <b>OCD</b> :Ornithine Décarboxylase.                  |
| <b>ONPG</b> : Orthonitrophényl-B-D-galactopyranoside. |
| <b>PH</b> : Potentiel Hydrogène.                      |
| <b>RHA</b> : Rhamnose.                                |
| <b>S</b> : Souche.                                    |
| <b>SAC</b> : Saccharose.                              |
| <b>SOR</b> : sorbitol.                                |
| <b>TDA</b> : Tryptophane Désaminase.                  |
| <b>TSI</b> : Trois sucres d'identification.           |
| <b>VP</b> : Vosges-proskauer.                         |
| <b>Zn</b> : Zink.                                     |

## Table de Matière

**Liste des tableaux.**

**Liste des figures.**

**Liste des Abréviations**

**Introduction Générale. ....(01)**

**Partie Bibliographique**

**Chapitre 1- Bactéries lactiques**

1-1-Introduction. ....(02)

1-2-Définition. ....(03)

1-3-propriétés générales. ....(04)

1-4-Habitat des Bactéries lactiques.....(04)

Les lactobacilles. ....(05)

1-Lait et produits laitiers. ....(05)

2-Homme et Animaux. ....(06)

3-viandes et produits carnés. ....(06)

4-Produits végétaux. ....(06)

5-Boissons et jus de fruit. ....(06)

1-5-Génétiq ue des bactéries lactiques. ....(06)

6-Classification des bactéries lactiques. ....(07)

6-1-Classification au niveau du genre. ....(08)

6-1-1-*Lactobacillus*.....(08)

6-1-2-*Enterococcus,Lactococcus,Sterptococcus*.. ....(11)

6-1-3-*Leuconostoc*.....(12)

6-1-4-*Pediococcus*.....(13)

7-L'intérêt des bactéries lactiques.. ....(14)

8-Les caractéristiques biotechnologiques des bactéries lactiques.....(16)

8-1-Activité Acidifiante. ....(16)

8-2-Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux. ....(17)

|  |      |
|--|------|
| 8- 3-Activité protéolytique. ....                                  | (17) |
| 8-4-Production de viscosité. ....                                  | (17) |
| 8- 5-Résistance au bactériophage. ....                             | (18) |
| 8- 6-Résistance aux antibiotiques. ....                            | (18) |
| 8-7- Production de peroxyde d'hydrogène. ....                      | (18) |
| 8-8-Activité bactériostatique (Production des bactériocines). .... | (18) |

## **Chapitre 2 : Bactériocines**

|  |      |
|--|------|
| 1-Définition. ....   | (19) |
| 2-Nomenclature. ....                                       | (19) |
| 3-Classification Des bactériocines... ....                 | (19) |
| 3-1- Classe I -les lantibiotiques. ....                    | (20) |
| 3-2- Classe II - Non lantibiotiques ou cystibiotiques..... | (20) |
| 3-3-Bactériocines de classe III .....                      | (21) |
| 3-4-Bactériocines de classe IV .....                       | (22) |
| 4-La production des bactériocines et leur régulation. .... | (23) |
| 5-Les mécanismes d'action des bactériocines. ....          | (23) |
| 6-Spectre d'activité des bactériocines.....                | (24) |
| 7-Les applications des bactériocines.....                  | (25) |
| 7-1- Dans le secteur alimentaire. ....                     | (25) |
| 7-2-Dans le secteur sanitaire. ....                        | (26) |

### **Partie Pratique.**

#### **Matériel et méthodes utilisés**

##### **Materiel**

|                  |      |
|------------------|------|
| 1-Verrerie ..... | (28) |
| 2-Outils.....    | (28) |
| 3-Appareils..... | (28) |

|   |             |
|---|-------------|
| 4-Substances et milieux de culture. ....  | (29)        |
| 5-Milieux de culture. ....  | (29)        |
| <b>Méthodes.....</b>  | <b>(30)</b> |
| 1-Méthodes d'isolement, Purification, conservation et d'identification.....                             | (30)        |
| 1-1-L'isolement.....  | (30)        |
| 1-2-Purification.....   | (31)        |
| 1-3-Conservation.....   | (32)        |
| 1-4-Tests d'orientation pour l'identification des bactéries lactiques.....                              | (32)        |
| 1-4-1 Les tests morphologiques.....   | (32)        |
| A-Etude macroscopique.....  | (32)        |
| B-Etude microscopique.....  | (32)        |
| C-Coloration de Gram.....   | (32)        |
| 1-4-2-les tests physiologiques et biochimiques.....   | (33)        |
| 2-Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....   | (38)        |
| 2-1-Méthodes directes (Méthode de double couche).....   | (38)        |
| 2-2Méthodes indirectes.....   | (39)        |
| 2-2-1 Méthode des disques.....  | (39)        |
| 2-2-2-Méthode des puits.....  | (39)        |
| <b>Résultats et Discussion.</b>   |             |
| 1-Isolement et identification des souches lactiques.....  | (41)        |
| 1-1-Examen macroscopique.....   | (41)        |
| 1-2-Examen microscopique.....   | (42)        |
| 1-3-Identification biochimique et physiologique des isolats.....  | (43)        |
| 1-3-1-Espèces du genre <i>lactobacillus</i> .....   | (47)        |
| 1--3-1-1-Les lactobacilles thermophiles et homofermentaires stricts<br>( <i>Streptobacterium</i> )..... | (48)        |
| 1-3--1-2-Les lactobacilles mésophiles et homofermentaires facultatifs.....                              | (48)        |

|   |             |
|---|-------------|
| 1-3-1-3-Les lactobacilles mésophiles ou thermophiles et hétérofermentaires  |             |
| (Betabacterium.....)  | (49)        |
| 2-Sélection de souches bactériennes productrices d'un facteur antibactérien autre que les acides organiques ou le peroxyde d'hydrogène..... | (50)        |
| 3-Facteurs antibactériens produits par les lactobacilles.....   | (51)        |
| 3-1- <i>Lactobacillus plantarum</i> .....   | (51)        |
| 3-2- <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....   | (53)        |
| <b>Conclusion Générale.....</b>   | <b>(55)</b> |
| <b>Références.....</b>  | <b>(57)</b> |
| <b>Annexes.....</b>   | <b>(60)</b> |
| <b>Résumé.</b>  |             |

## **Introduction générale**

L'Algérie, étant un pays fortement dépendant des importations alimentaires, est particulièrement vulnérable aux risques liés aux microorganismes destinés à la consommation humaine, notamment les ferments lactiques. Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, en tant que starters dans les procédés de fermentations afin de répondre aux exigences croissantes des consommateurs en produits alimentaires moins traités et exempts de conservateurs chimiques.

Leur apports bénéfiques consistent à l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques, sans altérer le goût ni l'odeur, et en augmentant leur durée de conservation. Cette préservation est conférée par la production de plusieurs métabolites ayant une activité antimicrobienne tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009; Moraes et *al.*, 2010 ).

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

Ces substances antimicrobiennes ont la capacité de cibler sélectivement les bactéries pathogènes ou altérantes, sans pour autant inhiber les bactéries indispensables. Ces substances bioactives présentent également une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Tous ces critères suggèrent que les bactériocines peuvent être un substituant idéal des conservateurs chimiques (Dortu et Thonart, 2009).

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques essentiellement à partir de biotopes peu explorés comme Jben traditionnel. Des bactéries lactiques ont été isolées du jben algériens et identifiées par des tests physiologiques et biochimiques. Dans une deuxième étape, l'effet inhibiteur contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et le pouvoir bactériocinogène ont été recherchés au niveau de cette flore lactique.

### **L'objectif du travail**

Dans cette optique nous nous somme fixé l'objectif de parvenir à la recherche de nouvelles souches de bactéries lactiques particulièrement du genre *Lactobacillus* capables de produire des substances antimicrobiennes à partir d'un fromage produit de façon artisanale (jben) dans la région de Khenchela.

## **Partie Bibliographique**

### **Chapitre 1**

# Les Bactéries lactiques

## 1. Introduction

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes très répandus dans la nature : on les trouve dans le sol, sur les végétaux. Elles jouent un rôle important dans notre santé car elles constituent une fraction majeure de notre flore intestinale et tapissent les muqueuses nasales, buccales et vaginales, contribuant ainsi à nous protéger contre l'invasion des germes pathogènes.

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des siècles pour fermenter les aliments. Elles ont largement présentées un grand intérêt biotechnologiques. Considérées comme inoffensives pour l'homme, leur usage est fréquent dans le monde entier pour fabriquer des produits laitiers fermentés (fromage, yaourts...).

La production d'acide lactique est essentielle à la fermentation de ces produits et leur confère une saveur typique.

Les bactéries lactiques colonisent naturellement plusieurs matrices alimentaires. Elles sont depuis des siècles associées à l'alimentation humaine et animale. Ces micro-organismes sont tolérés par l'homme et les animaux, ce qui a conduit à

La reconnaissance de leur statut **GRAS** (Generally Recognized As Safe) (Klaenhammer et al., 2005).

Certaines souches de BL s'avèrent bénéfiques pour la santé humaine et sont appelées probiotiques. Ils sont capables de survivre dans le système digestif humain, voire de le coloniser et sont utilisés pour le traitement des diarrhées et autres troubles digestifs. Des études récentes mettent en évidence des propriétés de stimulation de la réponse immunitaire spécifique et certaines souches auraient la capacité de réduire les réactions d'allergie alimentaire, en particulier aux protéines du lait (Salminen et al., 1996). L'utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs vivants en vue d'une vaccination par voie orale est aujourd'hui un axe de recherche très privilégié.

En industrie agro-alimentaire, les bactéries lactiques sont employées pour aider à la fois à la fabrication et à la conservation des produits à partir de certaines matières premières telles que : le lait, la viande, le poisson, les végétaux et les céréales.

Elles réalisent dans les aliments une acidification, une production d'arômes, une production d'enzymes permettant d'améliorer la digestibilité des aliments et une inhibition des micro-organismes qu'elle soit pathogène ou d'altération.

Cette dernière activité est due à la production de substances antagonistes tels que les acides organiques (acétique et lactique), le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocines (Klaenhammer et al., 1994 ; Lasagno et al., 2002 ; De Vuyst et Leory, 2007).

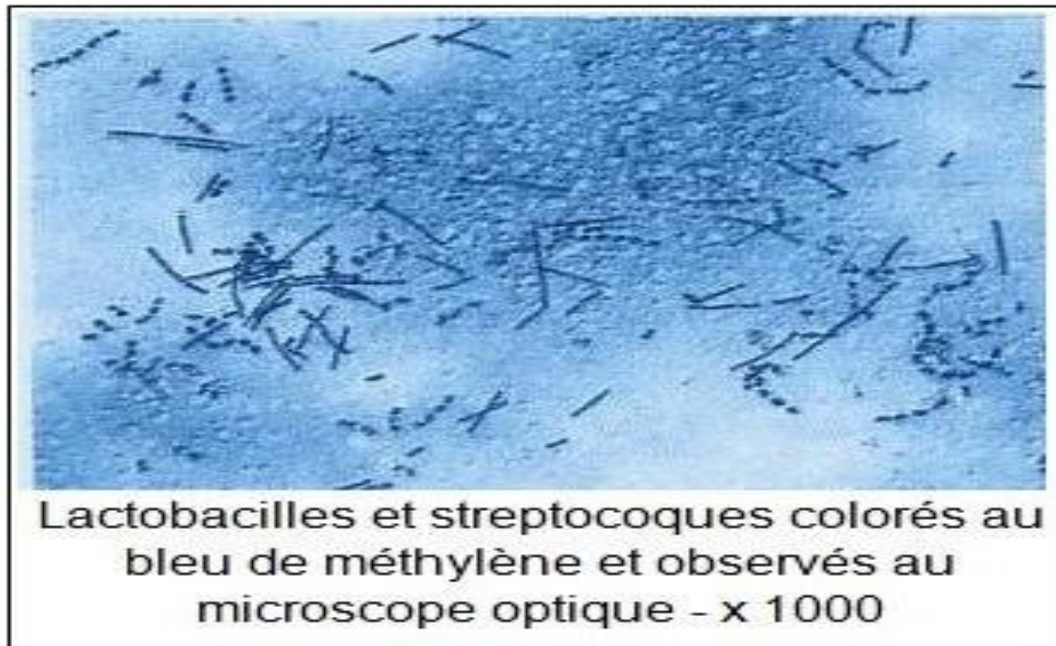
Des efforts considérables ont été consacrés au cours de ces cinquante dernières années pour affermir la compréhension de la physiologie, de la biochimie et de la génétique des BL (Collins et al., 1989 ; Berthier et Erlich., 1999 ; Bolotin et al., 2001 ; Axelsson, 2004 ; Marroki et al., 2010 et Djadouni et Kihal., 2012). Toutes ces recherches ont permis aux microbiologistes et aux industriels de choisir les meilleures souches et d'améliorer le rendement de la productivité, la qualité et la sécurité des produits finis.

Ces dernières années, l'intérêt de l'emploi de la bactériocine et ou toute autre BL productrice de substances inhibitrices pour les applications de bio-préservation a suscité beaucoup de recherches (Schillinger et Lucke, 1989 ; Budde et al., 2003 ; Jacobsen et al., 2003 ; Vermeiren et al., 2004 ; Guessas, 2007 et Saidi, 2007). La production d'acide organique et d'autres composés antimicrobiens tels que les bactériocines jouent un rôle majeur dans la conservation des produits laitiers fermentés et contribuent à l'inhibition des germes contaminants.

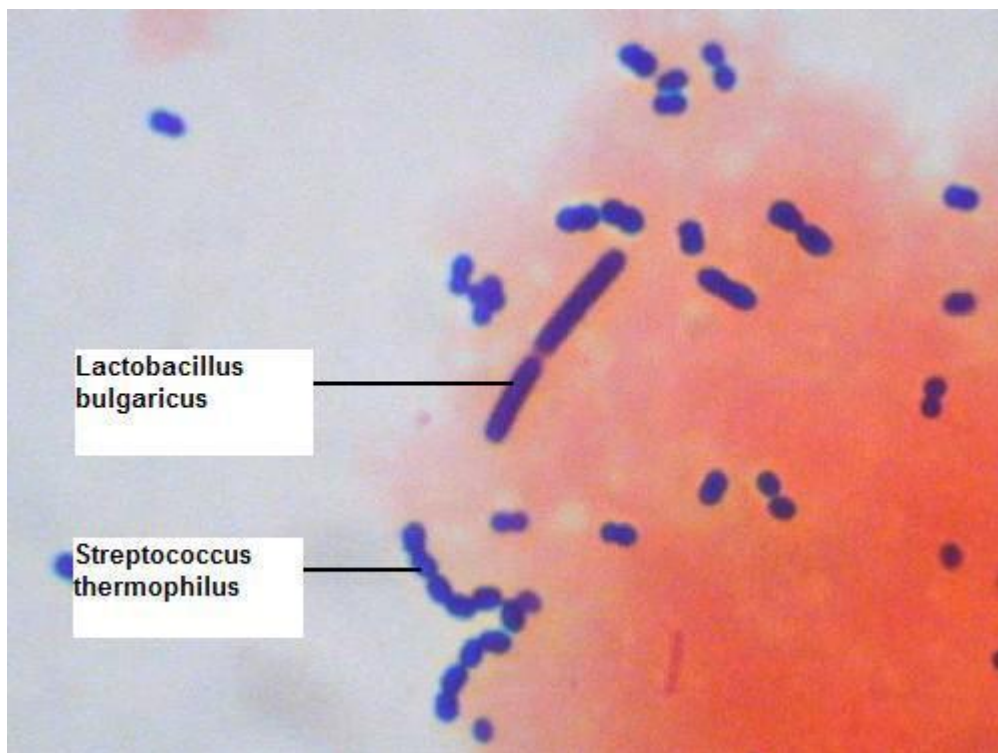
## **2. Définition**

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

Elles forment un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. (Abee, 1995 ; Hugenholtz et al., 1999).



**Figure 1 :** Observation microscopiques  $\times 1000$  des lactobacilles et des streptocoques colorés au bleu de méthylène.



**Figure 2 :** Les différentes formes cocci et bacilles des bactéries lactiques.

### 3. Propriétés générales

Les bactéries lactiques constituent un groupe de cocci et de bacilles (Badis et *al.*, 2005).

Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont asporulantes, aéro anaérobie facultatives ou micro-aérophiles, à

métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4.0 à 4.5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme. Leur division se déroule sur un seul plan à l'exception des genres : *Pediococcus*, *Aerococcus*, et *Tetragenococcus*. (Salminen et al., 2004; König et Fröhlich, 2009 ; Pringsulaka et al., 2011).

En général ces bactéries ne possèdent ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase (à l'exception de quelques souches sous certaines conditions), elles sont protéolytiques, ne liquéfient pas la gélatine, et ne forment plus d'indole ni d'hydrogène sulfureux, seulement quelque espèces hydrolysent faiblement la caséine, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (Dellaglio et al., 1994; Salminen et al., 2004).

Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et al.,1994 ; Gonzalez et al.,2000).

Il est possible de les classer suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenu 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.

Le rôle principal des bactéries lactiques est la production de l'acide lactique qui influence la texture, le goût et la qualité microbiologique des produits fermentés, la production de ce dernier facilite la coagulation des protéines par la présure ainsi que la synérèse.

L'abaissement du PH limite aussi la croissance des bactéries indésirables. (Gilliland, 1985).

Les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutéline, le dioxyde de carbone et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

#### **4. Habitat des bactéries lactiques**

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

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

### • Les lactobacilles

Les lactobacilles, par leur variété, sont présents dans des milieux très nombreux.

#### 1. Lait et produits laitiers

La contamination du lait se fait par les ustensiles, la poussière, l'ensilage.

Les espèces présents dans le lait sont les suivants : Kefir (*Lb.brevis*, *Lb.kefir*, *Lb.fermentum*).

Le fromage comme le cheddar (Bottazzi ;1988) et le fromage parmesan (*Lb.helveticus*, *Lb.lactis*, *Lb.bulgaricus*). (Bottazzi ;1988).

#### 2. Homme et animaux

Les lactobacilles de la cavité orale de l'homme sont essentiellement (*Lb.casei*, *Lb.fermentum*, *Lb.brevis*, *Lb.salivarius*).

Dans le tractus intestinal de jeune veau dominant (*Lb.lactis* et *Lb.fermentum*, *Lb.acidophilus*, *Lb.salivarius* mais *Lb.fermentum*) caractérise le porcelet.

Des biotypes de *Lb.salivarius* et *Lb.acidophilus* sont spécifiques de oiseaux .

Chez les rongeurs, il existe une souche particulière (*Lb.murinus*) dans l'estomac de souris.

La flore vaginale est constituée de *Lb.acidophilus*, *Lb.fermentum*, *Lb.grassi* et *Lb.vaginalis*.

#### 3. Viandes et produits carnés

Les principales espèces rencontrés dans les produits carnés frais ou fermentés, les saucissons (BacusetBrown, 1985) sont :

*Lb.sake*, *Lb.curvacus*, *Lb.brevis*, *Lb.alimentarius*, *Lb.plantarum*, *Lb.cellobiosus*.

#### 4. Produits végétaux

Dans les ensilages s'installent les lactobacilles après les streptocoques et les leuconostocs.

Les espèces principales sont : *Lb.plantarum*, *Lb.brevis*, *Lb.curvatus*, *Lb.casei*, *Lb.fermentum*, *Lb.acidophilus* et *Lb.salivarius*.

Les industries de sucre redoutent : *Lb.confusus*, *Lb.plantarum* et *Lb.casei* qui secrètent un mucus abondant.

Les lactobacilles participent à la conservation de certains produits végétaux parmi eux : *Lb.plantarum*, *Lb.brevis*, *Lb.buvaricus* qui interviennent aussi dans la fabrication de choucroute, de pickles et des dérivées de soja, *Lb.sanfrancisco* intervient dans la fermentation du pain avec *Lb.brevis* (Leveau et al., 1993).

### **5. Boissons et jus de fruits**

Dans le vin (*Lb.brevis*, *Lb.buchneri*) dans la bière (*Lb.malefermentans*) (Farrow et al., 1988).

Dans les jus d'orange, sont souvent présentes les espèces suivantes : *Lb.brevis*, *Lb.fermentum*, *Lb.plantarum*

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

Le matériel génétique des bactéries lactiques est organisé en deux structures: Principalement dans une longue molécule d'ADN très repliée sur lui-même : le chromosome.

Secondairement dans les plasmides qui sont : des petites molécules circulaires d'ADN indépendantes du chromosome, pouvant se répliquer de façon autonome. Les plasmides peuvent être perdus spontanément par la bactérie dans les conditions de milieu défavorables (température élevée, privation nutritionnelles) ou éliminés par des traitements chimiques. Cette possibilité de perdre spontanément des plasmides explique l'instabilité des propriétés technologiques, due à l'apparition de variantes ayant perdu certains gènes et donc certaines fonctions métaboliques. Ainsi, la perte du plasmide codant pour la protéase de paroi rend les bactéries peu protéolytiques, et entraîne une croissance ralentie des germes et une acidification faible du ferment.

Les plasmides sont les éléments les plus étudiés car ils peuvent coder pour des fonctions technologiques et parce que leur étude était plus aisée que celle du chromosome.

Principales fonctions codées par les plasmides :

1. métabolisme du lactose ou du galactose.
2. métabolisme des protéines.
3. métabolisme des citrates.
4. Production des facteurs antimicrobiens exp : certaines souches de *Lactococcus lactis* produisent un antibiotique polypeptidique : la nisine ainsi que des souches de *Lactococcus lactis* produisent une bactériocine : la diplococcine. (Desmazeaud, 1992).
5. D'autres caractères tels que la résistance aux bactériophages sont codés par au moins deux

plasmides chez les lactocoques ainsi que la formation de polysaccharides épaississant les cultures sur lait a été rapportée a la présence de plasmide.

## 6. Classification des bactéries lactiques

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen, elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimiotaxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (Krieg,2001).

Les nouveaux outils pour l'identification, et la classification des bactéries lactiques remettent couramment et ou complètent les méthodologies traditionnelles basées sur les phénotypes. La classification s'appuie sur des données moléculaires comme la comparaison des séquences codant pour les ARN16S Ribosomiques...

D'après Ludwig et *al.*(2008), le phylum *Firmicutes* comprend trois classes :

Bacilli, Clostridia et Erysipelotrichi. Appartenant à la classe Bacilli, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

Famille des *lactobacillaceae* comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *pediococcus*.

Famille des *Leuconostocaceae* contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissela*.

Famille des *streptococcaceae* comprenant les *streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

Les révisions taxonomiques des bactéries lactiques montrent que ces dernières peuvent comprendre environ une quarantaine de genres. Les révisions récentes de la taxonomie des bactéries lactiques sont présentées dans le manuel de Bergery Trust (2008).

### 6-1 Classification au niveau du genre

Les genres principaux de bactéries lactiques associées aux aliments sont les *Lactobacillus*, *leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactoccus* et *streptococcus*.

Historiquement, le genre *Bifidobacterium* était aussi considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grace à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique tel que le tube gastro-intestinal (Klein et al.,1998). Dans le manuel de Bergery publié en 1957, les *Bifidobacterium*

étaient répertoriés comme étant *Lactobacillus befidum*. ces micro-organismes, considérés souvent comme des véritables bactéries lactiques sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières, ils sont Sont d'avantage liés au phylum Actinobacteria (anciennement Actinomycètes) des bactéries Gram positif dont L'ADN est à haut pourcentage de GC (<http://WWW.bacterio.cict.fr/bacdico//aa/tactinibacteria.html>).

### 6-1.1 *Lactobacillus*

Le genre *lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae* Les lactobacilles représentent un genre important des bactéries lactiques tant au niveau industriel qu'a niveau de la flore commensale infantile.

L'hétérogénéité des espèces est illustrée par le contenu en G+C qui peut varier de 32 à 53% (Schleifer et Stackebrandt,1983 : Pilet M-F. et al.,2005).

La classification remaniée par Kandler et Weiss (1986) les subdivise en 3 groupes selon leur type fermentaire :

- **Groupe 1** : anciennement appelé Thermobacterium.il regroupe les lactobacilles homofermentaires stricts et thermophiles, ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate.ces bactéries fermentent les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof,et produisent exclusivement de l'acide lactique ,elles se développent à 45°C mais pas à 15°C, leur cellules sont longues, droites souvent en palissades (Bottazzi,1988).



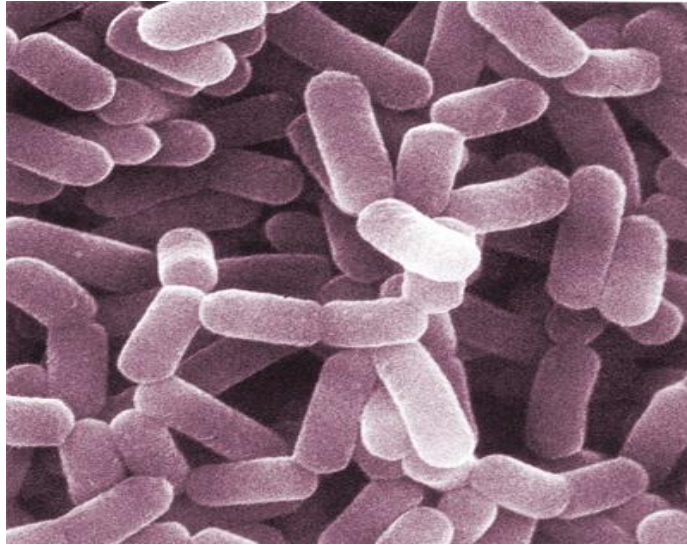
(A)



(B)

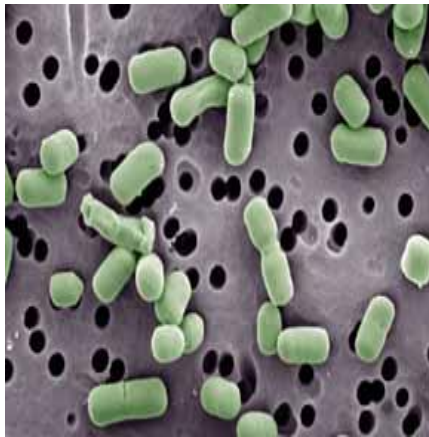
**Figure 3** : Aspect microscopiques de : (A) *Lactobacillus salivarius*, (B) *Lactobacillus acidophilus*.

•**Groupe 2** : Anciennement appelé *streptobacterium*. Rassemble les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et mésophiles qui se développent à 15°C. Les hexoses sont fermentés par la voie d'Embden-Meyerhof, en produisant exclusivement de l'acide lactique (mais pour certaines souches : du lactate, de l'éthanol et du formiate).celle des pentoses et du gluconate peuvent être dégradés par la voie hétéro-fermentaire avec une production d'acide lactique et d'acide acétique par une phosphokétolase inductible. Leurs cellules sont courtes. Souvent arrangées en filaments (Bottazzi, 1988).

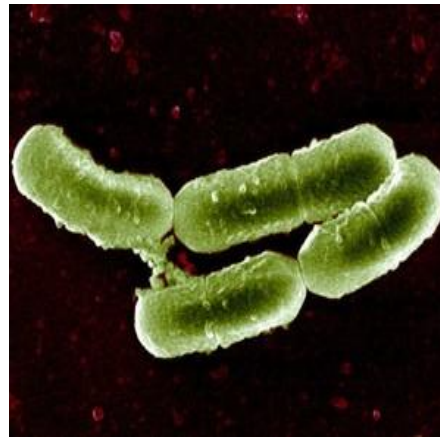


**Figure 4** : Aspect microscopique de l'espèce *Lactobacillus casei*

•**Groupe 3** : anciennement appelé *Betabacterium*.ces espèces ont un métabolisme strictement hétérofermentaire.la fermentation des hexoses produit de l'acide lactique, de l'acide acétique (ou de l'éthanol) et du CO<sub>2</sub>, celle des pentoses de l'acide lactique et de l'acide acétique.ces bactéries possèdent phosphokétolase , c'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, les cellules sont courtes, droites et séparées (Bottazzi,1988).



(A)



(B)

**Figure 5 :** Aspect microscopique de : (A) *Lactobacillus brevis* , (B) *Lactobacillus sakei*

**Tableau 1 :** Critères différentiels des trois groupes de lactobacilles

| Caractéristiques                      | Groupe 1                       | Groupe 2                        | Groupe 3                         |
|---------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
|                                       | Homofermentaires obligatoires. | Hétérofermentaires facultatifs. | Hétérofermentaires obligatoires. |
| Fermentation des pentoses             | -                              | +                               | -                                |
| CO <sub>2</sub> à partir du glucose   | -                              | -                               | +                                |
| CO <sub>2</sub> à partir du gluconate | -                              | +                               | +                                |
| FDP aldolase                          | +                              | +                               | -                                |
| Phosphokétolase                       | -                              | +                               | +                                |

**Tableau 2 :** Quelques exemples des espèces qui correspondent aux trois groupes de lactobacilles.

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>Groupe 1</b> | <i>Lb.acidophilus</i> ,<br><i>Lb.helveticus</i> , <i>Lb.Lb.delbrueckii</i> , <i>Lb.salivarius</i> . |
| <b>Groupe 2</b> | <i>Lb.casei</i> , <i>LB.plantarum</i> , <i>Lb.sakei</i> , <i>Lb,Lb.curvatus</i> .                   |
| <b>Groupe 3</b> | <i>Lb.brevis</i> , <i>Lb.fermentum</i> , <i>Lb.reuteri</i> , <i>Lb.sakei</i>                        |

### 6-1.2 *Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus*

Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* étaient précédemment inclus dans un seul genre : *Streptococcus* (Axelsson, 2004). Ce sont des coques en paire ou en chaîne, leur fermentation est homolactique, produisant en majorité de l'acide L-Lactique.

Ces espèces diffèrent principalement entre elles par la présence d'un antigène de groupe dit antigène de Lancefield.

Le genre *Streptococcus* comprend la majorité des espèces de streptocoques. Ces organismes ont un contenu en G+C de 35 à 46% (Pilet M-F. et al., 2005). Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène, oral et les autres streptocoques.

Le groupe pyogène contient essentiellement des espèces pathogènes, hémolytiques (hémolyse B) comme *Streptococcus Pyogenes* ; d'autres streptocoques oraux ( $\alpha$ -ou non hémolytiques) sont associés principalement à la cavité orale de l'homme et de l'animal (*Streptococcus mutans*).

L'espèce thermophile qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*. Les *Sp. thermophilus* ont été inclus dans le groupe des (autres streptocoques) par Scheilfer et Kilpper-Balz (1987). Du fait par son habitat (lait et produits laitiers), et son caractère non pathogène seul cette espèce est considérée comme appartenant aux bactéries lactiques.

Le genre *Lactococcus* appartient au groupe N de Lancefield, représente les streptocoques dits (lactiques). Récemment Schleifer et al. (1985), se basant sur des critères moléculaires, ont proposé de séparer les streptocoques lactiques mésophiles du genre *Streptococcus* et de créer le genre *Lactococcus* (Novel G., 1993).

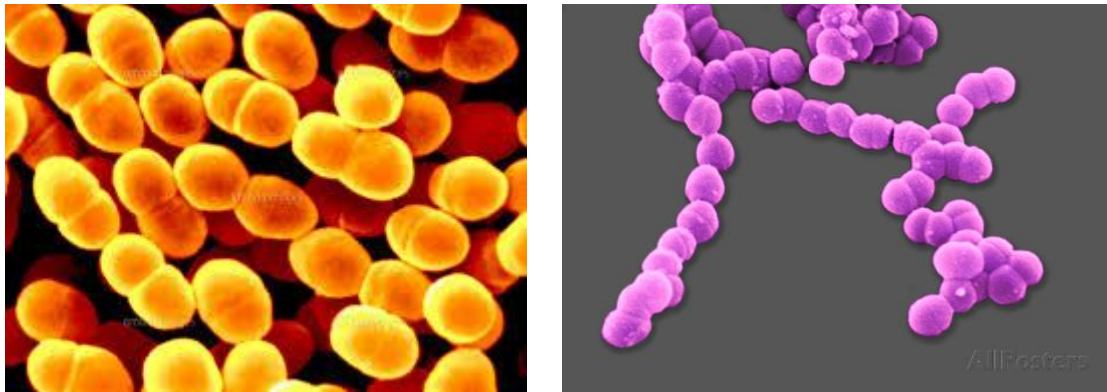
Les lactocoques sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène, mais seuls les *Lactococcus Lactis* sont actuellement utilisés dans la technologie laitière. Trois sous-espèces de *Lactobacillus Lactis* sont distinguées : *L.lactis ssp Lactis* et *L.lactis ssp cremoris* et *L.lactis ssp hordniae*.

Seules les deux premières interviennent dans la plupart des produits laitiers.

Le genre *Enterococcus* rassemble la plupart des espèces du groupe D de Lancefield (Streptocoques fécaux), présentent une hémolyse de type  $\lambda, \beta$ , et qui se caractérisent par leur

développement à 10 et 45°C, leur aptitude à croître en présence de 6,5% NaCl, et leur grande résistance aux facteurs de l'environnement. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En.faecalis* (Streptocoques fécaux), présentent une hémolyse de type  $\lambda, \beta$  et qui se caractérisent par leur développement à 10 et 45°C, leur aptitude à croître en présence de 6,5% NaCl, et leur grande résistance aux facteurs de l'environnement. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En.faecalis* auparavant (*Streptococcus faecalis*) Et ses variétés (*En.durans* et *En.bovis*).

Leur habitat est très varié : intestin de l'homme et des animaux, produits végétaux, sol, produits laitiers (Giraffa et al., 1997). Les entérocoques jouaient un rôle important dans la maturation des fromages.



(A)

(B)

**Figure 6 :** Aspect microscopique de : (A) *Lactococcus lactis*, *Streptococcus faecalis*

### 6-1.3 *Leuconostoc*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production de l'acide D (-) lactique.

Le genre *Leuconostoc* a été défini par Van Thieghm en 1878. ce genre a auparavant inclus des coccobacilles hétérofermentaires, produisant uniquement de l'acide lactique, et ne produisant pas d'ammoniaque à partir de l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 30°C, et leur contenu G+C sont assez voisins (37 à 45%) (Garvie, 1986). Leur croissance est toujours lente. ils ne sont pas hémolytiques ni pathogènes. ces espèces sont caractérisées par la production à partir du citrate du lait de diacétyle et parfois par la synthèse de dextrans et de lévanes extracellulaires en présence de saccharose (Novel G., 1993).

En général les leuconostocs sont utiles dans différents types de fromages (Devoyod et Poullain,1988 ; Ogier et al.,2008) ou ils facilitent l'ouverture par la production de CO<sub>2</sub>. Ils interviennent aussi dans l'industrie laitière (beurre et crème) principalement les *Ln.mesenteroides ssp.cremoris*, ensilage et les végétaux fermentés (olives, choucroute,etc) (Hemme et Foucaud-Scheunemann,2004).

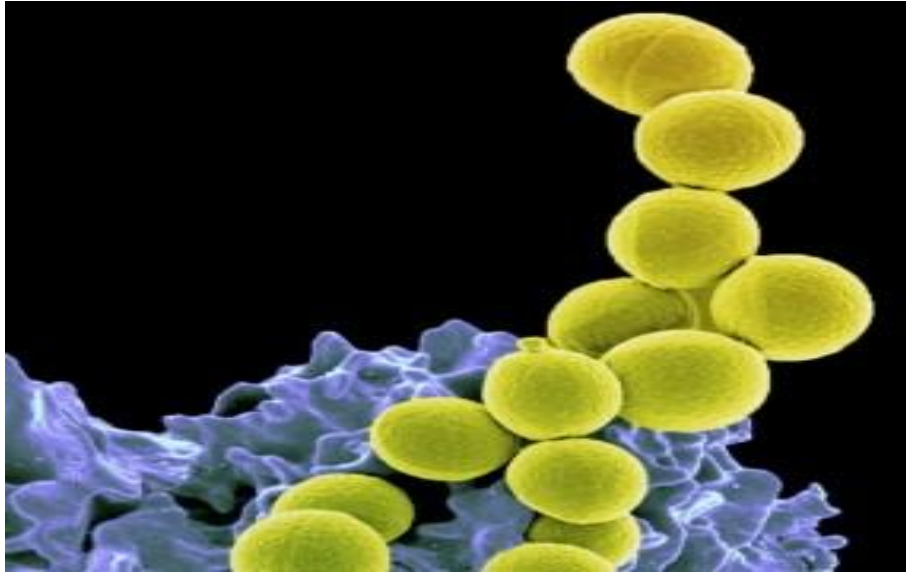


**Figure 7 :** Aspect microscopique de *Leuconostoc mesenteroide ssp. Cremoris*

#### **6-1.4Pediococcus**

Ce sont des coques formées de cellules groupées en paires ou en tétrades. Ils sont mésophiles homo- fermentaires, et le plus souvent incapable d'utiliser le lactose.

Sept espèces de *Pediococcus* sont connues : *P.acidilactici*, *P.damnosus*, *P.dextrinicum*, *P.inopinatus* , *P.Parvutus*, *P.pentosaceus* et *P.urinaeequi*. Ils fermentent les sucres en produisant de l'acide lactique DL ou L(+) et sont aussi caractérisés par le GC% de leur ADN (34-42%). Ces dernières sont importantes dans l'agroalimentaire tant sous l'aspect négatif que positif. Ce sont des agents de dégradation en brasserie (*P.damnosus*).Les *P.acidilactici* et *P.pentosaceus* ont démontré leur utilité dans l'élaboration de plusieurs produits carnés fermentés naturels, ils sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries.Les pédiocoques sont également des bactéries lactiques autochtones qui permettent la maturation des fromages.(Gonzalez et al.,Gurira et al.,2005).



**Figure 8 :** Aspect microscopique de *Pediococcus pentocaseus* .

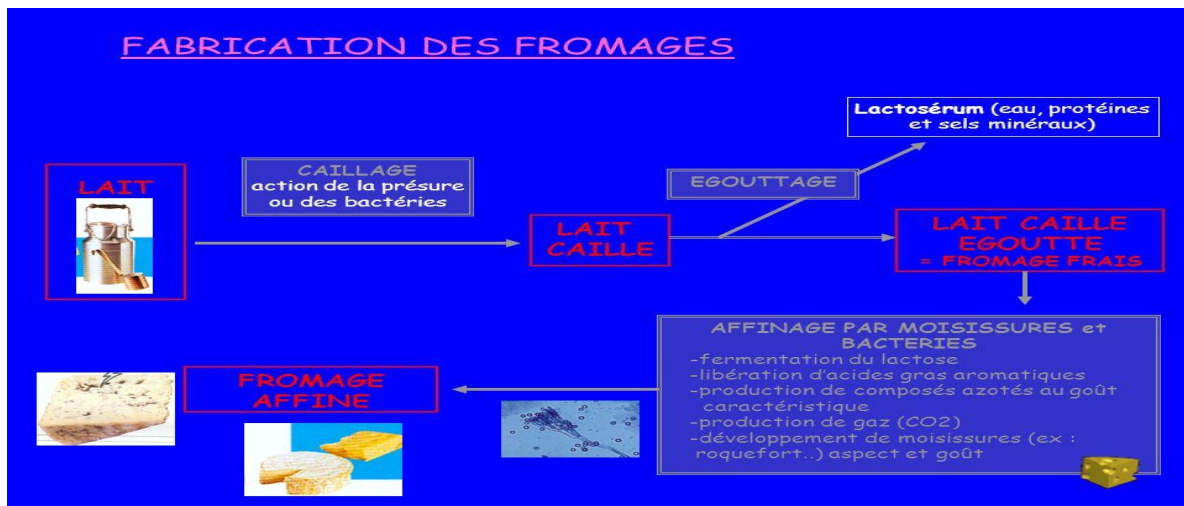
## 7. L'intérêt des bactéries lactiques

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

- **Dans l'industrie alimentaire :** les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Sterptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateem et *al.*, 2008). Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (Badis et *al.*, 2005). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles secrètent (Dortu et Thonart, 2009). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (Marth et Steele, 2001).



**Figure 9 :** Rôle industriel des bactéries lactiques dans la fabrication des yaourts.

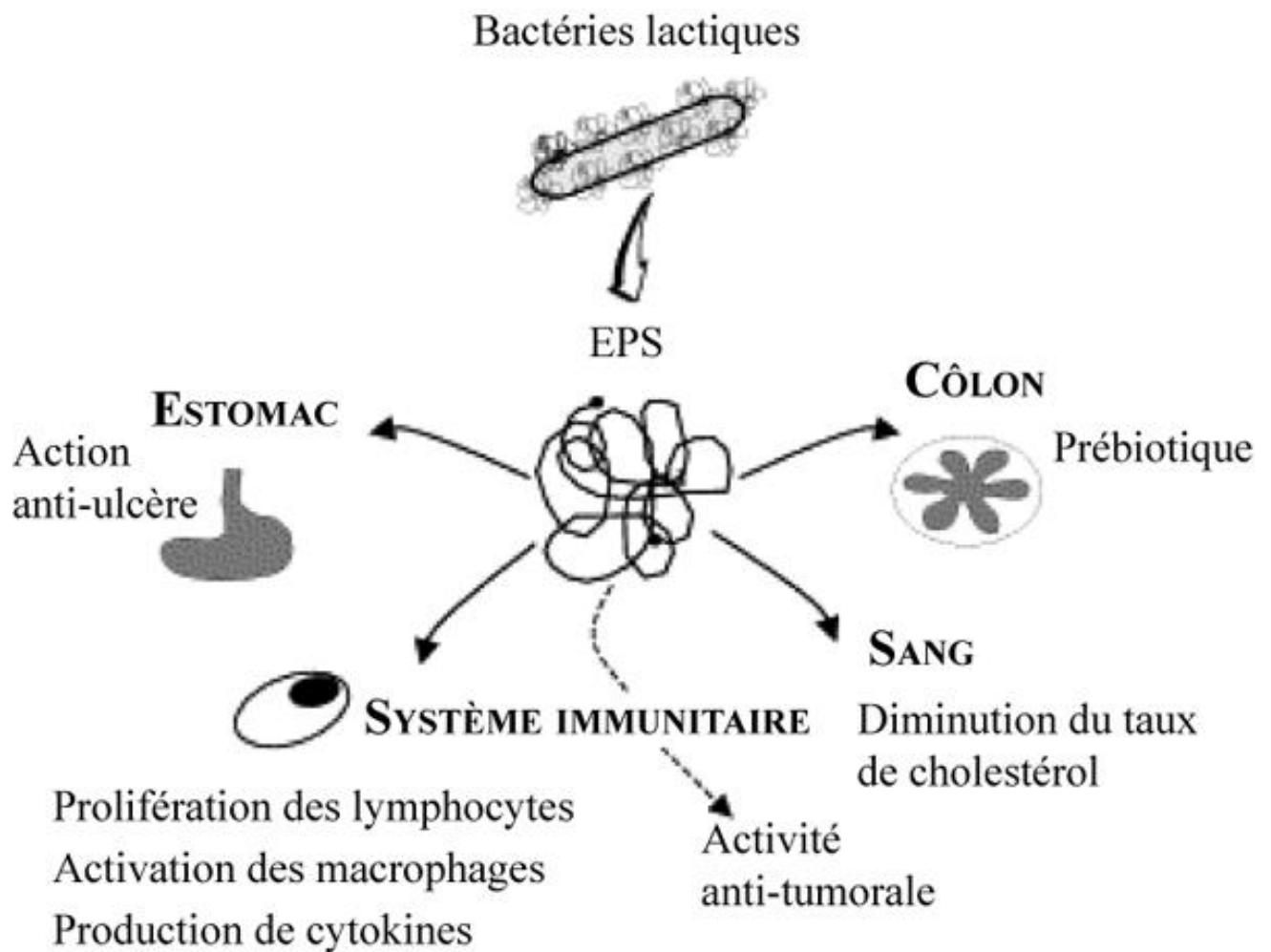


**Figure 10 :** Rôle des bactéries lactiques dans la fabrication des fromages.

**-Dans le domaine thérapeutique :** étant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (Yateem et *al.*, 2008). Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (Mkrtchyan et *al.*, 2010). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (El-Ghaish et *al.*, 2011). Uehara et *al.*, (2006) ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus*, utilisées sous forme de suppositoires pour empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

Plusieurs travaux ont mis en évidence une association inverse entre la consommation de produits laitiers fermentés, en particulier de yaourt, et le risque de tumeurs colorectales ou cancers.

Chez l'homme et sur des modèles animaux, l'ingestion de bactéries lactiques diminue la concentration d'enzymes responsable de la libération d'agents mutagènes dans le colon ( Rafter et al, 2003).



**Figure 11 :** Le rôle des bactéries lactiques dans le domaine thérapeutique chez l'être humain.

## **8-Les caractéristiques biotechnologiques des bactéries lactiques**

### **1- Activité acidifiante**

L'acidification est le rôle principal des bactéries utilisées comme ferments. Celle-ci a différents buts :

- La coagulation du lait (en facilitant l'action de l'enzyme de la présure) et l'augmentation de la synérèse du caillé ;
- La participation aux propriétés rhéologiques du produit final ; L'inhibition de la croissance des bactéries nuisibles (Papamanoli *et al* 2003).

### **2-Pouvoir aromatisant et pouvoir gazeux**

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate, l'acétone et le diacétyl sont les plus importants (Georgalaki *et al* 2002, Francois *et al* 2007).

### **3-Activité protéolytique**

Les bactéries lactiques possèdent des protéinases et des peptidases nécessaires à la dégradation des protéines du lait en peptides et acides aminés. Ceux-ci peuvent alors être transformés en alcools et en acides. Cette activité protéolytique intervient de ce fait sur le rendement fromager, la texture et la saveur typique du fromage et par conséquent sur les caractéristiques du produit final (Buist *et al.*,1998).

Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser plusieurs acides aminés, mais sont pourtant bien adaptées à un environnement riche en protéines et pauvre en acides aminés libres ; comme le lait ; grâce à un système protéolytique bactérien complexe (Shirai *et al* 2001, Francois *et al* 2007).

Technologiquement l'activité protéolytique constitue un caractère très important qui fait des bactéries lactiques les seuls agents microbiens d'affinage de la majorité des fromages à pâte pressée (Cheddar, fromage de Hollande...), des fromages sans croûte ou à croûte artificielle et des fromages frais.

Dans les fromages, l'activité des enzymes protéolytiques des bactéries lactiques est fondamentale car elle va participer à la formation du goût ou des arômes ; la protéolyse due aux bactéries lactiques va surtout conduire à des peptides courts et à des acides aminés libres. Ces derniers sont des précurseurs pour de nombreux produits d'arôme. En effet, la méthionine peut conduire à des composés soufrés caractéristiques. Ceci après leur dégradation par la flore d'affinage (Hemme *et al.* 1981).

#### **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 gommes (polysaccharides, galactanes) et mucines (substance glucido-azotée) qui donne l'aspect filant aux produits (Fiest, 1994) les souches responsables de cette sécrétion sont appelées ferment filant, on peut citer l'exemple de *Streptococcus thermophilus* dans le yaourt (Anonyme, 1992).

#### **5-Résistance aux bactériophages**

Les phages, virus des bactéries, sont des parasites obligatoires. Ils constituent l'une des principales causes de perturbation de l'acidification du lait par les bactéries lactiques.

Il est nécessaire que les bactéries lactiques composant les ferments ne soient pas toutes sensibles aux mêmes phages pour diminuer les risques d'accidents de fabrication.

#### **6-Résistance aux antibiotiques**

La présence d'antibiotiques dans le lait (pénicilline, vancomycine... etc) peut être due au traitement des immunités. La plupart des bactéries y sont sensibles. Mais, de plus en plus on voit l'émergence de souches résistantes à ces antibiotiques, surtout dans le genre *Enterococcus*. Il n'est pas souhaitable de sélectionner, dans la composition des ferments, des souches résistantes aux antibiotiques, car, ingérées par l'homme, elles sont susceptibles de transférer ces caractères aux autres bactéries du tube digestif. De plus, l'augmentation de l'ingestion d'antibiotiques par l'homme peut entraîner des risques d'allergies.

#### **7-Production de peroxyde d'hydrogène**

Dans certaines conditions, en présence d'oxygène, les bactéries lactiques peuvent produire du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui est un composé toxique pour différentes bactéries et surtout sur celles dépourvues de catalase ou de pseudocatalase capables de dégrader ce composé toxique (Chamba *et al.*, 1994).

#### **8-Activité bactériostatique (production de bactériocines)**

Les bactériocines, telles que la nisine ou la pédiocine, sont des molécules de nature protéique dont l'action bactériostatique est spécifique de quelques espèces bactériennes (Tagg *et al.*, 1976).

Ces substances, élaborées par certaines bactéries, inhibent la croissance de différentes souches de bactéries pathogènes (*Listeria* et *Clostridium*), contribuant ainsi à la préservation de l'équilibre microbien et organoleptique du fromage (Harris *et al.*, 1989 ; Georgalaki *et al.* 2002).

Les bactéries lactiques produisent des substances antimicrobiennes de nature protéique appelées bactériocines. Cette caractéristique est utilisée industriellement pour la destruction des bactéries indésirables et pathogènes dans la fabrication d'aliment comme la nisine produite par les lactocoques dirigée contre *Bacillus* et *Clostridium*, la plantaricine et la sakacine produites par toutes les deux par les lactobacilles actives sur *E.coli*, *Listeria* et certaines levures (Ogunbanwo *et al.*, 2003 ; Zambunelli *et* Chiavari, 2002).

## Chapitre 2

### Bactériocines

#### 1- Définition

Les bactériocines sont des composés de synthèse ribosomale produites par les bactéries dans le but d'inhiber la croissance d'autres bactéries. Ces composés sont trouvés chez la plupart des espèces bactériennes étudiées jusqu'aujourd'hui. Mais peu d'entre eux sont largement étudiées. en général, elles ont un spectre d'action restreint, inhibant seulement les bactéries voisines de la souche productrice, les bactéries a Gram + n'inhibent pas les bactéries a Gram – et vice versa (Ouwehand et Vesterlund , 2004 )

Habituellement, elles sont de faible poids moléculaire (mais des bactériocines a haut poids moléculaire sont également produites). c'est leur nature protéique et leur spectre d'inhibition étroit qui les distingue des antibiotiques (De Vuyst et Leroy , 2007)

Au cours des deux dernières décennies, la sécurité alimentaire est devenue un problème majeur, et de grands efforts ont été fournis pour identifier les bactériocines qui inhibent la croissance des germes pathogènes et nuisibles. Pour l'utilisation dans l'aliment la bactériocine doit être :

- Stable à la chaleur
- Stable à l'acidité
- Résistante aux protéases qui se trouvent dans l'aliment
- Active pendant une période prolongée
- En activité au pH de l'alimentation (4.5 à 7.0)

#### 2- Nomenclature

La nomination des bactériocines est attachée soit au genre ou à l'espèce de la première souche productrice en ajoutant le suffixe "cine" pour indiquer le pouvoir létale ; par exemple: la plantaricine est la bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* (Karthikeyan et Santhosh, 2009).

### 3- Classification des bactériocines

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

#### 3- 1-Classe I. Les lantibiotiques :

Peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la Chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post- traductionnellement, c'est-à dire la lanthionine, la  $\beta$ -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types selon la localisation des ponts établis entre les acides aminés modifiés appelés :

**La classe A** qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés synthétisés principalement par les genres *Lactococcus* , *Lactobacillus* , *Streptococcus*.

**La classe B** qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés. Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticin 3147.

La nisine, produite par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, est la bactériocine la plus largement étudiée de la classe I (Dortu et Thonart, 2009 et Rajaram *et al.* , 2010).

**Tableau 3 :** Quelques bactériocines de la classe 1 produites pas les bactéries lactiques.

| Lantibiotiques                  | Producteur                       |
|---------------------------------|----------------------------------|
| <b>Lantibiotiques de type A</b> |                                  |
| La nisine A                     | <i>Lactococcus lactis</i> NIZO05 |
| Lactocine S                     | <i>Lactobacillus sake</i> L 45   |
| Salivaricine                    | <i>Streptococcus salivaricus</i> |
| <b>Lantibiotiques type B</b>    |                                  |
| Mutacine                        | <i>Streptococcus mutans</i>      |

#### 3- 2- Classe II. Non lantibiotiques ou cystibiotiques :

Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isoélectrique varie entre 8 et 10. Cette classe est divisée en trois sous-classes. **La sous-classe IIa:** ces bactériocines contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNG ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou

amphiphile qui détermine la spécificité d'action. Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large

**La sous-classe IIb :** comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIb peuvent être distingués : le type E (*Enhancing*) où la Fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (*Synergy*) où les deux peptides sont complémentaires.

**La sous classe IIc :** contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous-classes sont appelés des bactériocines Thiol activé (le groupe non thiol doit être sous forme réduite pour que soit active) après ils ont montrés que la réduction d'un groupement thiol n'était pas indispensable à l'activité antimicrobienne (Dortu et Thonart, 2009).

**Tableau 4 :** Bactériocines de la classe 2 produites par les bactéries lactiques

| <b>Bactériocines de classe 2</b> | <b>producteur</b>                               |
|----------------------------------|---|
| <b>Sous classe 2a</b>            |   |
| Mesentiricine Y 105              | <i>Leuconostoc mesenteroides</i><br><i>Y10R</i> |
| Sakacine 5x                      | <i>Lactobacillus sake</i> 5                     |
| Pediocine PA-1                   | <i>Pediococcus acidilactici</i> PAC 1           |
| <b>Sous classe 2b</b>            |   |
| Lactococcine MN                  | <i>Lactococcus lactis</i> 9B4                   |
| Thermophiline 13                 | <i>Streptococcus thermophilus</i> sfi<br>13     |
| Plantaricine S                   | <i>Lactobacillus plantarum</i> LCP10            |
| <b>Sous classe 2c</b>            |   |
| Acidocine B                      | <i>Lactobacillus acidophilus</i> M46            |
| Lactococcine A                   | <i>Lactobacillus lactis</i>                     |

### 3-3- Bactériocines de Classe III.

Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur inactivés a 60-100°C pendant 10 à 15 minutes.

**Tableau 5:** Bactériocines de classe 3 produites par les bactéries lactiques.

| <b>Bactériocines de classe 3</b> | <b>Producteur</b>                   |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Helvéticine J</b>             | <i>Lactobacillus helveticus 481</i> |
| <b>Milléricine B</b>             | <i>Streptococcus milleri</i>        |
| <b>Zoocine A</b>                 | <i>Streptococcus zooepidermis</i>   |

La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques.

### 3- 4- Bactériocines de Classe IV.

Présentent des protéines complexes et hétérogène sur le plan structurel elle renferme une partie non protéique indispensable à l'activité biologique le plus souvent oligosaccharidique ou lipidique, Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite (Dortu et Thonart, 2009).

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

**Tableau 6 :** Description des différentes classes de Bactériocines.

| Classes                         | Sous classe  | Description   |
|---------------------------------|--------------|---|
| <b>Classe1 : lantibiotiques</b> | <b>(A) 1</b> | <b>Allongè, cationique, membrane active , la charge nette est legerement + ou -</b>   |
|                                 | <b>(A) 2</b> | <b>Allongè, cationique , membrane active et la charge nette est hautement -</b>   |
|                                 | <b>(B)</b>   | <b>Globulaire , inhibe l'activité enzymatique</b>   |
| <b>Classe 2</b>                 |              | <b>Petite ( &lt;10 KDa ), stabilité a la chaleur modèrèe( 100°c) a elevèe (121c), les peptides membrane actives ne contiennent pas la lanthionine</b> |
|                                 | <b>a</b>     | <b>Peptide <i>listeria</i> active avec –Y-G-N-G-V-X-C- près de l'amino- terminus</b>  |
|                                 | <b>B</b>     | <b>Bacteriocines deux peptides</b>  |
|                                 | <b>c</b>     | <b>Bacteriocines autres peptides</b>  |
| <b>Classe 3</b>                 |              | <b>Grand ( &gt;30 KDa) proteines thermolabiles</b>  |
|                                 |              | <b>Bacteriocines complexes : proteines avec lipides et/ou carbohydrates</b>   |

#### **4- La production des bactériocines et leur régulation**

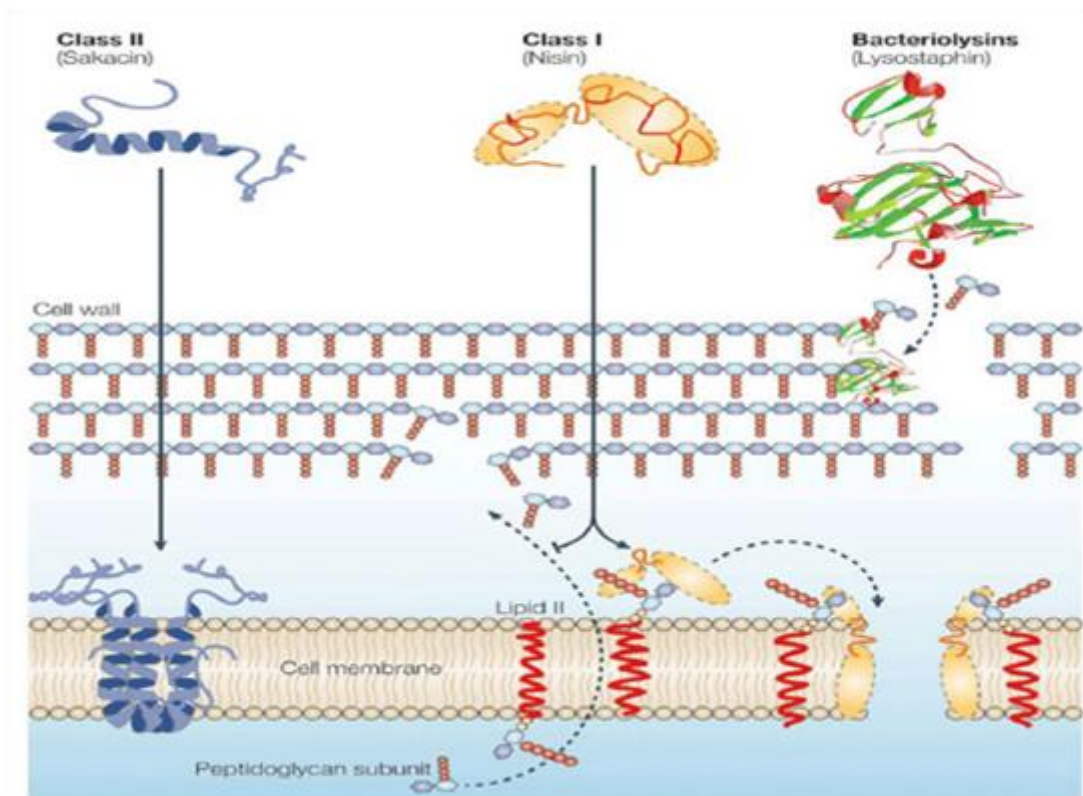
Différentes protéines sont impliquées dans la production des bactériocines et leur regulation. les bactériocines sont produites sous forme d'un prepeptide non – biologiquement actif qui subira des modifications post traductionnelles pour aboutir au peptide actif . cette production est souvent régulée par un système de Quorum Sensing, un mécanisme permettant a certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité de la population bactérienne (Dortu, 2008).

L'ensemble des déterminants génétiques responsables de la production d'une bactériocine sont en général trouvés au voisinage les uns des autres groupés en une ou plusieurs unités transcriptionnelles elles sont pores par des éléments génétiques mobiles (transposons , plasmides ) et exceptionnellement localisés sur le chromosome bactérien (Cenatiempo et al., 1996).

## 5- Les mécanismes d'action des bactériocines

Toutes les bactériocines de bactéries lactiques, dont le mode d'action a été étudié, paraissent agir de façon similaire en formant des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles. la formation des pores dans la membrane cytoplasmique va causer l'efflux rapide de petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP.... (Montville et al ., 1995 ; Dortu et Thonart , 2009 ) qui aura pour conséquences de perturber le potentiel transmembranaire et le gradient pH , a la cessation rapide des activités cellulaires et a la mort de la cellule . certaines bactériocines, comme la nisine ( lantibiotiques) , n'ont pas de récepteurs spécifiques . en effet, la nisine semble se lier aux lipides et phospholipides cationiques présents a la surface de la cellule ( Rink et al ., 2005 ; Moll et al ., 1999). Par contre il semblerait que pour les lactococcines A, B et M. l'initiation de la formation de pores nécessite la présence d'un récepteur spécifique qui permet la fixation de la bactériocine a la membrane cellulaire ( Van Belkum et al ., 1991 ) . de plus, certaines bactériocines, telles que Bacteriocine J46 dont l'activité depend de la presence d'une force proton motrice sur la membrane pour pouvoir s'y lier . certaines bacteriocines ne sont pas actives a pH 7 et donc une activité due a la production d'une bacteriocine pourrait être considérée comme étant due a la production d'acide (Klaenhammer, 1993) .

Gravesen et al ., 2002 ont examiné la resistance de *Listeria monocytogenes* a la classe 2 des bacteriocines et ont trouvé un rapport avec le site spécifique de reconnaissance. Huits mutans de *L. monocytogenes* résistants aux bacteriocines de la classe 2 a , tel que la pediocine PA-1 et la leuocine A, ont été isolés et étudiés. La lactacine 3147 est un lantibiotique constitué de 2 composants , 2 peptides appelés lac 1 et lac 2 (McAuliffe et al ., 1998) ; les deux composants sont nécessaires pour exercer une activité antagoniste complète résultant de la formation de pores ioniques spécifiques dans la membrane de la cellule Gram + cible. McAuliffe et al ., 2000 ont démontré que la lactacine 3147 existe une enzyme de modification séparée pour chacun des prepeptides lac 1 et lac 2.



**Figure 12 :** Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques .

## 6- Spectre d'activité des bacteriocines

Les bacteriocines peuvent être produites par la plupart des espèces de bactéries lactiques et leur spectre d'activité est restreint en général aux bactéries taxonomiquement proches du micro-organisme producteur (Piard et Desmazeaud, 1992)

La plupart des bacteriocines de la classe 1, ont un spectre d'activité relativement large, touchant à la fois à des bactéries lactiques elles-mêmes mais aussi des espèces pathogènes telles que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Clostridium botulinum*. Plusieurs bacteriocines dans cette classe, telles que la nisine et la thermophiline 13, empêchent la germination des spores de *Bacillus cereus* et *Clostridium botulinum*. La plantaricine LP84 (produite par *Lactobacillus plantarum* NCIM2084) a montré un antagonisme contre *Escherichia coli* (Suma et al., 1998)

La plupart des bacteriocines de la classe 2a, ont des spectres d'activité étroits et inhibent seulement des bactéries Gram + apparentées. En général, les membres du genre *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* sont sensibles à cette classe 2a, et les membres du genre *Lactococcus* sont résistants.

## 7- Les applications des bactériocines

Considérées en tant que « GRAS » (Generally Recognized As Safe) et vu leur abondance et leur pouvoir antimicrobien généralement bactéricide, les bactériocines des bactéries lactiques trouvent leur utilisation dans différents domaines où elles empêchent le développement de bactéries pathogènes et nuisibles (Albano et *al.*, 2007).

### 7- 1- Dans le secteur alimentaire

L'utilisation des bactériocines dans les produits alimentaires a connu une forte progression. Du fait que ces substances sont naturelles, sûres (non toxiques pour les cellules eucaryotes et facilement digestibles dans le tractus intestinal), tolérantes aux traitements thermiques et aux variations du pH et agissant à des faibles concentrations, leur application conduit à une prolongation de la durée de conservation des produits alimentaires (Gautam et Sharma, 2009).

Ces molécules bioactives sont incorporées dans les aliments soit directement sous forme purifiée ou semi-purifiée (nisine) ou sous forme de concentré (pédiocine) soit indirectement en appliquant la souche productrice dans le produit alimentaire (production *in situ*), comme elles peuvent être immobilisées par encapsulation ou adsorption.

A l'heure actuelle, seule la nisine est acceptée comme additif (Ghalfi et *al.*, 2006 ; Dortu et Thonart, 2009).

Benkerroum et *al.* (2000) ont démontré la capacité des bactériocines produites par *Lactococcus lactis* de diminuer le nombre de *Listeria monocytogenes* ajoutée expérimentalement au Jben Marocain. Après contamination du Jben avec 107 et 104 UFC.ml<sup>-1</sup>, il a été constaté que la bactériocine entraîne une réduction du nombre de contaminants de 2.7log après 30H dans le premier cas et l'a complètement éliminé après 24H dans le deuxième.

La nisine produite par *Lactococcus lactis* est utilisée dans la production des fromages pour prévenir la fermentation de l'acide lactique en acide butyrique par le genre *Clostridium*, ce qui affecte la saveur et la texture des produits. La nisine est aussi capable d'inhiber les genres : *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria* et *Clostridium* en particulier *Clostridium tyrobutyricum* responsable de la production de gaz dans les fromages semi solides (Walstra et *al.*, 2006).

Cette bactériocine est utilisée également dans la fabrication des : fromages pasteurisés, produits liquides à base d'œufs, sauces, laits frais, bières et conserves (Glazer et Nikaido, 2007).

Etant un milieu riche, la viande est sujette à des contaminations par les microorganismes pathogènes et altérants tels que *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta* et *Clostridium estertheticum* (Jones et al., 2008).

## **7- 2- Dans le secteur sanitaire**

L'usage des bactériocines n'est pas restreint au domaine alimentaire. Celles-ci servent aussi comme agents de thérapie naturelle alternatifs aux antibiotiques (Smaoui, 2010). Suite à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance manifesté par plusieurs bactéries pathogènes (parmi lesquelles certaines sont résistantes à plusieurs antibiotiques à la fois) qui menace la santé publique, les études sont actuellement orientées vers la recherche de nouvelles substances antibiotiques naturelles pouvant résoudre ce problème (Mkrtchyan et al., 2010).

Les bactériocines de la classe IIa présentent un groupe important de peptides antimicrobiens qui peuvent être utilisés en médecine avec les antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses ou comme des agents antiviraux. Ces molécules ont une activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif nuisibles et pathogènes comme *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* (Drider et al., 2006).

Xie et al. (2011) ont rapporté que le Koumiss (produit chinois à base de lait fermenté) est efficace dans le traitement de la tuberculose et des maladies cardiovasculaires et contribue à l'amélioration de l'immunité, et que ces propriétés sont attribuées aux bactériocines produites par les bactéries lactiques indigènes. Dembélé et al. (1998) ont démontré que les bactériocines produites par le genre *Lactobacillus* contribuent à la protection du vagin contre différentes bactéries pathogènes telles : *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua* et *Staphylococcus aureus*.

Tong et al. (2010) ont démontré que la nisine participe dans la prévention et le traitement des caries dentaires en inhibant les microorganismes en cause. La nisine est aussi utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vu sa stabilité aux pH acides et son activité contre *Helicobacter pylori*. Des études récentes ont découvert le rôle des bactériocines produites par *Lactobacillus salivarius* dans la réduction de colonisation du caecal des volailles par *Campylobacter* (Nazef et al., 2008).

# **Partie Pratique**

## **Materiel et méthodes**

### **1-Matériels**

#### **1-Verrerie**

- Tubes à essai
- Béchers 250ml
- Béchers 500ml
- Béchers 50ml
- Erlenmeyer 250ml
- Erlenmeyer 500ml
- Lames et lamelles pour microscope optique
- Pipettes graduées 5ml , 10ml
- Pipette pasteur
- Verre de montre

#### **2-Outils**

- Anse de platine
- Portoir pour les tubes a essai
- Barreaux magnétiques
- Ben benzèn
- Boite de pétri
- Pince
- Spatule
- Autoclave
- Huile à immersio

#### **3-Appareils**

- Balance électrique
- Etuve électrique
- Microscope optique

- Plaque chauffante
- Réfrigérateur (5°C)
- Bain marie

#### **4-substances et milieux de culture**

- Eau distillée
- Eau physiologique (9g/ 1000ml NaCl )
- Colorants de Gram
- L'eau oxygénée
- Glycérol

#### **5- milieux de culture**

- Gélose MRS
- Bouillon MRS
- Milieu muller hinton
- Mannitol mobilité
- Clark et lubs

#### **Matériel Biologique**

Le jben est un produit laitier connu et consommé en Afrique du nord spécialement au Maroc, Tunisie et en Algérie.

Dans les procédures traditionnelles de préparation du jben, le lait cru de vache ou de chèvre est utilisé. Celui-ci est tout d'abord filtré afin d'éliminer les impuretés grossières qu'il peut contenir, puis il est abandonné à lui-même dans une outre de peau de chèvre ou dans une jarre en terre cuite, pendant une durée de 24 à 48h en fonction de la saison, à température ambiante. Après la coagulation du lait, on procède à l'égouttage du coagulum qui est versé dans des sacs de toile fine. Ces sacs sont ensuite suspendus pour laisser s'échapper le lactosérum à température ambiante. La durée de l'exposition du caillé à l'air dépend de la consistance de la pâte désirée. Généralement, la pâte obtenue est purement lactique, elle est souvent mal soudée et très humide (Ennahdi, 1980).



**Figure 13 :** jben traditionnel

## 2-Méthodes

### 2-1-Méthodes d'isolement, purification, conservation et d'identification

#### ➤ Provenance des échantillons

Les échantillons de jben analysés sont pris directement du marché, il s'agit de quatre (4) échantillons de 150 g puis transporté jusqu'au laboratoire dans des conditions d'asepsie satisfaisantes. Ces prélèvements ont eu lieu entre le mois d'avril et mai 2015 dans la région de kenchela

**Tableau 7 :** Les prélèvements des échantillons

| Prélèvements     | Dates      |
|------------------|------------|
| 1 <sup>er</sup>  | 13/04/2015 |
| 2 <sup>ème</sup> | 19/04/2015 |
| 3 <sup>ème</sup> | 04/05/2015 |
| 4 <sup>ème</sup> | 10/05/2015 |

#### ➤ Provenance des bactéries pathogènes

Pour les tests d'activité antibactérienne, nous avons choisi 2 micro-organismes pathogènes (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), ces bactéries sont des souches de référence de la collection du laboratoire d'analyse médicale de l'hôpital de kenchela

#### 2-1-1- L'isolement

Les milieux utilisés au cours de ce travail étaient soit des milieux liquides soit des milieux solides additionnés d'agar agar à 2% pour les milieux solides et 0,7% pour les géloses molles (semi solide).

Le milieu MRS à PH =6,8 a été utilisé pour la croissance de la microflore lactique totale, les lactobacilles sont énumérés sur milieu MRS acidifiés à PH=5,4 ( Man et *al*,1960).

La stérilisation des milieux est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20min.

### **-Préparation des suspensions des dilutions**

A partir de 1g du Jben, nous avons effectué initialement des dilutions décimales dans l'eau physiologique (NACL 0,9%) de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$

Après plusieurs essais, seules les dilutions  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  sont retenues pour ensemercer le milieu de culture MRS (De Man et *al*, 1960), ce milieu est utilisé pour l'isolement du genre *lactobacillus* coulés en boîtes de Pétri. Ces dilutions permettent de repérer des colonies suffisamment séparées.

L'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 72heures d'incubation, pour chaque échantillon de jben, l'observation des colonies est réalisée simultanément pour toutes les dilutions.

### **2-1-2- Purification**

A partir des colonies isolées sur boîtes de pétrie 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 sont repiquées respectivement sur bouillon MRS et puis sont incubées pendant 48heures, par la suite, on réalise un deuxième isolement sur gélose spécifique à partir de la culture sur le bouillon d'enrichissement.

Après incubation au temps et au température convenables, on vérifie s'il s'agit toujours de même type de colonies que celles isolées dans la première étape et ceci par l'observation de leurs caractères morphologiques

A partir des cultures sur bouillon et à l'aide d'une pipette stérile, on ensemece 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 (Mechai, 1999).

## **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 de 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. Elle a été réalisée par ensemencement des souches isolées sur gélose MRS inclinée en tubes à essais, les cultures pures sont conservées à + 4°C à l'obscurité (Badis *et al.*, 2003). et le renouvellement de cultures se fait tous les trois semaines (Saidi *et al.*, 2002)

### **2-1-4 Tests d'orientation pour l'identification des bactéries lactiques**

Après l'activation des souches isolées par des repiquages successifs, les cultures a étudiés sont prises en phase exponentielle de croissance pour subir les différents tests d'identification.

Des souches bactériennes isolées ont été identifiées par caractérisation physiologique et biochimique selon les critères préconisés par Larpent-Gourgaud *et al.*, (1997) ; Axelsson (2004) ; Hammes et Hertel (2006) ; Teuber et Geis (2006) et Bjorkroth et Holzapfel (2006).

#### **2-1-4-1 Les Tests Morphologiques**

##### **A- Etude macroscopique**

Une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieu solide (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité).

##### **B- Etude microscopique**

L'observation microscopique a grossissement ( $G \times 100$ ) permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (Joffin et leyrat 1996).

##### **C-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 de frottis mettre une goutte d'eau distillée a 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 a coté de la goutte pour la visualiser et la mélanger avec l'eau.

Faire sécher complètement sur plaque chauffante.

### La technique de coloration

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au *violet de cristal*; il est ensuite rincé rapidement à l'eau distillée, traité pendant une minute par une solution de *Lugol*, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 2 à 3 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. À ce stade les cellules gram- seront incolores, les cellules gram+ violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la *fushine* pour colorer les cellules gram- présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif à immersion (grossissement X 100) (Singleton, 1999).

### 2-1-4-2-Les Tests physiologiques et Biochimiques

#### ➤ **Test catalase**

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capable de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ .

Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques (catalase-) des entérobactéries (catalase+). Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O<sub>2</sub>) (Marchal et *al.*, 1991).

#### ➤ **Cytochrome oxydase**

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

Dans le test de cytochrome oxydase, on utilise certains réactifs colorants que l'on substitue à l'O<sub>2</sub> comme receveur d'électrons.

A 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.

La 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.

Lecture de résultat : Immédiate.

Oxydase positive : coloration violette.

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

### ➤ **Nitrate réductase**

Ce test permet de démontrer que les nitrates ont été réduits par l'enzyme nitrate réductase produite par la bactérie, soit par la mise en évidence d'un des produits cataboliques terminaux (nitrite), soit par la disparition des nitrates dans le milieu (Brison, 1971).

Principe : lorsque les nitrates sont réduits en nitrites, ces derniers s'accumulent dans le milieu. En présence de nitrite (No<sub>2</sub>), l'acide sulfanilique (réactif A) et le N, diméthylnaphtylamine (réactif B) vont s'unir pour former un composé rouge.

Lorsque on ajoute les réactifs, les bactéries qui ont réduit les nitrites en azote ou en autres produits donnent une réaction incolore, on va donc vérifier si les nitrates ont été dégradés ou bien sont toujours présents par l'ajout de poudre de zinc qui va réduire les nitrates en nitrites s'ils sont encore présents et donc :

- S'il ya une révélation d'une coloration rouge donc le Zn a réduit les nitrates encore présents en nitrites donc pas de réduction de nitrate par la bactérie ce qui traduit l'absence de la nitrate réductase chez la bactérie.
- S'il y'a une coloration jaune donc les nitrates sont déjà réduits en nitrites par la bactérie ce qui traduit la présence de la nitrate réductase chez la bactérie.

### ➤ **Type fermentaire**

Dans des tubes à essai on a versé un milieu MRS et entreposé des cloches de Durham pour mettre en évidence la production de gaz. Ensuite on a ensemencé les souches. Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO<sub>2</sub>, par contre les souches hétérofermentaires vont produire l'acide lactique et le CO<sub>2</sub> a proportions égales (Carr et *al.*, 2002).

### ➤ **Urée-Indole**

Une suspension dense de bactéries est introduite dans 0,5 ml de milieu Urée-Indole, l'incubation se fait à 30°C±1°C pendant 24 à 48 h.

- Un virage de milieu au rouge violacé ou au rouge rose indique une réaction d'uréase positive.
- Deux gouttes de réactif de Kovacs sont additionnées. L'apparition d'un anneau rouge indique une réaction d'indole positif (Marchal et *al.*, 1991).

### ➤ **Milieu Mannitol-mobilité**

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. On a ensemencé les souches étudiées dans le milieu par piqûre centrale, et incubé à 30°C±1°C pendant 18 à 24h. Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol, une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (Marchal et *al.*, 1991).

### ➤ **Tests de croissance à différentes températures**

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles et les bactéries lactiques thermophiles. D'autre part, ce test permet aussi de distinguer entre les deux sous genres homofermentaires du genre *Lactobacillus* : *Thermobacterium* et *Streptobacterium*.

Les tubes à essais contenant MRS sont ensemencés à l'aide d'une anse de platine bouclée par les souches supposées appartenir au genre *Lactobacillus*. L'incubation est réalisée à des températures et des durées différentes ; 15°C pendant 7 à 10 jours et 45°C pendant 24 à 48h (Leveau et al., 1991).

### ➤ **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 ceci pendant 48h. La présence d'une trouble indique la croissance bactérienne (FIL-norme, 1994).

### ➤ **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 24h. Pour ces bactéries, la réaction positive se traduit par la présence du gaz à 1/10 du volume de la cloche (Leveau et al., 1991).

### ➤ **Hydrolyse de l'arginine (ADH)**

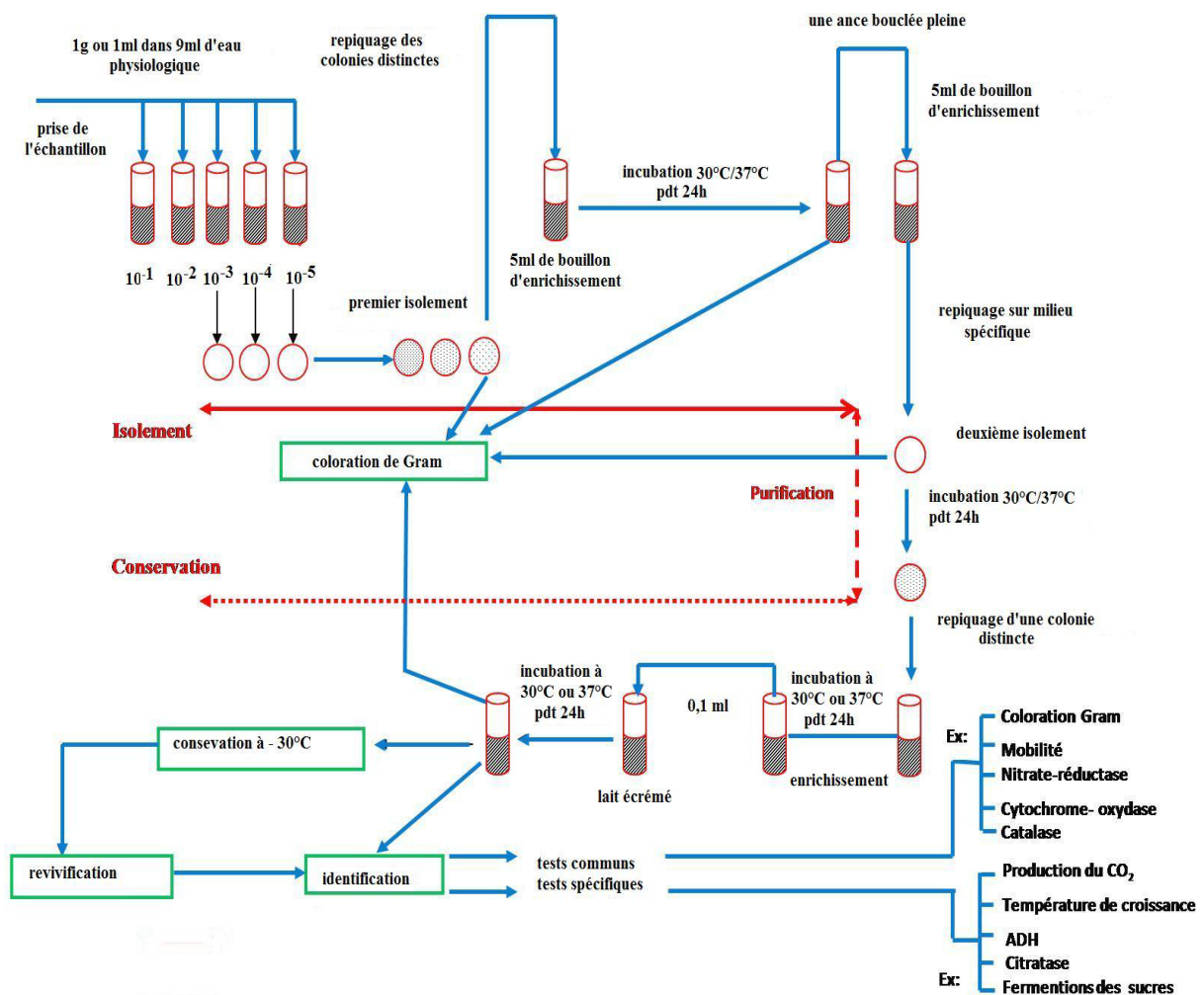
Elle est mise en évidence sur un milieu de Moeller ( **Moeller , 1955 ; Harrigan et McCance, 1976**), pour chaque souche isolée ensemencée ; un tube de bouillon Moeller arginine et un tube témoin (Moeller sans arginine ) recouvrir le milieu avec 4 à 5 mm d'huile de paraffine stérilisée. Après 2 à 6 jours d'incubation à 30 °C la culture dans le tube témoin se manifeste par un virage au jaune dû à l'acidification du milieu (métabolisme du glucose) (**Larpent –Gourgaud et al ., 1997 ; Carr et al ., 2002**) . La dégradation de l'arginine aboutissant à la formation d'ammoniac est révélée par alcalinisation du milieu qui devient violet.

### ➤ Production d'acétoïne

La recherche d'acétoïne est testée par la réaction de Voges Proskauer (VP) ( **Harrigan et McCance , 1976 ; Zourari et al .,1991 ; Facklam et Elliot , 1995** ) après une culture de 24 h à 30 °c sur milieu Clark et Lubs .

Ajouter 5 gouttes du réactif VP1 (solution de soude NaOH à 16 % dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VP2 (alpha naphthol à 6% dans l'alcool à 95°). Agiter soigneusement les tubes et attendre un temps maximum de 10 min.

La présence d'acétoïne se traduit par une coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu.



**Figure 14:** Protocole d'isolement, de purification et d'identification des bactéries lactiques

### ➤ 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).

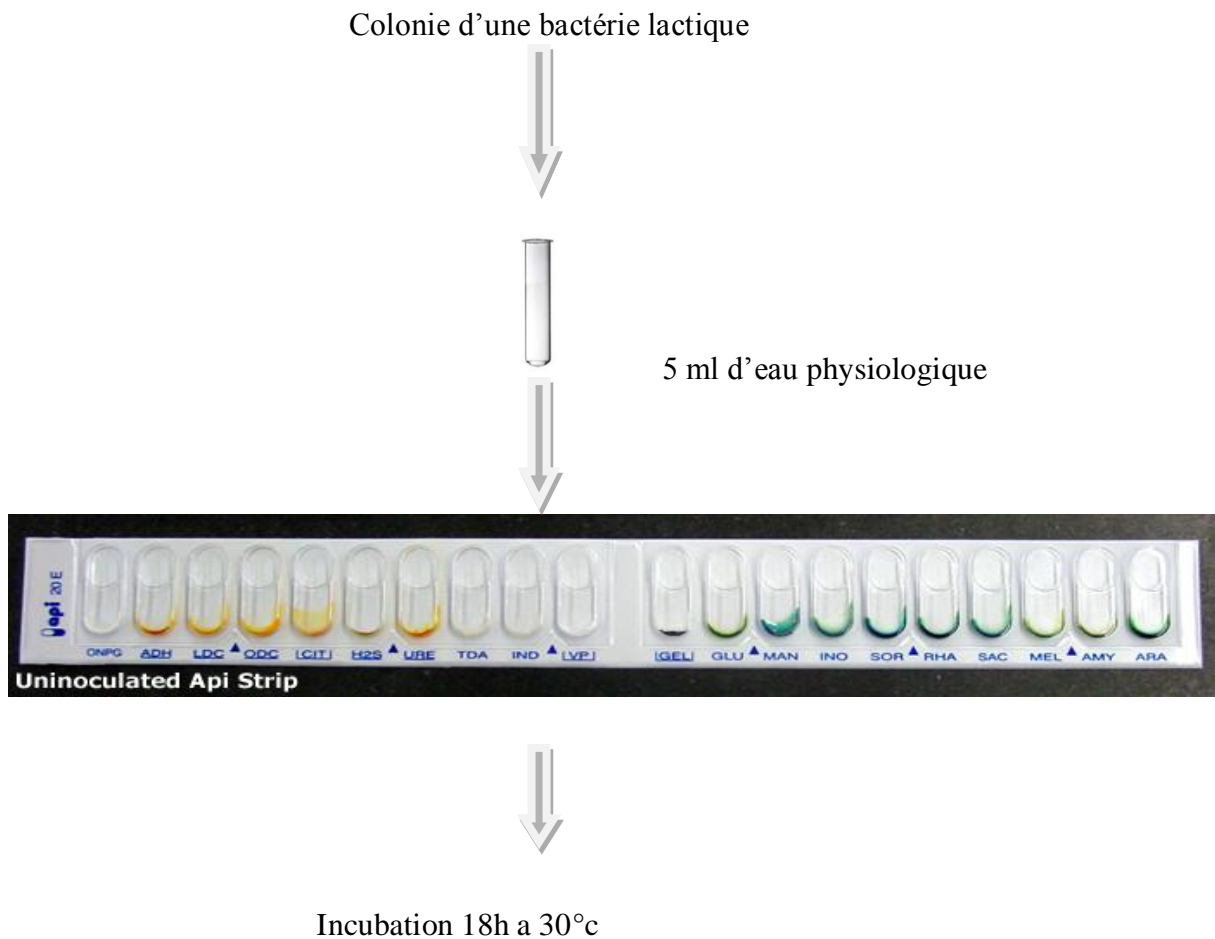
La faculté d'une bactérie à utiliser un sucre comme source d'énergie s'accompagne généralement par la production de l'acide qui conduit à l'abaissement du pH dans le milieu (Leveau et *al.*, 1991)

La technique consiste à ensemencer les souches testées dans des tubes correspondant 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 la dégradation du sucre (Carbonnelle et *al.*, 1990).

➤ **L'identification par galerie API 20 E**

On a utilisé ce type de galerie biochimique malgré qu'elle ne corresponde pas aux bactéries lactiques afin de tester quelques caractères de cette dernière.



La lecture : il faut signaler qu'il y a des résultats exigent l'ajout des réactifs tel que le test TDA, VP, IND .

## **2-2-Mise en évidence de l'activité antimicrobienne**

Dans cette partie, on réalise les interactions entre les souches lactiques et les souches pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *Esherichia coli*) 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 surnagent de la bactérie productrice.

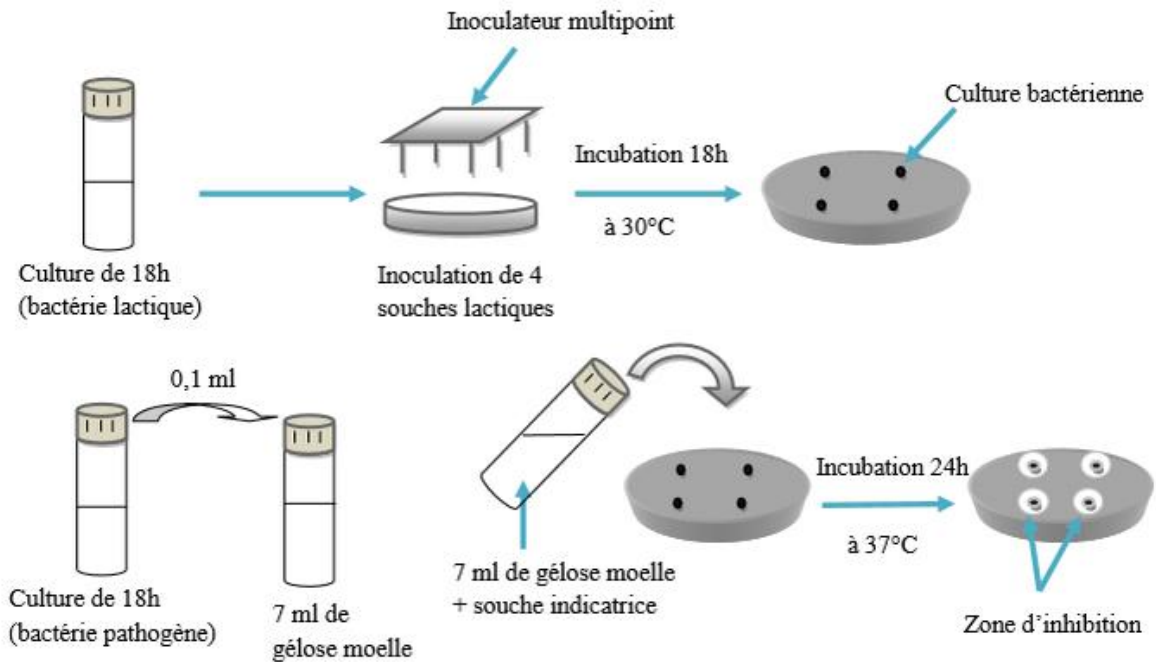
Préalablement on procède à la préparation des pré-cultures des bactéries pathogènes qui sont cultivées à 37°C pendant 18 à 24h.

La recherche d'éventuelle production de substances inhibitrices par les bactéries isolées est réalisée selon deux méthodes :

### **2-2-1-Méthode directe (méthode de double couche)**

Méthode décrite par **Fleming et al., 1985** : une boîte contenant le milieu MRS estensemencée par touche d'une culture de bactéries lactiques, l'incubation se fait à 30°C±1 jusqu'à l'obtention de colonies confluentes (environ 48h). Ensuite, on inocule un tube contenant 10 ml de milieu MRS semi-solide (7g d'Agar/l) avec 0,5 ml de la préculture des bactéries pathogènes. Après agitation de tube on coule la deuxième couche de gélose sur les boîtes de Pétri. L'activité antibactérienne est déterminée par mesure des diamètres des zones d'inhibitions après incubation à 37°C±1 pendant 24h.

### Méthode de Fleming *et al.*, 1975



**Figure 15** : Méthode de double couche utilisée pour la recherche des substances antibactériennes

## 2-2-2-Méthodes indirectes

### 2-2-2-1-Méthode des disques

On prépare un bouillon nutritif qui contient les souches pathogènes indicatrices, des coupants de formes lenticulaires à base du papier buvard stérile sont appliqués sur les colonies des souches testées.

Sur des boîtes de pétrie, onensemence les bactéries indicatrices pathogènes par écouvillonnage à l'aide d'un écouvillon stérile, ensuite à l'aide d'un pince stérile, les coupants précédentes imbibées avec les souches des bactéries lactiques sont réappliquées sur les souches pathogènes écouvillonnées, puis l'incubation à 37°C pendant 18 à 24h. Après l'incubation il se produit un halo d'inhibition autour de chaque disque (Tagg et McGiven, 1971).

### 2-2-2-2-Méthode des puits

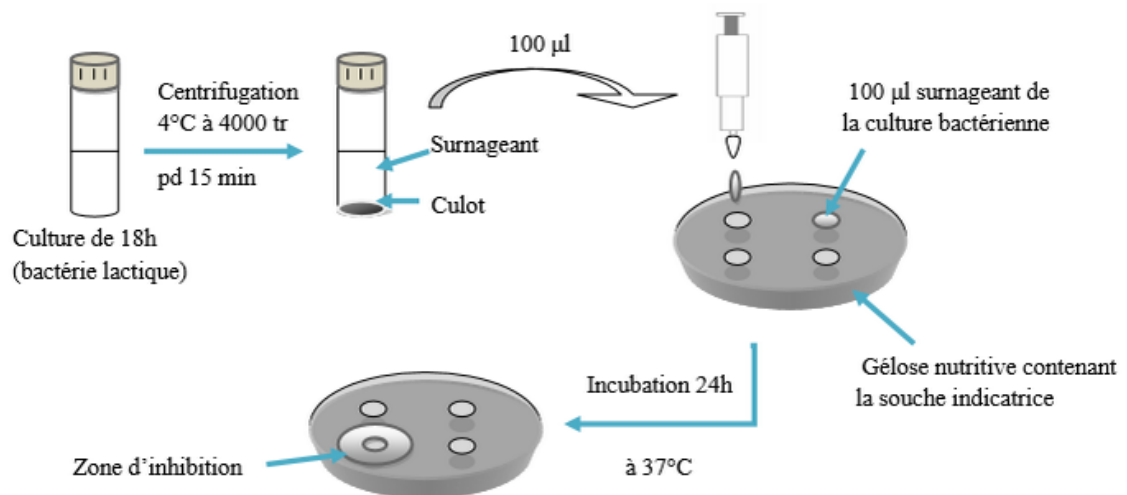
Cette méthode est réalisée sur les bactéries lactiques inhibitrices possédant les plus grandes zones d'inhibition montrant la présence des substances inhibitrices, ces substances peuvent diffusés dans un milieu de culture solide, les bactéries lactiques sont repiquées dans le milieu MRS liquide et incubées pendant une période de 18 à 30°C

Après incubation, une centrifugation réfrigérée 4°C est réalisée à 4000 tr/min pendant 15min.

Des puits de 5mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte pièces sur la gélose nutritive inoculée par la souche indicatrice pathogène et seront remplies avec 100µl du surnageant de culture ou d'extrait cellulaire.

Les boîtes de pétrie sont mises à une température de 4°C/4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (Doumandji et *al.*, 2010).les boîtes sont incubées à 37°C et la présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 24h d'incubation (Hwanhlem et *al.*, 2011).

#### Méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983



**Figure 16:** Méthode des puits.

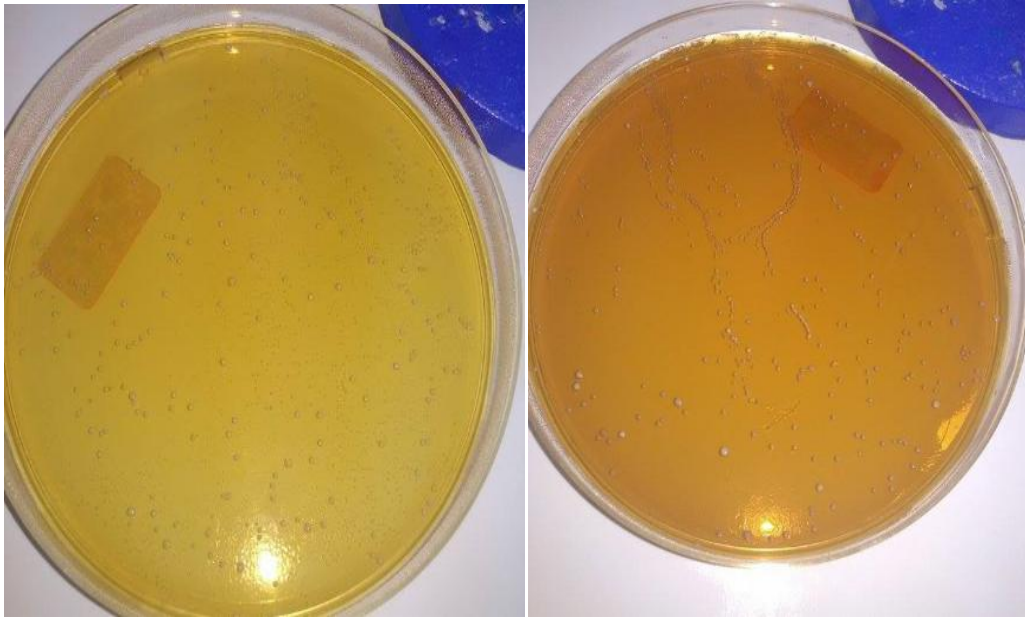
## Résultats et Discussion

### 1. Isolement et identification des souches lactiques

Nous avons réussi à isolé et purifié 07 souches de bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus*.

#### 1.1. Examen macroscopiques

L'examen macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies isolées sur milieu solide MRS et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, pigmentation, contour, aspect et viscosité) (Ana Belen florez et *al.*, 2006), pour les isolats testés, on a observé sur milieu solide de petites colonies d'environ 1 mm à 2 mm de diamètre, de forme lenticulaires de couleur blanchâtres ou laiteuses, avec une surface lisse et un pourtour circulaire régulier (Photo 10, 11).



**Photo 1:** Aspect macroscopique des bactéries lactiques sur milieu MRS après 72h d'incubation.

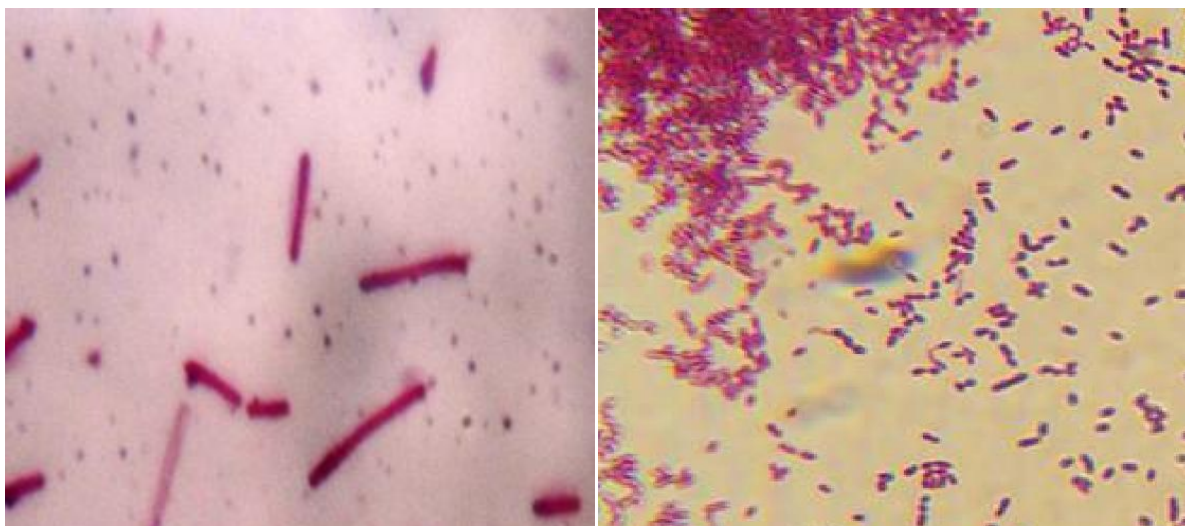


**Photo 2 :** Aspect des colonies des souches sur milieu MRS

### **1.2. Examen microscopiques**

L'aspect microscopique des 07 souches après coloration de Gram a révélée que les sept souches sont des bâtonnets Gram positif, le mode d'association varie d'une souche à l'autre. Sachant que, ces bâtonnets présents des cellules isolées ou regroupées en paire ou en chaînette ( tableau 8).

Ces observations permettent de classer initialement les isolats selon le gram, leurs morphologies cellulaires et leur mode d'association (Joffin et Leyarl, 1996) (Photo 12).



**Photo 3:** Observation microscopique des bactéries lactiques après coloration de Gram

**Tableau 8** : critères morphologiques et le test Gram des sept isolats

| <b>Code de souche</b> | <b>Gram</b> | <b>Forme</b>           | <b>Mode d'association</b>        |
|-----------------------|-------------|------------------------|----------------------------------|
| <b>Souche 1</b>       | +           | <b>Bâtonnets court</b> | <b>En chaine</b>                 |
| <b>Souche 2</b>       | +           | <b>Bâtonnet</b>        | <b>Isolé et diplobacille</b>     |
| <b>Souche 3</b>       | +           | <b>Bâtonnet longs</b>  | <b>En chaine et diplobacille</b> |
| <b>Souche 4</b>       | +           | <b>Bâtonnet court</b>  | <b>En chaine</b>                 |
| <b>Souche 5</b>       | +           | <b>Bâtonnet court</b>  | <b>En chaine et diplobacille</b> |
| <b>Souche 6</b>       | +           | <b>Bâtonnet</b>        | <b>Isolé</b>                     |
| <b>Souche 7</b>       | +           | <b>Bâtonnet longs</b>  | <b>En chaine et diplobacille</b> |

### **1-3-Identification biochimiques et physiologiques des isolats**

En plus de ces tests de bases sur la morphologie des bactéries nous avons utilisé des tests physiologiques et biochimiques pour déterminer le genre de nos isolats.

#### **➤ Tests préliminaires**

Les résultats des tests t biochimiques préliminaires sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 9** : Caractères préliminaires des sept souches isolées

| <b>Tests<br/>Souches</b> | <b>Catalase</b> | <b>Cytochrome<br/>Oxydase</b> | <b>Mobilité</b> | <b>Nitrate<br/>réductase</b> |
|--------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|------------------------------|
| <b>1</b>                 | -               | -                             | -               | -                            |
| <b>2</b>                 | -               | -                             | -               | -                            |
| <b>3</b>                 | -               | -                             | -               | -                            |
| <b>4</b>                 | -               | -                             | -               | -                            |
| <b>5</b>                 | -               | -                             | -               | -                            |
| <b>6</b>                 | -               | -                             | -               | -                            |
| <b>7</b>                 | -               | -                             | -               | -                            |

**- : résultat négatif**

➤ **La croissance à différentes températures et la thermorésistance**

Cette étude de la croissance à 15 et 45C° et le test de la thermoresistance à 63C° pendant 30 min (Badis *et al.*,–2004) permet de faire la différence entre la flore thermophile et mésophile( tableau10)

**Tableau 10:** résultats de croissance des isolats à différentes températures et la thermorésistance.

| Souches  | Culture à 15C° | Culture à 30C° | Culture à 45C° | Nature      | Thermoresistance (63.5C°) |
|----------|----------------|----------------|----------------|-------------|---------------------------|
| Souche 1 | +              | +              | +              | Thermophile | +                         |
| Souche 2 | +              | +              | -              | Mésophile   | -                         |
| Souche 3 | +              | +              | -              | Mésophile   | -                         |
| Souche 4 | +              | +              | -              | Mésophile   | -                         |
| Souche 5 | +              | +              | -              | Mésophile   | +                         |
| Souche 6 | -              | +              | +              | Thermophile | -                         |
| Souche 7 | -              | +              | +              | Thermophile | -                         |

+ : résultat positif, - : résultat négatif

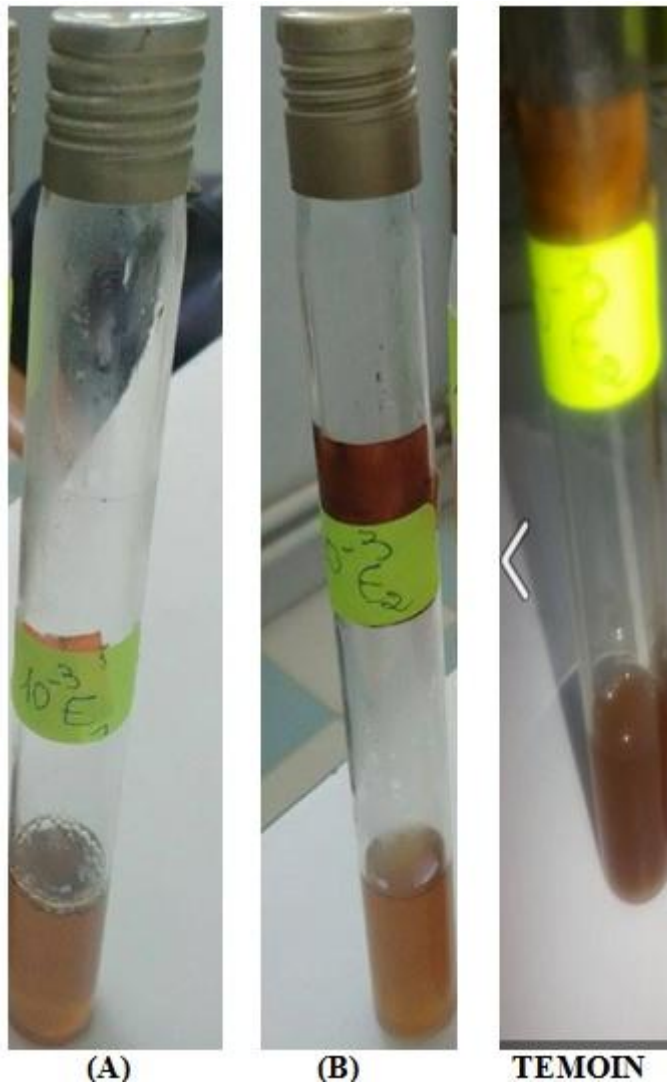
➤ **La croissance à différentes concentration de NaCl**

L'étude de l'effet NaCl nous permet de faire la différence entre les bactéries qui tolèrent la concentration élevée de NaCl et celles qui ne résistent pas cette concentration.(Badis *et al* 2004) (Photo 13).

**Tableau11 :** résultats de croissance des souches à différentes concentration de NaCl

| Souches  | Halotolérance en NaCl à 2% | Halotolérance en NaCl à 4% | Halotolérance en NaCl à 6.5% |
|----------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Souche 1 | +                          | +                          | +                            |
| Souche 2 | +                          | -                          | -                            |
| Souche 3 | +                          | +                          | -                            |
| Souche 4 | +                          | -                          | -                            |
| Souche 5 | +                          | +                          | -                            |
| Souche 6 | +                          | +                          | -                            |
| Souche 7 | +                          | +                          | -                            |

+ : résultat positif, - : résultat négatif



**Photo 4 :** (A) Résultat de test de Température et (B) effet de concentration en NaCl

➤ **Type fermentaire et test ADH**

Ce test (Type fermentaire) nous a permis de différencier entre les souches homofermentaires et les souches hétérofermentaires en utilisant un milieu glucosé stérile qui contient une cloche de Durham, le tableau suivant représente les résultats de ce test. Alors que le test ADH est effectué sur milieu M16PCP a révélé que toutes les souches sont ADH négatives sauf les souches 2 et 5 (Tableau 12).

**Tableau 12** : Résultats du test de type fermentaire sur milieu glucosé et du test ADH

| Souches  | Type fermentaire | ADH |
|----------|------------------|-----|
| Souche 1 | +                | -   |
| Souche 2 | +                | +   |
| Souche 3 | +                | -   |
| Souche 4 | +                | -   |
| Souche 5 | -                | +   |
| Souche 6 | +                | -   |
| Souche 7 | +                | -   |

+ : homofermentaire, - : heterofermentaire      + : résultat positif, - : résultat négatif(ADH)

➤ **Profil fermentaire des sucres**

La détermination des genres et des espèces bactériennes, réside essentiellement dans leur capacité à fermenter les sucres en acides lactique et autres acides organiques. L'analyse des profils fermentaires (tableau 13) une grande diversité métabolique des carbohydrates chez les isolats retenus.

**Tableau 13** : résultats Profil fermentaire des sucres

| Sucres     | Souches |     |     |     |     |     |     |
|------------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|            | S 1     | S 2 | S 3 | S 4 | S 5 | S 6 | S 7 |
| Arabinose  | -       | ±   | +   | +   | +   | +   | ±   |
| Amylose    | nd      | ±   | Nd  | +   | nd  | Nd  | Nd  |
| Fructose   | +       | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Galactose  | +       | +   | -   | +   | -   | +   | +   |
| Glucose    | +       | +   | +   | +   | nd  | +   | +   |
| Glycerol   | nd      | Nd  | Nd  | nd  | +   | -   | -   |
| Lactose    | +       | +   | +   | +   | -   | ±   | ±   |
| Maltose    | -       | +   | -   | +   | +   | +   | ±   |
| Mannitol   | +       | +   | -   | +   | -   | -   | -   |
| Mannose    | -       | +   | -   | -   | -   | ±   | +   |
| Mélibiose  | -       | +   | +   | +   | +   | +   | -   |
| Raffinose  | -       | +   | +   | +   | -   | +   | +   |
| Rhamnose   | nd      | +   | -   | ±   | -   | -   | -   |
| Ribose     | +       | +   | -   | +   | +   | -   | ±   |
| Saccharose | +       | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Sorbitol   | +       | +   | +   | +   | nd  | -   | -   |
| Tréhalose  | nd      | Nd  | +   | +   | -   | +   | +   |
| Xylose     | -       | +   | +   | +   | +   | ±   | +   |

+ : résultat positif, ± : résultat variable, - : résultat négatif, nd : résultat non défini

➤ **Profil fermentaire sur galeries API20E**

Dans le tableau 14, on rapporte les profils de fermentation sur galeries API 20 E des sept souches isolées.

L'identification par galeries API20 E est faite en confirmant les profils obtenus avec les résultats des profils fermentaire de la galerie classique, et en comparant avec les données de la littérature.

**Tableau 14** : résultats du profil fermentaire des souches lactiques sur galerie API20 E

| Souches \ Tests | S 1 | S 2 | S 3 | S 4 | S 5 | S 6 | S 7 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ONPG            | -   | -   | -   | -   | +   | +   | +   |
| ADH             | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   |
| LDC             | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| ODC             | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| CIT             | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| H2S             | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| UREE            | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| TDA             | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| INDOLE          | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| VP              | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| GEL             | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| GLU             | +   | +   | +   | +   | nd  | +   | +   |
| MAN             | +   | -   | +   | -   | +   | -   | -   |
| INO             | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   |
| SOR             | +   | +   | +   | nd  | nd  | -   | -   |
| RHA             | nd  | -   | +   | -   | +   | -   | -   |
| SAC             | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| MEL             | -   | nd  | +   | -   | +   | -   | -   |
| AMY             | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| ARA             | -   | -   | +   | -   | +   | -   | -   |

+ : résultat positif , - : résultat négatif , nd : résultat non défini

**1-3-1- Espèces du genre *Lactobacillus***

Les isolats de *Lactobacillus* ont été classés dans sept 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 regroupes dans **le tableau (9)**. Ces résultats montrent clairement que nos souches isolées répondent aux caractéristiques des bactéries lactiques qui sont Gram<sup>+</sup>, immobiles, catalase<sup>-</sup>, Cytochrome-Oxydase<sup>-</sup>, Nitrate –reductase<sup>-</sup>.

Les résultats des tests d'identifications basés sur les caractères physiologiques et biochimiques comparés aux données bibliographiques de Deroissart (1994), Larpent (1991) nous ont permis de répartir les souches prés identifiés dans les trois sous genres : *Streptobacterium*, *Betabacterium* et *Thermobacterium*, leur répartition par genre est la suivante :

### **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 :

**Deux (S 6, S 7) souches** isolées se rapprochent de l'espèce *Lactobacillus acidophilus* par les propriétés suivantes : elles sont homofermentaires, ne possèdent pas une ADH, hydrolysent l'esculine, capables de se cultiver à 45°C mais pas à 15°C. L'analyse de leurs profils glucidiques ont montré que ces deux souche sont capables de fermenter le glucose, le saccharose, le mélibiose, le fructose et le lactose. Par contre elles sont incapables de fermenter le sorbitol, le ribose, le rhamnose et le mannitol .utilisant la clef d'identification établie par Larpent (1993) pour comparer ces deux souches avec la souche de référence, il ressort que la différence persiste au niveau de la capacité de la souche (**Lb6**) 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.

### **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 .trois espèces appartenant à ce groupe ont été isolées :

**Trois (S2, S3 et S4) 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 possèdent pas une ADH, hydrolyse l'esculine, 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

la xylose, deux souches (S3 et S4) de la totalité des 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.

**Une (S1) souche** isolée a été rapprochée de l'espèce *Lactobacillus paracasei* par les mêmes caractéristiques physiologiques que celles de l'espèce *Lactobacillus plantarum*. cependant, l'analyse de leur profil glucidique montre que cette souche se diffère de l'espèce type par leur pouvoir fermentaire sur le saccharose et le maltose.

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 paracasei* sont capables de fermenter le saccharose. cependant l'incapacité des souches isolées vis-à-vis de la fermentation du maltose pourrait être justifié par les données de Larpent (1991), qui a cité la variabilité de l'espèce *Lactobacillus paracasei* envers la dégradation du maltose.

### **3-Les lactobacilles mésophiles ou thermophiles et hétérofermentaires stricts (*Betabacterium*)**

Les isolats de ce groupe fermentent les hexoses en lactate, acétate et/ou en éthanol et CO<sub>2</sub>. une seule espèce a été rattache au *Lactobacillus brevis*.

**Une (S5) souche** isolée pourrait être attribué à l'espèce *Lactobacillus brevis* Par les caractéristiques suivantes : elle est hétérofermentaire, ne possède pas une ADH, se développe à 15°C mais pas à 45°C, hydrolyse l'esculine. Cette souche fermente le glucose, le saccharose, le mélibiose, l'arabinose, le maltose, le xylose, le fructose et le ribose. Par contre cette espèce est incapable de dégrader le mannitol et le mannose. En comparant les différents caractères de cette souche à ceux de l'espèce témoin, il ressort que la différence persiste dans au moins l'une des deux caractéristiques suivantes : la dégradation du xylose et le sorbitol.

Quant à la capacité de cette souche à dégrader le xylose, Teuber (1992) et Okada et al., (1992) ont souligné que l'espèce *Lactobacillus brevis* donne un résultat variable vis-à-vis la fermentation du xylose. En ce qui concerne la variabilité de l'espèce *Lactobacillus brevis* envers la dégradation du sorbitol, Deroissart (1986), Kandler et Weiss (1986) sont en accord à souligner l'incapacité de cette souche à métaboliser le sorbitol. Le tableau suivant représente les résultats de l'identification des espèces après comparaisons avec clefs

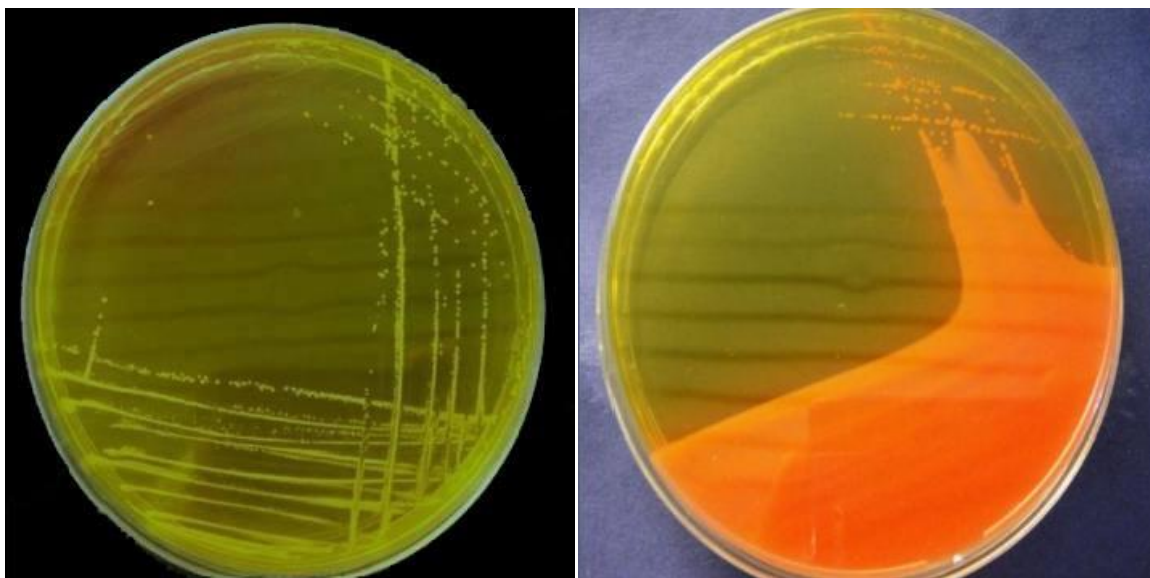
d'identification établie par Larpent (1993), Teuber (1992) Leveau et *al* (1991) et Deroissart (1986), kendler et Weiss (1986).

**Tableau15** : résultats de l'identification finale des souches.

| Souche   | Genre et espèce                  |
|----------|----------------------------------|
| Souche 1 | <i>Lactobacillus paracasei</i>   |
| Souche 2 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   |
| Souche 3 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   |
| Souche 4 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   |
| Souche 5 | <i>Lactobacillus brevis</i>      |
| Souche 6 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> |
| Souche 7 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> |

## 2-Sélection de souches bactériennes productrices d'un facteur antimicrobien autre que les acides organique ou le peroxyde d'hydrogène

Les souches isolées du jben traditionnel ont été testées pour leur capacité à inhiber les bactéries pathogènes Gram négative *Escherichia coli* ATCC 25922 et les Gram positifs *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



(A)

(B)

**Photo 5** : Aspect microscopique des bactéries pathogènes après 24 h d'incubation

(A) : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sur milieu Chapman

(B) : *Escherichia coli* ATCC 25922 sur milieu Hektoine

Sur un totale de (07) souches lactiques criblées pour la production des substances antimicrobiennes en employant la méthode de diffusion en puits ,la méthode des disques

(photo 6,8) et la méthode de double couche ,deux (02) souches ont présentés une activité antagoniste dirigée contre *Staphylococcus aureus* TCC252 et *Escherichia coli* ATCC 25922 et 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 deux (02) bactéries retenues sont identifiées comme suit :

*Lactobacillus plantarum* désignée Souche 3

*Lactobacillus acidophilus* désignée Souche 6

### 3. Facteurs antibactériens produits par les lactobacilles

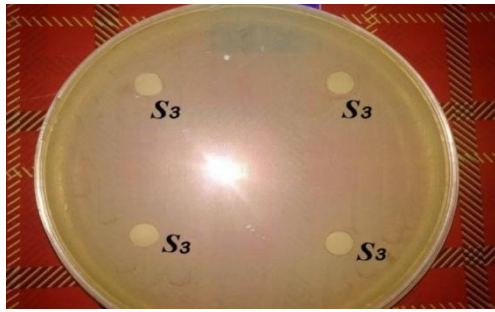
#### 3.1. *Lactobacillus plantarum* S3

Selon Tagget *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-. Les souches bactériennes testées font partie d'espèces et de genres différents ; les bactéries Gram+ et Gram- sont représentées par la méthode des puits et par la méthode des disques.

Remarque : nous signalons que seule la méthode de des disques a été retenue comme méthode de référence pour expliquer les résultats de cette partie.



**Photo 6:** Inhibition obtenue par la méthode des disques de la souche S3 contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



**Photo 7 :** Absence d'inhibition de la souche S3 contre *Escherichia coli* ATCC 25922

**Tableau 16:** Spectre d'activité antimicrobienne présent dans l'extrait de culture (pH 6) souches sélectionnées. (Méthode des disques).

| Souches indicatrices                | Diamètre de zone d'inhibition (mm) |          |
|-------------------------------------|------------------------------------|----------|
|                                     | Souche 3                           | Souche 6 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> TCC252 | 11                                 | 10       |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922  | 00                                 | 00       |

La bactérie Gram+ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) est sensible à l'action du facteur antibactérien produit par *Lactobacillus plantarum* avec des diamètres de zone d'inhibition variés de 9 à 11 mm. (Photo 6) (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, le genre de bactéries Gram- testée (*Escherichia coli* ATCC 25922) n'est pas affectée par la substance inhibitrice produite par *Lactobacillus plantarum* (s6), ce qui est une caractéristique des bactériocines des bactéries Gram+ en général, et lactiques en particulier (photo 6). 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. Selon Bhunia *et al.* (1991), la pédiocine AcH (produite par *P. acidilactici*) interagit avec les acides lipotéchoïques, absents chez les bactéries Gram-. Ces molécules joueraient le rôle de site de réception non

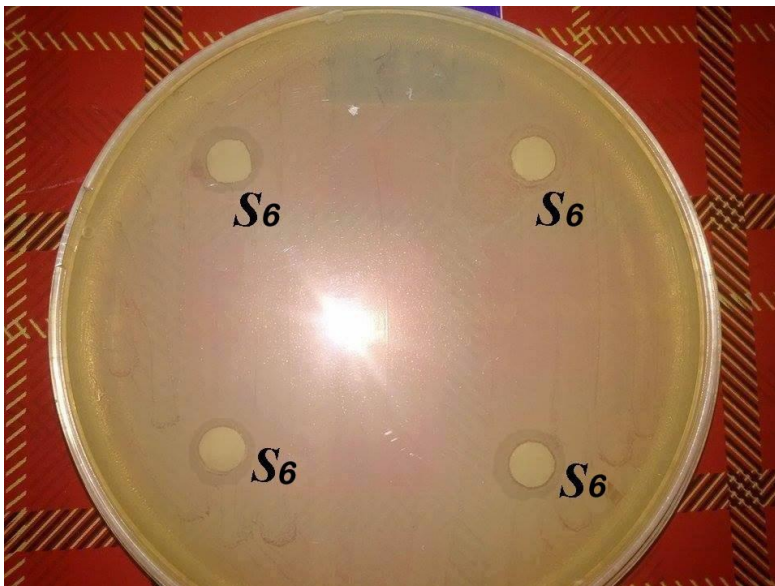
spécifique nécessaire pour produire l'effet bactéricide. Kalchayanand *et al.* (1992) attribuent la résistance des bactéries Gram- à la pédiocineAcH à la barrière que représenterait leur membrane externe. L'incapacité des bactériocines à traverser cette barrière est due à leur poids moléculaire et/ou à leur propriétés hydrophobes (Nikaido et Vaara, 1985 ; Schved *et al.*, 1994).

## 2.2. *Lactobacillus acidophilus* S6

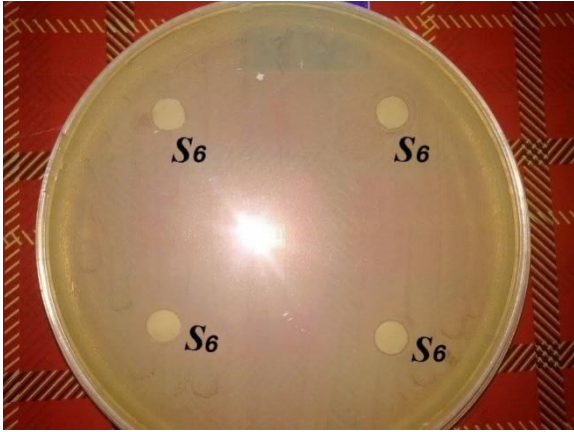
Le facteur antimicrobien produit par *Lactobacillus acidophilus* (s6) engendre une zone d'inhibition de 10 mm de diamètre à l'encontre de *Staphylococcus aureus* TCC252 (Tableau 16) (photo 8)

L'inhibition des souches indicatrices Gram+ (*Staphylococcus aureus* TCC252) 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* ATCC 25922). La résistance des bactéries Gram- à l'encontre de bactériocines de lactobacilles s'explique par les mêmes raisons que celles avancées pour *Lactobacillus plantarum*Lb6 (Photo 9).



**Photo 8:** Inhibition obtenue par la méthode des disques de la souche S6 contre *Staphylococcus aureus* TCC252



**Photo 9** : Absence d'inhibition de la souche S6 contre *Escherichia coli* ATCC 25922

## 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 (Sahlet Bierbaum, 1998). D'autres, comme la lacticine 3147, visent aussi cet usage. De plus, l'usage de certaines bactériocines comme agent thérapeutique a même été soulevé (Ryanet *al.*, 1998).

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 07 souches lactiques appartenant aux genres de *Lactobacillus*.

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 07 souches lactiques présentent le pouvoir de produire des bactériocines dirigées contre *Staphylococcus aureus* ATCC25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922

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

Lors de la caractérisation des bactériocines, le spectre d'activité est similaire dont les deux substances antimicrobiennes inhibent la bactérie Gram+ testée (*Staphylococcus aureus* TCC252). 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) (Kalchayanand *et al.*, 1992).

La nomenclature des bactériocines n'obéissant pas à des règles bien établies (Tagget *al.*, 1976), selon les résultats des tests de caractérisation des substances antimicrobiennes isolées,

il a été décidé de désigner les bactériocines produites par les 6 souches isolées de la façon suivante:

Plantaricine S3 pour la bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* S3.

Acidocine S6 pour la bactériocine produite par *Lactobacillus acidophilus* S6.

## Références bibliographiques

- ✚ **Abee, T., Krockel, L., Hill, C., 1995.** Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J Food Microbiol.* **28**:169-185
- ✚ **Albano, H. (2009).** Evaluation of bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for « Alheira », a fermented meat sausage. *Food Control* , **20**: 764-770
- ✚ **Ana Belen F., et al** Microbienne caractérisation de la traditionnelle espagnole à pâte persillée fromage de cabrales : identification des dominantes des bactéries lactiques . Eur . Res . Techno. 503-508
- ✚ **Axelsson, 2004.** Lactic acid bacteria : classification and physiology in lactic bacteria microbiological and functional aspects, Salminen S., Wright A.V ., Ouhanch A. 3 Ed ., Marcel Dekker 1-66
- ✚ **Badis, A., et al (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.*30-37
- ✚ **Badis A ., 2004** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races . *Food Microbiological* . 21: 579-588
- ✚ **Bottazi V., 1988.** An introduction to rod – shaped lactic bacteria , *biochimie.*303-3015
- ✚ **Carr, F. et al .(2002).** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Rev. Microbiol.*
- ✚ **De Roissart, 1986.** Bactéries lactiques IN écosystèmes microbiens d'un atelier fermier de sa liaison identification et propriétés des bactéries lactiques . thèse de doctorat université de Rennes – France
- ✚ **De Roissart H ., 1994.** Les bactéries lactiques. 2 volumes, Lorient, 600 p. par volume
- ✚ **Dellagio F., 1994** caractéristiques générales des bactéries lactiques In bactéries lactiques 25-70
- ✚ **Dortu Carine ., 2009** les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconversion des produits alimentaires 143-154
  
- ✚ **Desmazeaud M.J 1992.** métabolisme général des bactéries lactiques. bactéries lactiques . aspects fondamentaux et technologiques 169-207
  
- ✚ **Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., Prévost, H. (2006).** The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol.*
  
- ✚ **Doumandji A., 2010** . purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus* 25-47
- ✚ **De Vuyst Luc , 2007.** Bacteriocins from lactic acid bacteria : production purification and food applications
- ✚ **De Man J.C ., 1960.** A medium for the cultivation of lactobacilli
- ✚ **El-Ghaish., et al (2011).** Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Sci. Technol.*509-516

- ✚ **Gautam, N. 2009.** Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian J. Microbiol.*
- ✚ **Garvie E.I., 1986.** Gram positive cocci \_ Grnus Leuconosctoc . In Bergeys manual 1071-1075
- ✚ **Gilliland S.E 1985.** Cencontrated starter culture In : bacterial starter cultures for foods .145-157
- ✚ **Ghalfi, H., (2006).** Bacteriocins activity by *Lactobacillus curvatus* CWB1-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4°C storage. *J. Food Protection.*
- ✚ **Glazer, A. N. et Nikaido, H. (2007).** Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology. Cambridge University Press, New York.
- ✚ **Hemme Denis., 2004.** Leucostoc , characteristics , use in dairy technology and prospects in functional foods. International dairy journal 467-494
- ✚ **Hwanhlem N., 2011.** Isolation ans screening of lactic acid bacteria from the traditional fermented fish (plasom ) and production of plasom from selected dtrains 401-407
- ✚ **Joffin J.N., 1996.** Microbiologie technique. centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine Bordeaux . France **219-223**
- ✚ **Jones, R., (2008).** Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiol.*
- ✚ **Klaenhammer et al., 2005.** Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health FEMS microbiology reviews 393-404
- ✚ **Klaenhammer et al., 1994 ; Lasagno et al., 2002 ; De Vuyst et Leory, 2007).** activité antimicrobienne des bacteries lactiques. 353-366
- ✚ **Klein G., 1998.** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria international . journal of food microbiology
- ✚ **Larpent, J.P., (1997).** Mémento technique de microbiologie .3eme Ed. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 910 pages
- ✚ **Leveau J-Y., 1996.** la flore lactique In technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires
- ✚ **Marchal, N et al., (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris.
- ✚ **Marth, E. H., (2001).** Applied dairy microbiology. Marcel Dekker, Inc., New York
- ✚ **Mkrtchyan, H et al., (2010).** Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *Int.J. Antimicrobial Agents.* 255-260
- ✚ **Nazef, et al., (2008).** Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence of anti-*Campylobacter* and anti-*Listeria* activities. *Poultry Science*
- ✚ **Novel G., 1993.** Les bactéries lactiques **In** microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel 170-374

- ✚ **Ouwehand A.C., 2004** . 11 antimicrobial components from lactic acid bacteria : microbial and functional aspect .
  
- ✚ **Pilet M.F ., 2005** . bactéries lactiques **In** bactériologie alimentaire (compendium d'hygiène des aliment ) 219-242
  
- ✚ **Salminen, S et al ., 1998** .of safety of probiotics -- a review. *Int J Food Microbiol*
  
- ✚ **Salimen S., 2004** .human studies on probiotics. What is scientifally proven today ?? **In** lactic acid bacteria : microbial and functional aspects 515-530.
  
- ✚ **Saidi N et al ., 2002** . caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides d'Algérie
  
- ✚ **Tagg, J. R et al ., (1976)**. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*722-756
  
- ✚ **Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J. (2006)**. Dairy science and technology. Taylor &Francis, N
  
- ✚ **Yateem, A et al ., (2008)**. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Sci.* , **3**: 194-199.

## Annexes

### ANNEXE 1 : matériels



**Photo 10 :** verre de montre



**Photo 11 :** Becher



**Photo 12:** pipette graduée



**Photo 13:** anse de platine



**Photo 14 :** Bain marie



**Photo 15:** Bec bunzen



**Photo 16:** Etuve

MRS



**Photo 17:** Bouillon MRS



**Photo 18:** Gélose

## Annexe 2 : Procédés de fabrication de Jben

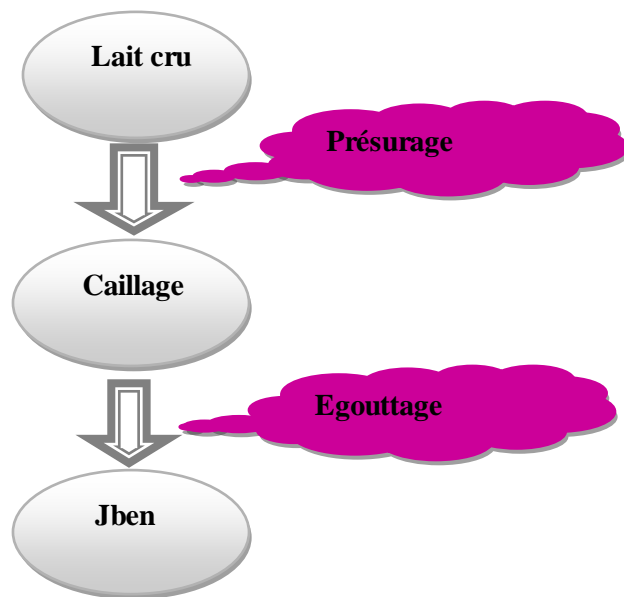


Figure 17 : Préparation d'un produit laitier traditionnel

## Annexe 3 : composition des solutions de diluants

- **Eau physiologique peptonée**

Peptone ..... 1g  
Chlorure de sodium ..... 8,5g  
Eau distillée ..... 1000 ml

- **Eau physiologie 9 /ml:**

NaCl ..... 9g  
Eau distillée ..... 1000 m

**Annexe 4:** Composition des milieux de cultures (g/l)

• **Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)**

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| Extrait de levure .....               | 5g      |
| Extrait de viande .....               | 5g      |
| Peptone .....                         | 10 g    |
| Acétate de sodium.....                | 5g      |
| Citrate de sodium .....               | 2g      |
| Glucose .....                         | 20g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | 2g      |
| MgSO <sub>4</sub> .....               | 0.1 g   |
| MnSO <sub>4</sub> .....               | 0.05 g  |
| Agar .....                            | 12g     |
| Tween80 .....                         | 1 ml    |
| Eau distillée q.s.p .....             | 1000 ml |

pH=6.5±0.2 à 37°C Autoclavage : 121°C /15min.

• **Mannitol-mobilité**

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| Peptone trypsique de viande ..... | 20 g    |
| Agar.....                         | 4 g     |
| Mannitol .....                    | 2 g     |
| KNO <sub>3</sub> .....            | 1 g     |
| Rouge de phénol à 1 %.....        | 4 ml    |
| Eau distillée q.s.p .....         | 1000 ml |

pH=7.6-7.8

- **Gélose- Glucose – Lactose –Saccharose – H<sub>2</sub>S( Ou milieu TSI )**

|                                  |                |
|----------------------------------|----------------|
| Extrait de viande de boeuf ..... | 3 g            |
| Extrait de levure .....          | 3 g            |
| Peptone .....                    | 20 g           |
| Chlorure de sodium .....         | 5 g            |
| Citrate ferrique .....           | 0,3 g          |
| Thiosulfate de sodium .....      | 0,3 g          |
| Lactose .....                    | 10 g           |
| Glucose .....                    | 1 g            |
| Saccharose.....                  | 10 g           |
| Rouge de phénol .....            | 0,05 g         |
| Agar.....                        | 12 g           |
| Eau distillée q.s.p .....        | 1000 ml pH=7,4 |

- **Esculine**

|                                 |                |
|---------------------------------|----------------|
| Polypeptone .....               | 10g            |
| Extrait de levure .....         | 5g             |
| Acétate de sodium .....         | 5g             |
| Tween 80 .....                  | 1 ml Mg        |
| SO <sub>4</sub> .....           | 0.05g Mn       |
| SO <sub>4</sub> .....           | 0.2 g          |
| Esculine .....                  | 5g             |
| Citrate de fer ammoniacal ..... | 0.5 g pH = 6.5 |

## Milieux liquides

- **MRS -Bouillon**

|   |                 |
|---|-----------------|
| Peptone .....                           | 10g             |
| Extrait de viande .....                 | .8g             |
| Extrait de levure .....                 | 4g              |
| Glucose .....                           | 20g             |
| Acétate de sodium trihydraté .....      | 5,0 g           |
| Citrate d'ammonium .....                | 2,0 g           |
| Tween 80 .....                          | 1,0 ml          |
| Hydrogénophosphate de potassium .....   | 2,0 g           |
| Sulfate de magnésium heptahydraté ..... | 0,2 g           |
| Sulfate de manganèse tétrahydraté ..... | 0,05 g pH = 6.2 |

- **Clark et Lubs**

|   |               |
|---|---------------|
| Peptone tryptique ou poly peptone ..... | 5 – 7 g       |
| Glucose .....                           | 5 g           |
| Phosphate dipotassique .....            | 5 g           |
| Eau distillée q.s.p .....               | 1000 ml pH =7 |

- **Urée –Indole**

|                                       |      |
|---------------------------------------|------|
| L-tryptophane.....                    | 3 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | 1 g  |
| K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....  | 1 g  |
| NaCl .....                            | 5 g  |
| Urée .....                            | 20 g |

Alcool à 95° ..... 10 ml  
Rouge de phénol à 1% ..... 2,5 ml  
Eau distillée q.s.p ..... 1000 ml

### **Les colorants**

- **Violet de gentiane au cristal**

Violet de gentiane ..... 10g (ou 5g)  
Phénol ..... 20g  
Ethanol à 0.95 ..... 100 cm<sup>3</sup>  
Eau distillée ..... 1 dm<sup>3</sup>

Les 3 premiers composants sont dans un premier temps dissous ensemble d'eau est ajoutée ensuite.

- **Lugol**

Iode ..... 5g  
IO dure de potassium ..... 10g  
Eau distillée qsp ..... 1g

Flacon brun

- **Fuchsine de Ziehl**

Fuchsine basique ..... 10g  
Phénol ..... 50g  
Ethanol à 0.5 ..... 10cm<sup>3</sup>  
Eau distillée ..... 1dm<sup>3</sup>

**Annexe 5 : Tableaux des Résultats**

**Tableau 14:** Résultats du profil fermentaire des souches lactiques sur la galerie API 20 E

| Souches<br>Tests | Souche 1 | Souche 2 | Souche 3 | Souche 4 | Souche 5 | Souche 6 | Souche 7 |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| OMPG             | -        | -        | -        | -        | +        | +        | +        |
| ADH              | -        | +        | -        | +        | -        | -        | -        |
| LDC              | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| ODC              | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| CIT              | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| H2S              | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| UREE             | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| TDA              | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| INDOLE           | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| VP               | +        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| GEL              | -        | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| GLU              | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        |
| MAN              | +        | -        | +        | -        | +        | -        | -        |
| INO              | -        | -        | -        | -        | +        | -        | -        |
| SOR              | +        | +        | +        | +        | +        | -        | -        |
| RHA              | -        | -        | +        | -        | +        | -        | -        |
| SAC              | +        | +        | +        | +        | +        | +        | +        |
| MEL              | -        | -        | +        | -        | +        | -        | -        |
| AMY              | -        | +        | +        | +        | +        | +        | +        |
| ARA              | -        | -        | +        | -        | +        | -        | -        |

**Tableau 15 :** résultats de l'identification finale des souches.

| Souche   | Genre et espèce                  |
|----------|----------------------------------|
| Souche 1 | <i>Lactobacillus paracasei</i>   |
| Souche 2 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   |
| Souche 3 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   |
| Souche 4 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   |
| Souche 5 | <i>Lactobacillus brevis</i>      |
| Souche 6 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> |
| Souche 7 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> |

**Tableau 16** : spectre d'activité antimicrobienne

| <b>Souches indicatrices</b>            | <b>Diamètre de zone d'inhibition (mm)</b> |          |
|--|---|----------|
|  | Souche 3                                  | Souche 6 |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>TCC252 | 11  | 10       |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922     | 00  | 00       |

---

---

---

---

## Résumé

En Algérie, le Jben, le produit laitier traditionnel, est consommé soit tel qu'il est, ou après un séchage afin de prolonger sa durée de conservation. Il contient une microflore variée qui constitue une ligne de défense par la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène et de bactériocines.

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis plusieurs siècles comme des agents protecteurs dans les aliments fermentés, Ces bactéries ont un rôle dans la préservation des aliments, la prévention d'empoisonnement, l'augmentation de la valeur nutritive et l'amélioration de la qualité organoleptique des aliments.

Les espèces des bactéries lactiques sont présentes dans une grande variété des aliments tels que : le lait fermenté, le jben, le yaourt, les fromages et les produits carnés fermentés.

Les tests biochimiques de notre étude ont montré sept souches de bactéries lactiques qui ont été identifiées à partir du jben dans la région de kenchela et ont été isolés sur le milieu MRS à des températures d'incubation de 37°C pendant 24 à 72h. Les souches ont pu être identifiées au genre *Lactobacillus*, et qui appartiennent essentiellement aux espèces : *Lb.plantarum*, *Lb.acidophilus* ; *Lb.brevis* et *Lb.paracasei*.

Les deux espèces *Lb.acidophilus* et *Lb.brevis* ont montré une activité antibactérienne par la sécrétion de substances telles que les bactériocines contre les souches pathogènes testés : *Staphylococcus.aureus* et *Escherichia.coli* détectée par l'apparition des zones d'inhibition autour de ces dernières. Ainsi que la 3<sup>ème</sup> espèce *Lb.plantarum* a montré une activité antibactérienne dominante contre la souche pathogène *Staphylococcus aureus*.

Les bactéries lactiques, En tenant compte de leur activité Antibactérienne marquée et de leur large spectre d'activité contre les bactéries indésirables, essentiellement les souches isolées dans cette étude pourraient être des candidats potentiels utilisables dans la bioconservation des produits alimentaires et dans la transformation biotechnologique du lait.

Mots clés : Jben, Souche de Bactéries lactiques, zones d'inhibition, activité antibactérienne, bactériocines, les bactéries indésirables.

## Abstract

In Algeria, the Jben is consumed is such that it is, or after drying in order to prolong its shelf life. It contains a diverse microflora which constitutes a line of defense by the production of lactic acid, hydrogen peroxide and bacteriocins. it contains the mesophilic flora total and the lactic flora of this product traditional dairy have been carried out.

Lactic acid bacteria have been used for centuries as protective agents in fermented foods These bacteria have a role in food preservation, prevention of poisoning, increasing the nutritional value and improving the organoleptic quality of foods.

Species of lactic acid bacteria are present in a wide variety of foods such as fermented milk, Jben, yoghurt, cheese and fermented meat products.

The physicochemical analyzes of our study showed seven strains of lactic acid bacteria that have been identified from Jben in khenchela and were isolated on MRS medium at incubation temperatures of 37 ° C for 24 to 72h. The strains were identified to the genus *Lactobacillus*, which many species of *Lb.plantarum*, *Lb.acidophilus*; *Lb.brevis* and *Lb.paracasei*.

Both species *Lb.acidophilus* and *Lb.brevis* showed antibacterial activity by the secretion of substances such as bacteriocins against pathogenic strains tested: *Staphylococcus.aureus* and *Escherichia.coli* detected by the appearance of zones of inhibition around them. And the third species *Lb.plantarum* showed a dominant antibacterial activity against the pathogenic strain *Staphylococcus aureus*.

Lactic acid bacteria, Considering their activity Antibacterial marked and their potential high of activity make 'them Good candidate in Food preservation and bio industrial biotechnological transformation of milk.

Keywords: Jben, lactic bacteria strain, inhibition zones, antibacterial, bacteriocins , undesirables bacteria.

## ملخص

في الجزائر الجبن هو المنتج الحليبي التقليدي يستهلك كما هو او بعد تجفيف من اجل تمديد مدة صلاحيته يحتوى على كائنات مجهرية متنوعة التي تكون خط الدفاع بإنتاج الحمض الحليبي و بيروكسيد الهيدروجيني و بروتينات البكتيرية البكتيريا الحليبية تستعمل منذ قرون كعوامل حماية في الاغذية المخمرة هذه البكتيريا لها دور في المحافظة على الاغذية و الحماية من التسمم و زيادة القيمة الغذائية و تحسين نوعية العضوية للأغذية.

أصول البكتيرية الحليبية موجودة في أنواع كثيرة من الأغذية مثل الرايب الجبن الياغورته الفرماج و المنتجات المخمرة.

التحليلات الفزيوكيميائية لدراستنا وضحت سبعة اصول من البكتيريا الحليبية التي تمت مطابقتها عن طريق الجبن ف وعزلت في وسط mrs في درجات الحرارة للحضانة في 37 مدة 24 حتى 72 ساعة.

الاصول تمت مطابقتها للنوع لاكتو باسيل و الذي ينتمي الي لاكتو باسيل بلانتاغو لاكتو باسيل اسيدوفيلوس لاكتو باسيل بريفيس. ولاكتوباسيل براكسي النوعين اسيدوفيلوس و برافيس بينو نشاط ضد بكتيري بإفراز مواد إنزيمية بكتيرية ضد الاصول المرضية مثل ستافيلوكوك و اشيريشيا كولي. كشفت بظهور مناطق تثبيط حول هذه الاخيرة كذلك النوع الثالث لاكتوباسيل بلانتاغوم بين نشاط ضد بكتيري سائد ضد الاصل المرضي ستافيلوكوك اغيوس . البكتيريا الحليبية. بالأخذ بعين الاعتبار نشاطهم الضد بكتيري المسجل و نطاق نشاطهم الواسع ضد البكتيريا الغير مرغوب فيها خصوصا الاصول المعزولة في هذه الدراسة يستطيعوا أن يكونوا عوامل قوية مستعملة

الكلمات المفتاح هي: جبن. أصل بكتيريا حليبية. منطقة تثبيط. نشاط ضد بكتيري. انزيمات بكتيرية بكتيريا غير مرغوب فيها