



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



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR -KHENCHELA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

FILIERE : BIOLOGIE

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Thème :

**L'étude des potentiels antimicrobiens
(bactériocines) des bactéries lactiques
isolées à partir du lait cru de vache**

Présenté par

MEDDOUR Siham

AZIZI Malika

Encadré par

Mr : THABET Rachid

Soutenu le : 31 Mai 2016

Jury de soutenance :

Président : BENREDJEM Lamia M.A.A Université Abbès_Laghrour khenchela

Promoteur : THABET Rachid M.A.A Université Abbès_Laghrour khenchela

Examineur : BOUTARFA Soumia M.A.A Université Abbès_Laghrour khenchela

Promotion : Juin 2016

**Le travail a été réalisé au niveau du : laboratoire pédagogique de Microbiologie, Université
Abbes Laghrour-Khenchela**

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant, le Miséricordieux, de nous avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de nous avoir permis de Finaliser ce travail dans de meilleures conditions.

Nous tenons à remercier notre encadreur Monsieur THABET Rachid, pour la proposition de ce thème et l'honneur qu'il nous a fait en dirigeant ce travail, pour ses aides, ses conseils, tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Nous voudrions également exprimer notre remerciements à Mme BENRDJEME lamia d'avoir accepté de présider le jury de la soutenance Mme BOUTARFA Soumia et qui nous a fait l'honneur de juger notre travail.

Nous adressons aussi nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation tout au long de ces Cinq ans.

Nous tenons également à remercier tous les membres de Laboratoire pédagogique de l'université de Khenchela pour leur aide.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Enfin, on adresse notre plus sincères remerciements à tous notre proches et amis, qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci 



Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À :

Mes chères parents, Saïde et Hania qui m'ont beaucoup soutenu et encouragé jusqu'au bout et que Dieu te donne la santé et longue vie.

Mes très chères soeurs : Alima et leur petite Maryoma, Sabah et leur petite fille Zeineb (Mimicha)

Mes chers frères : Yassine, Latif et Rarike

Toute ma grande famille surtout mes grands parents

A mes très chères amies : Samira, Leïla, Siham, Jomana, Djamila Amira, Nadjat, Samira, Lotfi, Lebna, Nadia, Fifi, Hadda, Madiha

A toutes mes camarades de master II Microbiologie.

A tous mes professeurs dans tous les cycles de ma scolarité qui m'ont éclairé la voie du savoir.

Enfin à toutes les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à un moment ou à un autre et qui m'ont accompagné et soutenu.

Et Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

MALIKA

Dédicaces

*Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À :
Mes chères parents, Mon amour papa M'hammed ET ma mère Saïda qui
m'ont beaucoup soutenu ET encourage jusqu'au bout et que Dieu vous
Donne la santé et longue vie.*

A mon chère frère Abd Al hamide

A Mes très chères sœurs : Touta, Waffa, Madjda Et ma chère Saousane

Toute ma grande famille surtout mes grands parents

*A mes chères amies : Hadjer, Ghania, wahiba, Yassmina, Sara, malika
et surtout*

Ma chère adorable amie Nadia Bezza

A toutes mes camarades de master II Microbiologie.

*A tous mes professeures dans tous les cycles de ma scolarité qui mon
éclairé la voit du savoir.*

*Enfin à toutes les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans
Ma vie à un moment ou à un autre et qui m'ont accompagné et soutenu.*

Et Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

STHAM

Liste des abréviations

% : pourcentage
°C : degré Celsius
°D : Degré Dornic
µl : microlitre
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADP : Adenosine Diphosphate
API : Analytic Programme Index
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adénosine Triphosphate
BL : Bacterie lactique
Cm : Centimeter
CO2 : dioxyde de Carbone
g : gramme
G-C : Guanine- Cytosine
GN : Gélose nutritive
GRS : Generally recognised as saf
H2O2 : l'eau oxygénée
INO : Inositol
Lb : <i>Lactobacillus</i>
Lc : <i>Lactococcus</i>
Ln : <i>Leuconostoc</i>
ml : millilitre
MRS : Man Rogosa Sharpe
M17 : Milieu complexe à base d'extrait de viande, de peptone et d'extrait de levure.
Na CL : chlorure de sodium
AD+/ NADH, H+ : Coenzyme d'oxydoréduction
Na OH : Hydroxyde de sodium
PH : potentiel Hydrogène
SOR : sorbitol
Sp : espèce non précisée

Liste des annexes

Annexe
Annexe 01: milieux de culture
Annexe 02: Coloration de Gram
Annexe 03 : Figure présente Protocole d'isolement, de purification et d'identification des souches lactiques
Annexe 04 : les photos

Liste des figures

Figures	Page
Figure 01 : Forme bacille ; <i>Lactobacillus Rosell-11</i> observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x 10000).	10
Figure 02 : forme coque ; <i>Leuconostoc lactis</i> observé au M.E.T. (x 10000).	10
Figure 03: Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARNr, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible % G+C et les genres Gram positifs non reliés <i>Bifidobacterium</i> et <i>Propionibacterium</i>	14
Figure04 : A : <i>Streptococcus</i> , B : <i>Lactococcus sp</i> , C : <i>Pediococcus pentosaceus</i> , D : <i>Lactobacillus casei</i> . E : <i>Enterococcus faecalis</i> , F : <i>Lactobacillus casei</i> .	18
Figure 05: différente forme microscopique de bactéries lactiques obtenues au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran par Saidi, (2007). De gauche – droite, Diplocoques (<i>Leuconostoc sp.</i>), (<i>Lactobacillus sp.</i>), streptocoques et diplocoques (<i>Lactococcus lactis sp.</i>)(Grossissement x 1000).	21
Figure 06: le Rôle des bactéries lactiques dans le domaine thérapeutique	23
Figure 07: Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2)	31
Figure 08 : Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques	34
Figure 09: Les mécanismes cellulaires de production des bactériocines de classe II	36
Figure 10: schéma de la méthode de diffusion en puits	50

Liste des Photographies

Photos	page
Photos 01 : Aspect des colonies de bactéries lactiques sur gélose MRS.	52
Photos 02 : Aspect microscopique après la coloration de Gram (grossissement X100)	52
Photo 03 : Résultat de test de Mannitol Mobilité [A] et le témoin [B].	53
photo04 : Test nitrate réductase	53
Photo 05 : Résultat de test de type de fermentation par Cloche de Durham	54
Photo 06 : Résultat de la Galerie API20 E	55
Photo 07 : Inhibition obtenue par la méthode des disques de la souche <i>Lactobacillus acidophilus</i> ST ₂ contre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 (A) et <i>Bacillus subtilis</i> ATCC21332 (B)	61
Photo 08 : Inhibition obtenue par la méthode des disques de la souche <i>Lactococcus lactis</i> LCL ₅ contre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 (C) et <i>Bacillus subtilis</i> ATCC21332 (D)	63

Liste des tableaux

Tableau	page
Tableau 1: la composition moyenne du lait des principales femelles laitières (100g)	05
Tableau 02 : Flore originelle du lait cru	08
Tableau 03 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques	19
Tableau 04: Classification des bactériocines de bactéries lactiques	30
Tableau 05: Bactériocines de classe III produites par des bactéries lactiques	33
Tableau 06 : Exemples d'applications des bactériocines comme conservateurs alimentaires	38
Tableau 07: Répartition des prélèvements entre le mois avril et mai 2016	39
Tableau 08 : Souches utilisées dans le test antimicrobien.	49
Tableau 09 : caractères morphologiques des genres présumés des bactéries lactiques isolées.	51
Tableau 10 : caractères préliminaires des souches isolées	53
Tableaux 11: Résultats du test de type fermentaire.	54
Tableau12 : résultats du profile fermentaire des souches lactiques sur galerie API20E	56
Tableau 13 : Résultats du profil fermentaire des hydrates de carbone.	57
Tableau 14 : identification biochimique et physiologique des souches appartenant au	58
Tableau15: spectre d'activité antimicrobienne présente par la Méthode des disques.	60

Sommaire

Liste des abréviations.....	I
Liste des annexes.....	II
Liste des figures.....	III
Liste des photos.....	IV
Liste des tableaux.....	V
Introduction Générale.....	01

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Le lait

1.1. Définition.....	03
1.2. Le lait cru.....	03
1.3. Composition et caractéristiques physico-chimiques du lait.....	03
1.3.1. Caractéristiques physico-chimiques.....	04
1.3.2. Composition chimique du lait.....	05
1.4. Microbiologie du lait cru.....	07
1.4.1. Flore originelle.....	07
1.4.2. Flore de contamination.....	08

Chapitre II : Généralité sur les bactéries lactiques

1. Les bactéries lactiques.....	09
1.1. Définition.....	09
1.2. Caractéristiques principales des bactéries lactiques.....	09
1.3. Habitat des bactéries lactiques.....	11
1.4. Génétique des bactéries lactiques	12
1.5. Taxonomie des bactéries lactiques.....	13
1.6. Classification des bactéries lactiques.....	14
1.7. Exigences nutritionnelles.....	20

1.8. Identification des bactéries lactiques.....	21
1.8.1. Caractères morphologiques et structuraux.....	21
1.8.2. Caractères physiologiques et biochimiques.....	22
1.9. Application des bactéries lactiques.....	22
*Dans l'industrie alimentaire.....	22
* Dans le domaine thérapeutique.....	23
1.10. Intérêts biotechnologiques des bactéries lactiques.....	24

Chapitre III : Les facteurs antimicrobiens

1. Les facteurs antimicrobiens.....	26
1.1. Les acides organiques.....	26
1.2. Peroxyde d'hydrogène.....	27
1.3. Le dioxyde de carbone.....	27
1.4. Le diacétyle.....	28
1.5. Les bactériocines.....	28
1.5.1. Définitions.....	28
1.5.2. Nomenclature	29
1.5.3. Nature.....	29
1.5.4. Caractérisations des bactériocines.....	29
1.5.5. Classification.....	30
1.5.5.1. Bactériocine de Classes I : les lantibiotiques.....	30
1.5.5.2. Bactériocine de classe II.....	31
1.5.5.3. Bactériocines de classe III.....	32
1.5.6. Mode d'action.....	33
1.5.7. La production et conditionnement des bactériocines.....	35
1.5.7.1. Production.....	35
1.5.7.2 .Le conditionnement des bactériocines.....	35
1.5.8. Les applications des bactériocines.....	37
1.5.8.1. les applications des bactériocines dans le secteur alimentaire.....	37

1.5.8.2. Les applications des bactériocines dans le secteur sanitaire.....	38
--	----

PARTIE PRATIQUE

Matériel et méthodes utilisé

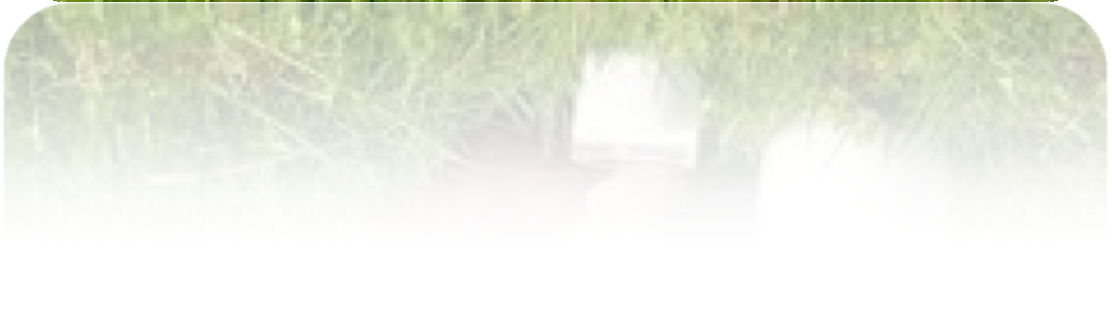
1. Matériel.....	39
1.1. Matériel biologique.....	39
1.1.1. Le lait de vache.....	39
1.1.2. Les souches indicatrices pathogènes.....	39
1.2. Verrerie.....	40
1.3. Outils	40
1.4. Appareillage.....	40
1.5. Réactifs et solutions.....	41
1.6. Milieux de culture.....	41
2. Méthodes.....	41
2.1. Méthodes d'isolement, de purification et de conservation des souches.....	41
2.1.1. Isolement.....	41
2.1.2. Purification.....	42
2.1.3. Conservation.....	43
2.2. Méthodes d'identification.....	43
2.2.1. Les tests communs.....	44
2.2.1.1. Examen macroscopique.....	44
2.2.1.2. Examen microscopique.....	44
2.2.2. Les tests spécifiques.....	46
2.3. Galerie API 20 E.....	48
2.4. Mise en évidence de l'activité bactériocinogène.....	49
2.4.1. Méthode des puits.....	49
2.4.2. Méthode des disques.....	50

Résultats et discussion

1. Isolement et identification des souches lactiques.....	51
---	----

1.1. Identification des souches.....	51
1.1.1. Examen macroscopiques.....	51
1.1.2. Examen microscopiques.....	51
1.1.3. Identification biochimique et physiologiques des isolats	52
1.1.3.1. Testes préliminaires.....	52
1.1.3.2. Testes spécifiques.....	53
1.1.4. Sélection de souches bactériennes productrices d'un facteur antimicrobien autre que les acides organiques ou le peroxyde d'hydrogène.....	59
1.1.4.1. Facteurs antibactériens produits par les lactobacilles.....	60
1.1.4.2. Facteurs inhibiteurs produits par les lactocoques.....	62
Conclusion générale.....	64
Références bibliographique.....	66
les annexes.....	
Résumé.....	

Introduction



Introduction

Le lait est un produit indispensable à l'équilibre de l'alimentation humaine. Il contient de nombreux nutriments qui fortifient notre organisme : protéines, glucides, lipides, sels minéraux, vitamines et oligo-éléments. Le lait fut de tous temps un symbole de fertilité, de richesse et d'abondance (**Huyghebaert, 2006**). La microflore microbienne du lait cru, composée essentiellement de bactéries lactiques, participe de façon importante à l'élaboration des produits laitiers fermentés (**Chammas *et al.*, 2006 ; Patrignani *et al.*, 2006**).

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 nouvelles molécules de bactériocines produites par les bactéries lactiques essentiellement à partir de biotopes peu explorés comme le lait de vache. Des bactéries lactiques ont été isolées des laits crus et fermentés algériens et identifiées par des tests physiologiques et biochimiques. Dans une deuxième étape, l'effet inhibiteur contre *Satphylococcus aureus*, *Bacillus subtulis* et *Klebsiella oxytoca* et le pouvoir bactériocinogène ont été recherchés au niveau de cette flore lactique.

L'objectif du travail

Dans cette optique nous nous sommes fixé l'objectif de parvenir à la recherche de nouvelles souches de bactéries lactiques capable de produire des substances antimicrobiennes (bactériocines) à partir du lait cru dans la région de Khenchela.

Synthèse bibliographique



1. Lait

1.1. Définition

Le lait est un aliment nutritif pour les êtres humains, indispensable pour le nouveau-né, comme il s'avère très bénéfique pour l'adulte. Il constitue un milieu propice pour la croissance de nombreux micro-organismes, en particulier les bactéries pathogènes (**Chye et al., 2004**). Le lait sans indication de l'espèce animale de provenance correspond au lait de vache (**Larpent et al., 1997**).

Le lait apparaît comme est un liquide, opaque blanc mat, légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre, à l'odeur peu marquée et au goût douceâtre, sécrété, après parturition par la glande mammaire des animaux mammifères femelle, pour nourrir leurs nouveaux nés (**Marcel, 2007**).

D'après le congrès international de la répression des fraudes de 1909, le lait est le produit intégrale de la traite totale ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

1.2. Le lait cru

Le lait cru constitue la matière première de tous les laits. Généralement, est un lait frais non traité par la chaleur ni soumis à aucun autre traitement d'assainissement ou de conservation autre que la réfrigération (**Codou, 1997**). Un lait cru n'a jamais excédé la température de 40°C, c'est –à-dire proche de la température du corps de l'animal. Ce qui a pour conséquence qu'il conserve intégralement sa flore bactérienne (les microbes)

1.3. Composition et caractéristiques physico-chimiques du lait

Les principales propriétés physico-chimiques du lait sont représentées par sa densité, son point de congélation, son point d'ébullition et son acidité. Sur le plan physique, c'est à la fois une solution (lactose, sels minéraux), une suspension (matières azotées) et une émulsion (matières grasses). Son pH est légèrement acide (pH compris entre 6.5 et 6.8 pour le lait de vache et entre 6.2 et 6.82 pour le lait de chèvre). Par contre, il est légèrement basique pour le lait humain (pH compris entre 7 et 7.5), l'acidité du lait augmente avec le temps suite à la transformation du lactose en acide lactique. Cette acidité permet d'avoir un indicateur du degré de conservation. Pour cela, on utilise le degré Dornic (°D) (**Dillon, 2008; Hebboul et al., 2005**).

1.3.1. Caractéristiques physico-chimiques

➤ La densité

Elle oscille entre 1,028 et 1,034. Elle doit être supérieure ou égale à 1,028 à 20°C. La densité des laits de grand mélange des laiteries est de 1,032 à 20°C. La densité des laits écrémés est supérieure à 1,035. Un lait à la fois écrémé et mouillé peut avoir une densité normale (Vierling, 2008).

➤ Acidité

Le pH du lait est souvent de 6,6, il a une tendance légèrement acide, il dépend de l'action des bactéries lactiques qui sont responsables de l'acidité de celui-ci. L'acidité du lait due principalement à la présence de protéines surtout les caséines et la lactalbumine, des substances minérales telles que les phosphates et le CO₂ et les acides organiques le plus souvent l'acide citrique. L'acidité apparente (naturelle) varie entre 13°D et 17°D d'équivalent d'acide lactique (Vignola, 2002).

➤ Point de congélation

Le point de congélation du lait est légèrement inférieur à celui de l'eau, puisque la présence des solides solubilisés abaisse le point de congélation, il peut varier de -0,53 à -0,575°C avec une moyenne de -0,555°C, un point de congélation supérieur à -0,530 °C permet de soupçonner une addition d'eau au lait, on vérifie le point de congélation du lait à l'aide d'une cryoscopie (Vignola, 2002).

➤ Point d'ébullition

On définit le point d'ébullition comme la température atteinte lorsque la pression de vapeur de la substance ou de la solution est égale à la pression appliquée. Ainsi, comme pour le point de congélation, le point d'ébullition subit l'influence de la présence des solides solubilisés, il est légèrement supérieur au point d'ébullition de l'eau, soit 100,5°C. Cette propriété physique diminue avec la pression, on applique ce principe dans le procédé de concentration du lait (Amoit *et al.*, 2002).

Tableau 01 : la composition moyenne du lait des principales femelles laitières (pour 100g) (Kont, 1999).

Espèces	Eau (%)	Protéine(%)	Graisse (%)	Lactose (%)	Cendre (%)
Vache	87,2	3,5	3,7	4,9	0,72
Chèvre	86 ,5	3,6	4	5,1	0,82
Brebis	82,7	5,5	6,4	4,7	0,92
Chamelle	87,5	3,5	3,4	4,2	0,71

1.3.2. Composition chimique du lait

➤ L'eau

L'eau du lait provient du sang par filtration au niveau de la glande mammaire (Codou, 1997) Alors le lait est un mélange complexe constitué à 90 d'eau et qui comprend :

- Une solution varie contenant les sucres, les protéines solubles, les minéraux et les vitamines hydrosolubles.
- Une solution colloïdale contenant les protéines, en particulier les caséines .une émulsion de matières graissent dans l'eau (Florence, 2010).

➤ Matière grasse

Les lipides ou matière grasse sont présents dans le lait sous forme d'une émulsion de globules gras d'environ 1,5 à 20 microns de diamètre (Bouvier, 1993), la matière grasse du lait se compose principalement de triglycérides, de phospholipides et d'une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de β -carotène (Vignola, 2002).

➤ Glucides

Le lactose est le glucide ou l'hydrate de carbone le plus important du lait puisqu'il constitue environ 40% des solides totaux (**Vignola, 2002**), c'est un disaccharide constitué d'une molécule de galactose et d'une molécule de glucose (**Debry, 2001**), il est le constituant

Majeur de la matière sèche du lait, sa teneur s'élève, en moyenne, à 50 g par litre de lait.

D'autres sucres sont également présents mais seulement à l'état de traces (**Veisseyre, 1979**).

Le lactose, a surtout un rôle énergétique et représente environ 30% de la valeur calorique du lait. D'après **Luquet, (1985)**, toute action bactérienne sur le lactose aboutit, soit à un abaissement du pH indispensable dans la fabrication des fromages frais et le lait fermenté, soit à une acidification pour la fabrication fromagère affinée.

➤ Vitamines

Ce sont des molécules complexes de taille plus faible que les protéines, de structure très variées ayant un rapport étroit avec les enzymes, car elles jouent un rôle de coenzyme associée à une apoenzyme protéique. On classe les vitamines en deux grandes catégories :

- les vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C) de la phase aqueuse du lait
- les vitamines liposolubles (vitamines A, D, E, et K) associées à la matière grasse, certaines sont au centre du globule gras et d'autres à sa périphérie (**Debry, 2001**).

➤ Protéines

Le lait est considéré comme une source de protéine .les protéines du lait ont en gros, la même composition que les protéines totales de l'œuf (protéines de référence) sauf en ce qui concerne le taux de méthionine et de cystine, sensible plus bas .En effet, les acides aminés soufrés sont les facteurs limitant du lait . La caséine et, à plus forte, le complexe protidique du lait contiennent en bonne proportion tous les acides amines indispensables à la croissance et à l'entretien .Le lait peut donc remplacer la viande, les poissons et les œufs (**kont, 1999**).

Les protéines sont appelées-la matière azotée- dans le lait est de 30 à 35 grammes par litre, cette matière azotée renferme 95%de protéines et 5% de substances azotées non protéiques.les caséines (phosphoprotéines) représentent 80% des protéines du lait de vache, le reste est constitué de p-lacto-globuline (environ 10% des protéines totales). Lactalbumine (environ2% des protéines totales) et petites quantités d'un grand nombre de protéines diverses (enzymes, immunoglobulines).

Lorsque les caséines sont coagulées, les autres protéines restent en solution en même temps que le lactose et les sels minéraux, constituant ce que l'on appelle le lactosérum.

Par rapport à la matière grasse, le taux de matière azotée est relativement constant, le facteur alimentaire n'intervient presque pas ; ce taux est donc lié à des facteurs génétiques : l'individu et la race. (codou, 1997)

➤ Les minéraux

Le lait une excellent source de minéraux nécessaire pour la croissance du jeune .la digestibilité du calcium et du phosphore est exceptionnellement élevée dans le lait, en partie parce que' ils se trouvent en association avec la caséine.

Ainsi, le lait est la meilleure source de calcium pour la croissance du squelette du jeune et le maintien de l'intégrité des oses chez l'adulte .le fer présente une situation particulière. Il est en quantité insuffisante dans le lait pour couvrir les besoins du jeune, cependant, sa faible concentration permet d'y limiter la croissance bactérienne. (codou, 1997)

1.4. Microbiologie du lait cru

Les microorganismes, principalement, présents dans le lait sont les bactéries. Mais, on peut aussi trouver des levures et des moisissures, voire des virus. De très nombreuses espèces bactériennes sont susceptibles de se développer dans le lait qui constitue, pour elles, un excellent substrat nutritif. Au cours de leur multiplication dans le lait, elles libèrent des gaz (oxygène, hydrogène, gaz carbonique, etc.), des substances aromatiques, de l'acide lactique (responsable de l'acidification en technologie fromagère), diverses substances protéiques, voire des toxines pouvant être responsables de pathologie chez l'homme (**Institut de l'élevage, 2009**). Le lait cru peut être contaminé par différents microorganismes avant, pendant et après la traite ; selon **Betsi et al., (1997) in Chaouch et Tebichek, (2001)** ils peuvent être classés dans les flores suivantes :

1.4.1. Flore originelle

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10³ germes/ml). A sa sortie du pis, il est pratiquement stérile et est protégé par des substances inhibitrices appelées lacténines à activité limitée dans le temps (une heure environ après la traite) (**Cuq, 2007**).

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, les genres dominants sont essentiellement des mésophiles (**Vignola, 2002**). Il s'agit de *microcoques*, mais aussi *streptocoques lactiques* et *lactobacilles*.

Tableau 02 : Flore originelle du lait cru (Vignola, 2002)

Microorganismes	Pourcentage (%)
<i>Micrococcus sp.</i>	30-90
<i>Lactobacillus</i>	10-30
<i>Streptococcus ou Lactococcus</i>	< 10
Gram négatif	<10

1.4.2. Flore de contamination

Cette flore est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire. Ces contaminations par divers microorganismes peuvent provenir de l'environnement : *Entérobactéries*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Microcoques*, *Corynébactéries*, *Bacillus*, etc., par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière (Vignola, 2002).

Chapitre II : Généralité sur les bactéries lactiques

1. Les bactéries lactiques

1.1. Définition

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio organotrophes. C'est-à dire qui requiert des molécules organiques complexes comme source d'énergie (Saad, 2010). Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Le groupe des bactéries lactiques, été défini pour la 1ère fois par Orla –Jensen en 1919, (Novel, 1993).

1.2. Caractéristiques principales des bactéries lactiques

Elles forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (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, 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., et immobiles (Salminen *et al.*, 2004; König et Fröhlich, 2009 ; Pringsulaka *et al.*, 2011). Elles ont des exigences nutritionnelles nombreuses (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) (Holzapfel *et al.*, 2001 ; Gevers, 2002).

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, ces bactéries sont également incapables de fermenter le glycérol (Dellaglio *et al.*, 1994; Salminen *et al.*, 2004).

Les bactéries lactiques peuvent être divisées en deux groupes homofermentaires et hétérofermentaires basées sur les produits fabriqués à partir de la fermentation du glucose.

*Homofermentaires : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose. (Priyanka et Prakash, 2009).

*Hétérofermentaires : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et d'autres composés (éthanol, CO₂ et autres acides organiques) (Vandamme *et al.*, 1996).

En plus de l'acide lactique et des autres acides organiques qui empêchent le développement des microorganismes indésirables par diminution du pH du milieu, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutérine, le dioxyde de carbone et les bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

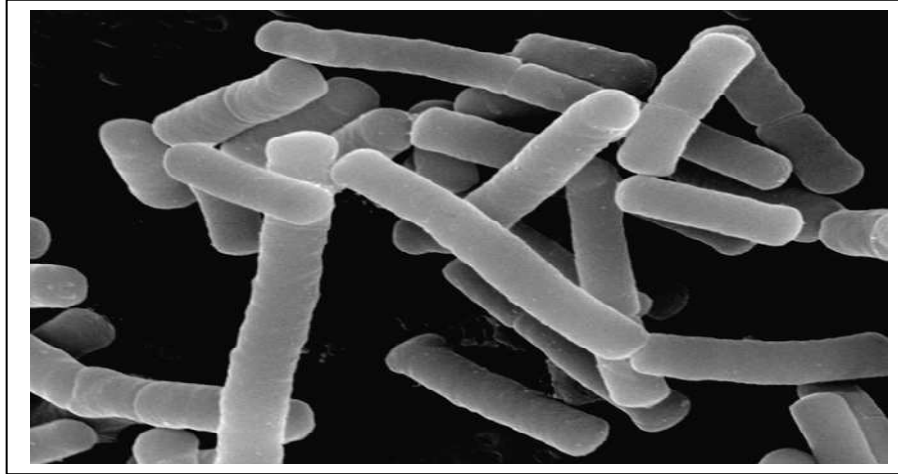


Figure 01 : Forme bacille ; *Lactobacillus Rosell-11* observé au microscope électronique à transmission (M.E.T.) (x 10000). (site01)

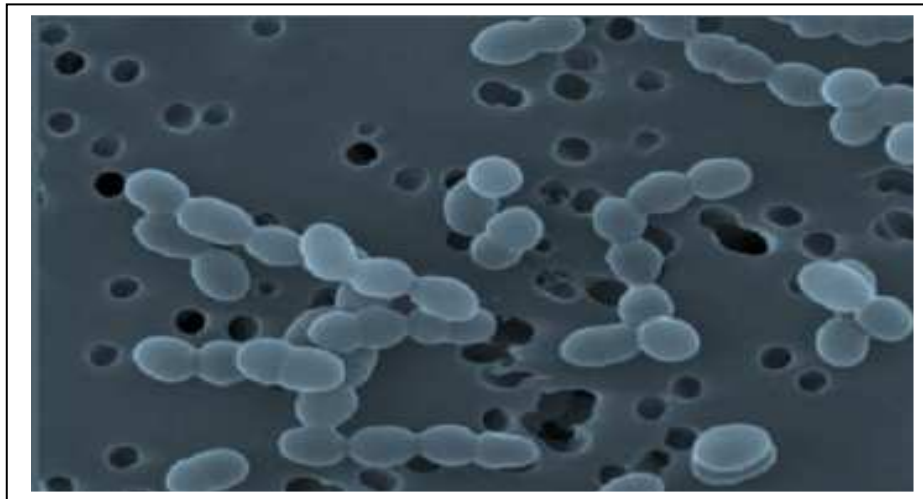


Figure 02 : forme coque ; *Leuconostoc lactis* observé au M.E.T. (x 10000). (Site 02)

1.3. Habitat des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires susceptibles d'être retrouvés dans tous les types d'habitat. Elles accompagnent l'activité humaine au quotidien, en temps que bactéries de la flore commensale, de la flore intestinale ou de la flore alimentaire présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (**Klein et al., 1998**).

1.3.1. Présence des bactéries à l'état libre dans l'environnement

Dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages, ...). Les différentes espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis* et/ ou *Lc. garvieae*, les plus rencontrées dans le lait et le fromage, sont communément utilisées comme ferments « starter culture » par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers. Un ferment désigne un microorganisme, bactérie ou champignon, responsable de la fermentation. Aussi, les bactéries lactiques sont à l'origine de la fermentation utilisée pour la préparation de boissons à partir de plantes (boza, cidre, ...). Parmi elles, on distingue des espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* (**Gálvez et al., 2011**).

Les bactéries lactiques sont capables de survivre dans des milieux très acides (Acidotolérantes) en raison de leur production d'acide lactique. De plus, l'acidification du milieu participe à l'inhibition de la croissance de certains microorganismes pathogènes, tels que *Listeria monocytogenes* (**Gálvez et al., 2011**).

1.3.2. Présence des bactéries lactiques en association avec un hôte

Les bactéries lactiques peuvent vivre en symbiose entre elles et avec un hôte. La symbiose est une association intime et durable entre deux organismes hétérospécifiques (espèces différentes), parfois plus. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, et *Weisseilla*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, auxquelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes responsables d'infections vaginales comme *Trichomonas vaginalis*, pathogène responsable de la trichomonase vaginale (**Björkroth et Holzapfel, 2006 ; Ruiz et al., 2009**) et/ ou *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (**Makhloufi, 2011 ; Falagas et al., 2006 ; Pirota et al., 2004**).

Des bactéries lactiques ont souvent été isolées de poissons vivants, en général dans le tractus intestinal. Des bactéries du genre *Lactobacillus* ont été retrouvées dans du saumon et de l'omble chevalier. La plupart des bactéries lactiques retrouvées dans les poissons sont reconnues comme des germes non pathogènes, voire même comme ayant un effet probiotique sur l'animal. Ringo *et al* ont par exemple montré que des souches de *Cb. piscicola* isolées du tractus digestif de poissons d'élevage possédaient des capacités inhibitrices vis à vis de pathogènes des poissons tels qu'*Aeromonas salmonicida*. A l'inverse, l'espèce *Lactococcus garvieae* est reconnue comme un pathogène du poisson, pouvant entraîner des septicémies fatales (Matamoros, 2008).

1.4. Génétique des bactéries lactiques

Le matériel génétique des BL est organisé en deux structures : Principalement dans une longue molécule d'ADN très repliée sur lui-même : le chromosome. Secondairement dans les plasmides que 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 variante 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. (Desmazeaud, 1992).

Les souches de *Lc.lactis*, *Subsp lactis* et *Subsp cremoris* portent au moins deux plasmides : généralement, chaque souche possède de 4 à 7, voire 11 à 14 plasmides (Fujita *et al.*, 1984), de rares souches ne portent qu'un seul plasmide (Ramos *et al.*, 1983).

Chez les lactococques, ces plasmides peuvent coder des aptitudes à la fermentation du lait : le métabolisme du lactose et la dégradation des protéines, ainsi que d'autres propriétés utiles en technologie laitière : la fermentation des citrates, la production de substance filante, la résistance aux bactériophages, aux agglutinines et au sel. Ils peuvent également coder d'autres caractères secondaires tel que la production de bactériocine (De Roissart, 1986).

1.5. Taxonomie des bactéries lactiques

Depuis la description du *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (**Pot, 2008**).

La classification des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques par l'utilisation des méthodes moléculaires. Cependant, la caractérisation phénotypique /biochimique classique demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes. Certaines caractéristiques phénotypiques sont utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de carbone, tolérer différentes concentrations en bile, produire des polysaccharides extracellulaires, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétone et synthétiser certaines enzymes. La composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras, la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase sont également d'autres critères qui peuvent être étudiés pour l'identification des espèces lactiques (**Vandamme, 1996 ; Stiles et Holzopfel, 1997 ; Ho et al., 2007**).

La morphologie est considérée comme la caractéristique clé pour décrire et classer les genres des bactéries lactiques. De ce fait, les bactéries lactiques peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (**Collins et al., 1993 ; Ho et al., 2007**).

A ce groupe de bactéries lactiques, appartient plusieurs genres comme *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. (**Stiles et Holzopfel, 1997 ; Pot, 2008**). Des genres nouveaux, par exemple *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum* et *Lactosphaera*, ont également été décrits, comportant des souches qui montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupes des bactéries lactiques (**Broadbent, 2001 ; Axelsson, 2004**).

Le genre *Bifidobacterium* est actuellement considéré par plusieurs auteurs comme genre de bactéries lactiques, bien qu'il se distingue par un pourcentage en G+C de 55%, largement supérieur à celui des autres genres et par une voie métabolique de fermentation des sucres particulière.

Les études phylogénétiques basées sur l'analyse des séquences des ARN ribosomiques ont confirmé l'appartenance de ces différents genres à un même groupe qui inclut également *Clostridium*, *Bacillus* et *Propionibacterium* (figure 03) (Stiles et Holzopfel, 1997 ; Pilet *et al.*, 2005).

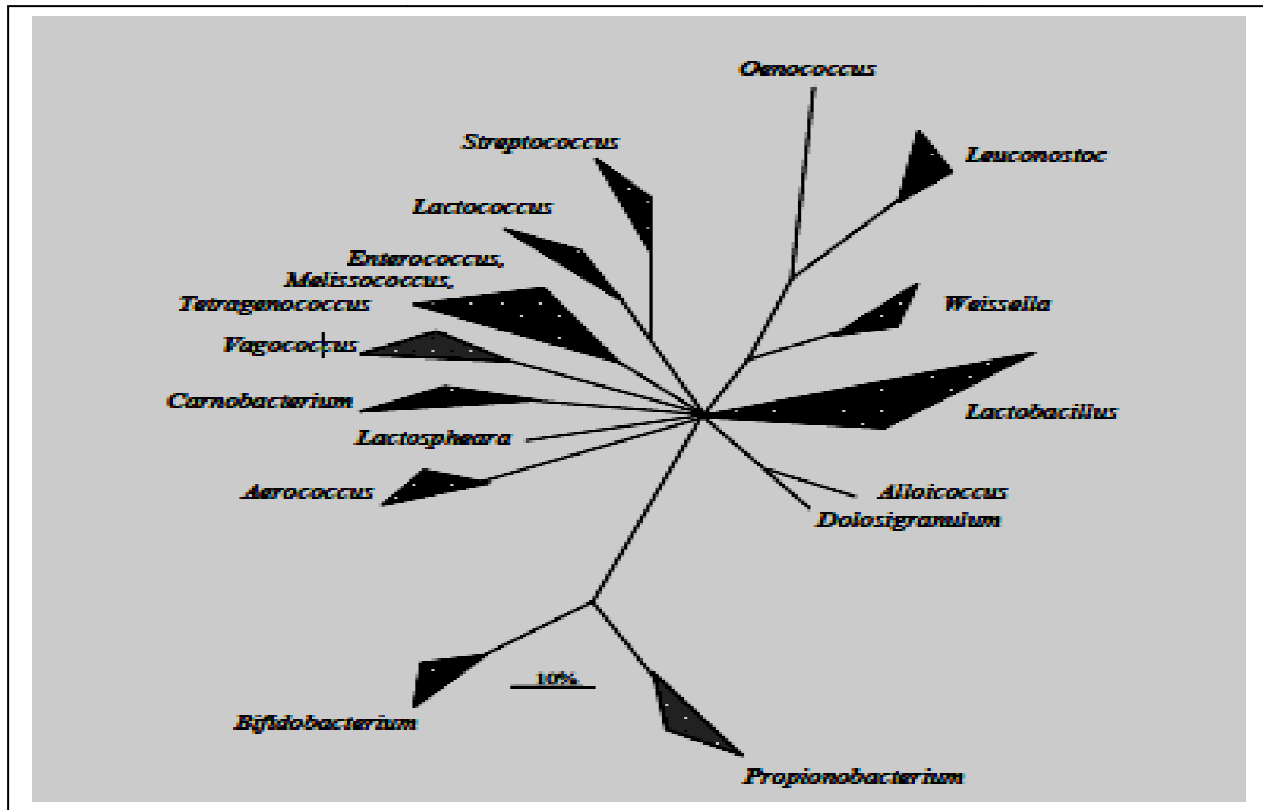


Figure 03: Arbre consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences ARNr, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques à faible % G+C et les genres Gram positifs non reliés *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfel *et al.*, 2001)

1.6. Classification des bactéries lactiques

La classification phénotypique des bactéries lactiques est largement basée sur la morphologie, le mode de fermentation de glucose, la croissance à différentes températures, la capacité de croissance à de hautes concentrations de sel (6.5%, 18%), la tolérance aux pH acides, alcalins et à l'éthanol, la configuration de l'acide lactique produit à partir de glucose, l'hydrolyse de l'arginine, la formation d'acétone, etc.

Les marqueurs chimiotaxonomiques comme la composition en acides gras et les constituants de la paroi cellulaire peuvent aussi être utiles dans la classification (König et Fröhlich, 2009).

L'identification de l'espèce de bactéries lactiques peut être réalisée par l'analyse de leur profil fermentaire des carbohydrates à l'aide du système API50CH (Curk *et al.*, 1993). L'analyse comparative des séquences d'ARN ribosomal 16S a entraîné des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (Salminen *et al.*, 2004).

Selon la dernière édition de *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des *Firmicutes*, classe des *Bacilli* et L'ordre des *Lactobacillales* renfermant trente cinq genres répartis sur six familles. Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de : (Salminen *et al.*, 2004). *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* et *Aerococcus*. (Dridier et Privost, 2009).

1.6.1. Le genre *Streptococcus*

Les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est 37°C. Elles sont incapables de se développer à 15°C et à pH: 9.6. Beaucoup d'espèces sont commensales ou parasites de l'homme et des animaux et certaines sont hautement pathogènes. (Guiraud, 1998).

1.6.2. Le genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits « Lactique », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet *et al.*, 2005).

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines.

Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (Tamime, 2002).

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. lactis* ssp. *hordniae* (Pot et al., 1996 ; Pot, 2008).

1.6.3. Le genre *Leuconostoc*

La famille des *Leuconostocaceae*, contient des coques ovoïdes, pouvant être allongés ou elliptiques. Ce sont des cellules sphériques disposent en paire ou en chaîne, elles sont caractérisées par un métabolisme hétérofermentaire en convertissant le glucose en D-lactate et éthanol ou en acide acétique par la voie de transcétolase, elles sont incapables de dégrader l'arginine ce qui leurs distinguent des lactobacilles hétérofermentaires (Gonzalez et al., 2007). On range habituellement les leuconostocs dans les anaérobies facultatifs, mais certains les considèrent comme des anaérobies aérotolérants. Ils sont exigeants et présentent souvent une auxotrophe pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et les glucides (Dellaglio et al., 1994). Ce genre comprend les espèces suivantes : *Ln. mesenteroides* avec ces sous espèce *mesenteroides*, *cremoris* et *dextranicum* et *Ln. lactis* et *Ln. Pseudomesenteroides* et *Ln. paramesenteroides* (Collins et al., 1993 ; laease, 2005).

1. 6.4. Le genre *Pediococcus*

Ce genre est représenté par neuf espèces ayant un métabolisme homofermentaire. Il rassemble des cellules immobiles de forme sphérique parfois ovoïdes, isolées ou en paires qui se divisent dans deux directions perpendiculaires formant ainsi les tétrades mais jamais les chaines. Certaines espèces produisent une catalase ou une pseudocatalase. Les cellules sont acidophiles mais non halophiles et croissent à pH : 5 mais pas à pH : 9, la température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C (Salminen et al., 2004).

1.6.5. Le genre *Enterococcus*

Ce genre comprend des cellules ovoïdes isolées, en paires ou en courtes chaines, homofermentaires. Ce genre se caractérise par sa tolérance à 6.5% de Na Cl, au pH : 9.6 et par la croissance à 10°C et 45°C avec une température optimale de croissance de 35°C à 37°C. (Salminen et al., 2004).

Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* et les espèces proches. Les entérocoques peuvent être mobiles, généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent. (Tamime, 2002 ; Ho et al., 2007).

1.6.6. Le genre *Lactobacillus*

Les bactéries du genre *Lactobacillus* ont des aspects variés allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Ils sont Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînettes et habituellement immobiles.

Les lactobacilles se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (Siegumfeldt *et al.*, 2000). Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. lactis* ssp. *hordniae* (Pot *et al.*, 1996 ; Pot, 2008).

Lactobacilles se répartissent en trois groupes selon leur profil fermentaire, d'après la classification de Kandler et Weiss (1986) :

***Groupe I** : il comprend les espèces homofermentaires obligatoires, c'est-à-dire produisant exclusivement de l'acide lactique à partir du glucose. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (*croissance* à 45°C) dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. Acidophilus* et *Lb. helveticus*. La plupart des espèces sont présentes dans le lait et les produits laitiers.

***Groupe II** : ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives, c'est-à-dire capables d'utiliser la voie hétérofermentaire dans certaines conditions comme une concentration en glucose limitant. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles.

***Groupe III** : il est constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires, c'est-à-dire utilisant la voie des pentoses phosphatent pour la fermentation des hexoses et des pentoses.

C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*, outre leur présence dans les produits laitiers et carnés, certaines espèces se développent dans le tube digestif de l'homme, et participent à l'équilibre de la flore intestinale (Laurent *et al.*, 1998)

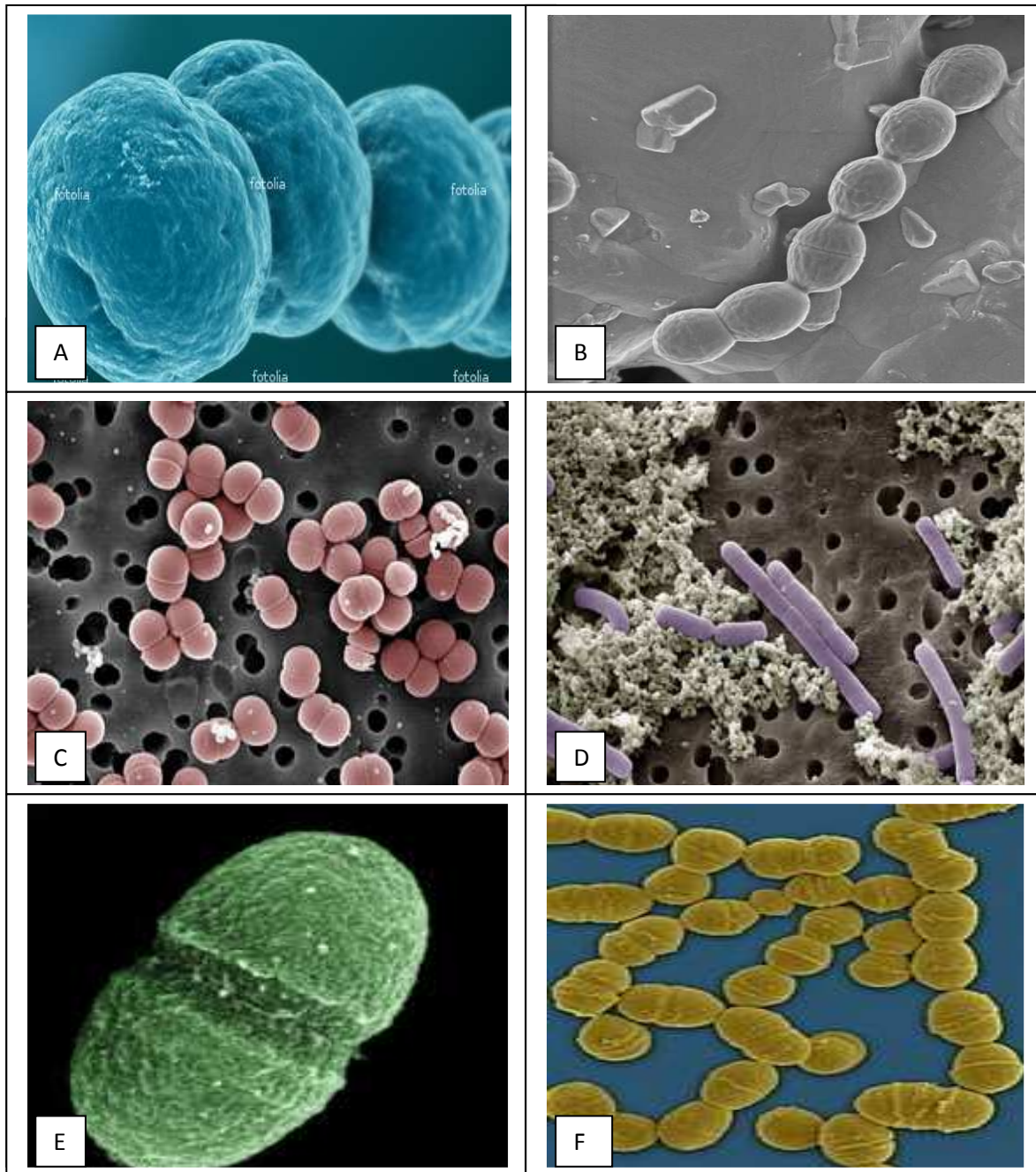


Figure 04: A : *Streptococcus*, B : *Lactococcus* sp , C :*Pediococcus pentosaceus*, D :*Lactobacillus casei*. E : *Enterococcus faecalis*, F : *Lactobacillus casei*. (site01+ 02)

Tableau 03 : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques
(Boudjema, 2008)

Genre	Morphologie	Fermentation	Température d'optimisation	Nombre d'espèces
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homofermentaires ou Hétérofermentaires	Thermophiles ou Mésophiles	Groupe I:23 Groupe I : 16 Groupe I: 22
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétérofermentaires	Psychrotrophes	6
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	5
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Thermophile ou mésophiles	19
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homofermentaires	Mésophiles	13
<i>Vagococcus</i>	Coques Mobiles	Homofermentaires	Mésophiles	2
<i>Pediococcus</i>	Coques en Tétrades	Homofermentaires	Mésophiles	7
<i>Tetragenococcus</i>	Coques en Tétrades	Homofermentaires	Mésophiles	1

1.7. Exigences nutritionnelles

Les BL ont un besoin pour leur nutrition car elles sont incapables de synthétiser un certain nombre des éléments qui sont variables d'une espèce à une autre, par ce qu'elles ont une faible biosynthèse donc ce sont auxotrophes (**Dridier D et Prevost H, 2009**).

Elles sont considérées comme l'un des groupes bactériens les plus exigeant du point de vue nutritionnel, car elles requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés mais des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligoéléments dont le rôle des coenzymes est plus important (**Bekhouche, 2006**).

1.7.1. Exigence en acides aminés

Les bactéries lactiques exigent aussi l'apport exogène d'acides aminés pour leur croissance car elles sont incapables, pour la plupart, d'en effectuer la synthèse à partir d'une source azotée plus simple. Elles ne peuvent absorber et utilisé que des acides aminés libres, ou des peptides courts. Leur nutrition azotée exige donc l'hydrolyse des grandes protéines du lait et notamment les caséines, par des enzymes (les protéases) situées dans la paroi extérieur de la cellule (**Ammor, 2004**).

Les lactobacilles ont besoin d'aspartame, d'histidine, de lysine, de leucine, de méthionine et de valine (**Lenoire et al., 1992**).

1.7.2. Exigence en vitamines

Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser les vitamines qui jouent un rôle irremplaçable des coenzymes dans le métabolisme cellulaire. *Streptococcus thermophiles* à une exigence absolue en acide pantothénique (B5), en riboflavine (B2), à moindre degré en thiamine (B1), en nicotinamide ou en acide nicotinique (B3) et en biotine (B8). La pyridoxine ou ses dérivés (B6) stimulent fortement sa croissance (**Desmazeaud, 1983**).

1.7.3. Exigence en minéraux

La nécessité des ions dans le métabolisme s'explique d'abord par leur fonction de cofacteur pour de nombreuses enzymes (**Novel, 1993**). Du point de vue transport, le fer est un élément important puisqu'il a des affinités pour un grand nombre de molécules chelatrices. Il augmente la croissance et la production d'acide lactique pour les lactocoques et une carence en cet élément donne lieu à une diminution de ce même acide (**Boyaval, 1989**). Le potassium, quant à lui, est un cofacteur pour plusieurs enzymes bactériennes et un niveau élevé de K⁺ dans le

cytoplasme est requis pour la synthèse protéique. De plus, le système du K⁺ apparaît être très important pour contrôler le pH cytoplasmique (Desmazaud, 1983).

1.7.4. Exigence en cation

Boyoval *et al.*, (1988) a montré le rôle précise des cations dans la résistance à l'oxygène, dans la différente réaction métaboliques et dans la nutrition des BL.

1.7.5. Exigence en glucide

Pour croître, les bactéries lactiques ont besoin d'un apport de nutriments comportant au moins un sucre fermentescible comme source d'énergie. La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (Monnet et Gripon, 1994). Premièrement, le transport du sucre à travers la barrière hydrophobe de la membrane cellulaire. Deuxièmement, le catabolisme intracellulaire du sucre et enfin la formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux généralement acides (Meftouh *et al.*, 2011).

1.8. Identification des bactéries lactiques

1.8.1. Caractères morphologiques et structuraux

- La forme : des cellules microbiennes représentent souvent un caractère distinctif de l'espace et du genre bactérien (coques ou bâtonnets) (Prevost, 2009) se trouve à la (figure05).

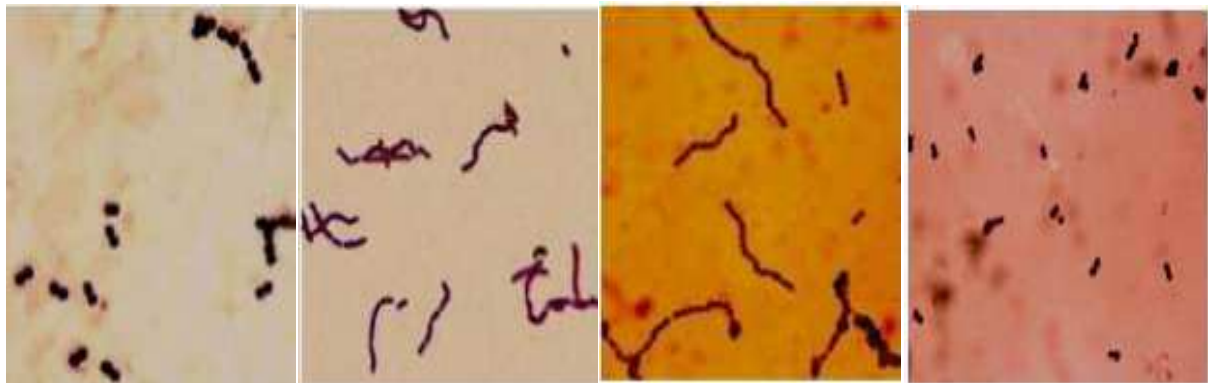


Figure 05: différente forme microscopique de bactéries lactiques obtenues au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran par Saidi, (2007). De gauche – droite, Diplocoques (*Leuconostoc sp.*), (*Lactobacillus sp.*), streptocoques et diplocoques (*Lactococcus lactis sp.*)(Grossissement x 1000).

- Le diamètre cellulaire : est un caractère plus stable que la longueur cellulaire.
- La mobilité: est une caractéristique rare chez les bactéries lactiques qui sont généralement non mobiles, sauf dans certains cas ou elles possèdent des flagelles péritriches.

- La sporulation: toutes les bactéries lactiques sont non sporulées.
- L'analyse de ces composés cellulaires est entrain de devenir un instrument essentiel non seulement pour la classification mais aussi pour l'identification des bactéries.
- Les recherches chimio taxonomiques réalisées sur les bactéries ont contribué de façon fondamentale à expliquer les relations génétiques intra et inter spécifiques. La présence d'inclusions cellulaires, corpuscules métachromatiques ou de volutine, est un caractère distinctif de certaines espèces du genre *Lactobacillus* homofermentaires strict (**Dellgio, 1994**).

1.8.2. Caractères physiologiques et biochimiques

Regroupent la quantité et la configuration de l'acide lactique produit, la température de croissance minimale, optimale et maximale, la tolérance à l'oxygène et au chlorure de sodium, production de gaz et d'arôme, la production d'ammoniaque à partir de l'arginine, la capacité d'hydrolyser l'esculine ou de résister aux sels biliaires et à différentes valeurs de pH (**Luquet et de Roissard, 1994**).

1.9. Application 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*, *Streptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (**Yateem et al., 2008**). Le vin, les poissons, les viandes, 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**).

* 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 tumeur 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'agénat mutagènes dans le colon (Rafter *et al.*, 2003).

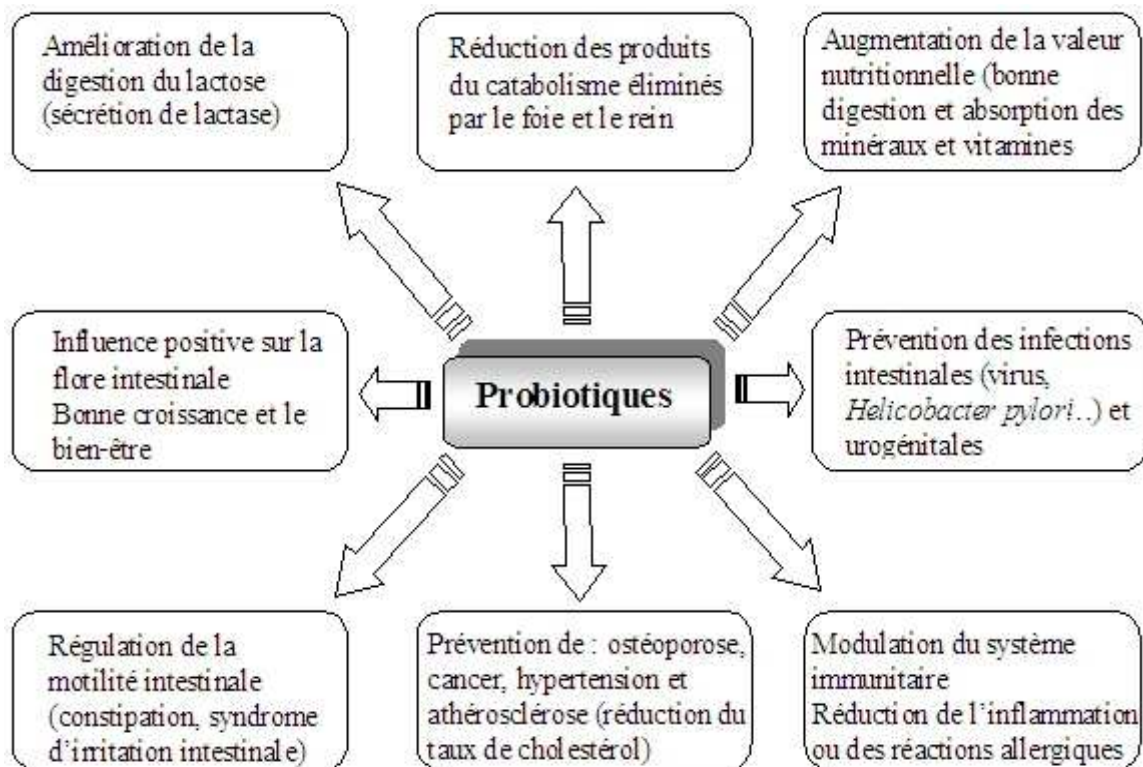


Figure 06 : le Rôle des bactéries lactiques dans le domaine thérapeutique (Site 03)

1.10. Application des bactéries lactiques des bactéries lactiques

Le champ d'application des bactéries lactiques est large et plusieurs de leurs propriétés sont importantes et influentes sur la qualité finale des produits alimentaires. Il permet d'assurer la qualité sensorielle des produits et de mieux maîtriser le processus de fermentation (**Casaburi et al., 2008; Muthukumarasamy et al., 2006**). L'utilisation des bactéries lactiques ou probiotiques pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques.

1.10.1. Activité acidifiante (production d'acide lactique)

Le pouvoir acidifiant des bactéries lactiques permet la coagulation du lait (en facilitant l'action 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**).

1.10.2. Activité protéolytique

La fermentation, au cours de laquelle plusieurs transformations physiques, biochimiques et microbiologiques se déroulent, est une étape cruciale dans le processus de fabrication des saucisses fermentées.

En général, les bactéries lactiques ont une faible propriété protéolytique sur les protéines myofibrillaires. Toutefois, certaines souches de *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. sakei* participent à l'hydrolyse des protéines sarcoplasmiques et par conséquent, contribuent à la décomposition des peptides en acides aminés (**Drosinos et al., 2007 ; Dalmış et al., 2008 ; Scannell et al., 2004 ; Larrouture et al., 2000**). Des peptidases issues de ces bactéries lactiques hydrolysent des oligopeptides et de ce fait, produisent-les substances responsables de la flaveur et de la texture des produits fermentés (**Ammor et al., 2005 ; Papamanoli et al., 2003 ; Hughes et al., 2002**).

1.10.3. Pouvoir aromatisant

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 diacétyle sont les plus importants (**Georgalaki et al., 2002 ; Francois et al., 2007**).

1.10.4. Production de peroxyde d'hydrogène

Dans certaines conditions, en présence d'oxygène, les bactéries lactiques peuvent produire du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est un composé toxique pour différentes bactéries et surtout sur celle dépourvue de catalase ou de pseudo catalase capables de dégrader ce composé toxique (**Chamba et al., 1994**).

1.10.5. Production de viscosité

La viscosité est un caractère très recherché dans la fabrication du yaourt et de petits laits. Elle est due à la sécrétion des gommés (polysaccharides, galactanes) et mucine (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**).

1.10.6. Production de bactériocines

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'aliments comme la nisine produite par les *Lactococcus* dirigée contre *Bacillus* et *Clostridium*, la plantaricine et la sakacine produites toutes les deux par les lactobacilles actives sur *E. coli*, *Listeria* et certaines levures (**Ogunbanwo et al., 2003**), contribuant ainsi à la préservation de l'équilibre microbien et organoleptique du fromage (**Harris et al., 1989 ;Georgalaki et al., 2002**).

Chapitre III : Les facteurs antimicrobiens

1. Les facteurs antimicrobiens

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutéline, le diacétyl et les bactériocines. Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens inhibant la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes (**Dortu et Thonart, 2009**). Durant la fermentation du lait, différents agents antimicrobiens ayant la capacité d'inhiber le développement de bactéries pathogènes et/ou d'une flore de dégradation de l'aliment sont produits par les bactéries lactiques.

*Les acides organiques, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries.

*La production de peroxyde d'hydrogène car contrairement à d'autres genres bactériens, les bactéries lactiques sont dépourvues de catalase, capable de dégrader ce composé toxique.

*Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice. Leur spectre d'action est généralement étroit. Cependant, la plupart ont une activité contre des pathogènes alimentaires tels que *Listeria monocytogenes* (**Dortu et Thonart, 2009**)

1.1. Les acides organiques

*Définition

Les bactéries probiotiques produisent l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide propénoïque ainsi qu'une faible quantité d'acide formique, d'acide succinique, et d'éthanol (**kostinek et al., 2005**). En général, la production d'acides organiques permet une acidification du milieu qui peut limiter la croissance de certaines bactéries entre autres les bactéries indésirables. Des expositions prolongées dans un milieu acide peuvent entraîner la mort de plusieurs bactéries, y compris les ferments lactiques (**Champagne et al., 1992**) ; **kostinek et al., 2005**). Ainsi, les acides organiques ont différentes actions telles qu'un excellent pouvoir bactéricide ou un effet bactériostatique contre les micro-organismes pathogènes se trouvant dans le tube digestif (**Jedidi, 2007**).

***Rôle d'acide organique**

En général, c'est la forme moléculaire non dissociée des acides qui est le facteur le plus toxique pour les bactéries, d'où l'acide acétique est plus toxique que l'acide lactique (**Hermier et al., 1997**). Les acides organiques à l'état indissociée, l'acide lactique et l'acide acétique traversent passivement la membrane cytoplasmique et, pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel, que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire est annulé (**Ammor et al., 2007 ; Janssen et al., 2007**).

1.2. Peroxyde d'hydrogène

Dans les conditions d'aérobiose, chez la plupart des bactéries lactiques, les molécules de NAD réagissent avec l'oxygène pour former du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). De plus, diverses enzymes conduisent généralement à l'accumulation de peroxyde d'hydrogène qui est plus au moins toxique pour la bactérie lactique productrice. Notamment dans le cas du lait, le peroxyde d'hydrogène est le constituant d'un système inhibiteur naturel comportant aussi une peroxydase et du thiocyanate comme accepteur d'électrons. Ce composé est un inhibiteur de la croissance microbienne car il bloque le fonctionnement de certaines enzymes-clés intervenant dans la glycolyse, comme l'hexokinase. L'action bactériostatique de ce système entraîne des irrégularités d'acidifications par les levains lactiques, qui peuvent ainsi s'auto-inhiber car ils y sont résistants. Mais, comme il peut être bactéricide pour certaines bactéries de contamination, voire pathogènes, la fédération internationale de laiterie a proposé d'utiliser les propriétés de ce système inhibiteur pour améliorer la conservation temporaire du lait cru dans les pays chauds dépourvus d'équipement de réfrigération (**Desmazeaud, 1996**).

1.3. Le dioxyde de carbone

Il est principalement produit par les BL hétérofermentaires. Le mécanisme précis de son action antimicrobienne est toujours inconnu. Cependant, le CO₂ peut jouer un rôle antimicrobien en créant un environnement anaérobique, qui empêche les décarboxylations enzymatiques, et l'accumulation de CO₂ dans le milieu peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité (**Ammor et al., 2006**).

Le CO₂ peut aussi empêcher la croissance de beaucoup de microorganismes de détérioration, particulièrement les bactéries psychotropes à Gram- (**Farer, 1991 et Hotchkiss et al., 1999**).

Le degré d'inhibition par le CO₂ varie considérablement selon les espèces. Un taux de CO₂ de 10% pourrait diminuer la population bactérienne de 50% (Wagner et Moberg, 1989), et entre 20 et 50%, il a une forte activité antifongique (Lindgren et Dobrogosz, 1990).

1.4. Le diacétyle

Le diacétyle (C₄H₆O₂) est un des composants aromatiques. (Ziney *et al.*, 1998) Produite par de nombreuses BL est un inhibiteur actif contre de nombreux microorganismes L'action inhibitrice est accrue en milieu acide, les bactéries Gram négatives sont plus sensibles au diacétyle que les Gram positives, les premières sont inhibées à la concentration de 200 g/l et les dernières au 300g/l (Hugenholtz et Starrenburg, 1992).

1.5. Les bactériocines

1.5.1. Définitions

Il existe plusieurs définitions du terme bactériocine. A l'origine, ce terme a été utilisé pour désigner les protéines et peptides antimicrobiens synthétisés selon la voie ribosomiale. Plus précisément, les bactériocines sont considérées comme des substances protéiques présentant une activité antimicrobienne. Ainsi les bactériocines, peuvent être isolées chez de nombreuses bactéries et archées (Klaenhammer, 1988).

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens le plus souvent cationiques, modifiés ou non post-traductionnellement, de masses moléculaires comprises entre 2 et 6 kDa (Heng *et al.*, 2007a). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont généralement actives à faible concentration contre des bactéries phylogénétiquement proches (Belguesmia *et al.*, 2011 ; Cotter *et al.*, 2005b). Cependant, plusieurs genres de bactéries à Gram négatif tels que *Haemophilus*, *Helicobacter* ou *Neisseria* se sont révélés être sensibles à certaines de ces bactériocines (Morency *et al.*, 2001). L'activité antimicrobienne des bactériocines a un effet soit bactéricide, provoquant la mort de la bactérie cible, soit bactériostatique inhibant la croissance bactérienne. Les bactériocines les plus étudiées sont celles produites par les bactéries lactiques connues pour leur rôle dans la bonne conservation des aliments (Cotter *et al.*, 2005b).

Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram+. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram- n'a été décrite, la membrane externe d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité, semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire.

Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (Eijsink *et al.*, 1998 ; Fimland *et al.*, 2000 ; Drider *et al.*, 2006 ; Richard *et al.*, 2006).

1.5.2. 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).

Chez les bactéries à Gram positif, une souche peut produire plusieurs bactériocines. En effet les bactériocines qui présentent une légère modification dans les séquences d'acides aminés conservées par rapport à leur pré peptide n'affectant pas leur structure secondaire ni leur spectre d'action ni l'immunité de la souche productrice sont considérées comme étant des variantes naturelles. A titre d'exemple, les nisines Z, Q et U sont des variantes naturelles de la nisine A découverte en premier lieu (Riley et Chavan, 2007).

1.5.3. Nature

Les bactériocines des bactéries lactiques sont des protéines ou des complexes de protéines constituées généralement de 30 à 60 acides aminés. Ces substances peuvent être des protéines simples comme elles peuvent être associées à une partie lipidique ou glucidique. Certaines d'entre elles renferment des acides aminés inhabituels tels la lanthionine et la β -méthylelanthionine (Ammor *et al.*, 2006).

1.5.4. Caractérisations des bactériocines

Dans leur grande majorité, les bactériocines peptidiques de bactéries lactiques sont :

- Thermorésistantes (120°C pendant 10 minutes).
- Stables dans des zones de pH de 3 à 8.
- Sensibles à l'action d'enzymes protéolytiques (présentes dans le tractus intestinal).
- Elles ont des sites de liaisons spécifiques dans la membrane des bactéries cibles.
- Leur synthèse est associée à la synthèse d'une protéine d'immunité qui évite de provoquer la mort de la cellule excrétrice.
- Elles ont un spectre d'activité étroit. (Drider, 2006)
- N'ont pas d'effet négatif sur la qualité organoleptique du produit.

- Représentent un intérêt dans la conservation des denrées alimentaires par leur capacité à réguler la microflore existant dans les produits fermentés et inhibent la croissance des germes pathogènes (**Dortu et Thonart, 2009**).

1.5.5. Classification

Plusieurs classifications ont été proposées. La première en **1993** par **klaenhammer** divise les bactériocines en quatre classes, puis cette classification est modifiée par **Nes et al.**, en **1996**. En **2005** **Cotter et al** ont proposé une autre classification de cinq classes de bactériocine, mal 'avance de la recherche a permis d'affiner cette classification la menant actuellement à trois classes de bactériocines (**Calvez et al., 2009**) .

Tableau 04: Classification des bactériocines de bactéries lactiques (**Luquet et Corrieu, 2005**)

Classe	Sous-catégorie
Classe I : lantibiotique	Type A : molécules linéaires Type B : molécules globulaires
Classe II : bactériocines non-modifiées Thermostables	Classe : anti-listeria Classe : bactériocines à deux composants Classe : autres bactériocines
Classe III : bactériocines de grande taille, sensibles à la chaleur	

1.5.5.1. Bactériocine de Classes I : les lantibiotiques

Sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post traductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la β -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine. Ils peuvent être divisés en deux types : la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui comprend les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés (**McAuliffe et al., 2001** ; **Twomey et al., 2002**). Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides

agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticine 3147. Les séquences et structures d'un lantibiotique de chaque type se trouvent à la (**figure 07**).

Les lantibiotiques sont actifs contre de nombreuses bactéries pathogènes, *Listeria* ou *Salmonella*, responsables d'infections. Cette particularité permet aux lantibiotiques d'être utilisés comme conservateurs alimentaires (**Cotter et al., 2005b**). Le système génétique impliqué dans la biosynthèse et la régulation de la biosynthèse des lantibiotiques est, le plus souvent, présent sous forme de groupes de gènes (clusters). Ces clusters ont été largement étudiés ces dernières années (**Bierbaum et Sahl, 2009 ; Jack et al., 1998 ; Sahl et Bierbaum, 1998**).

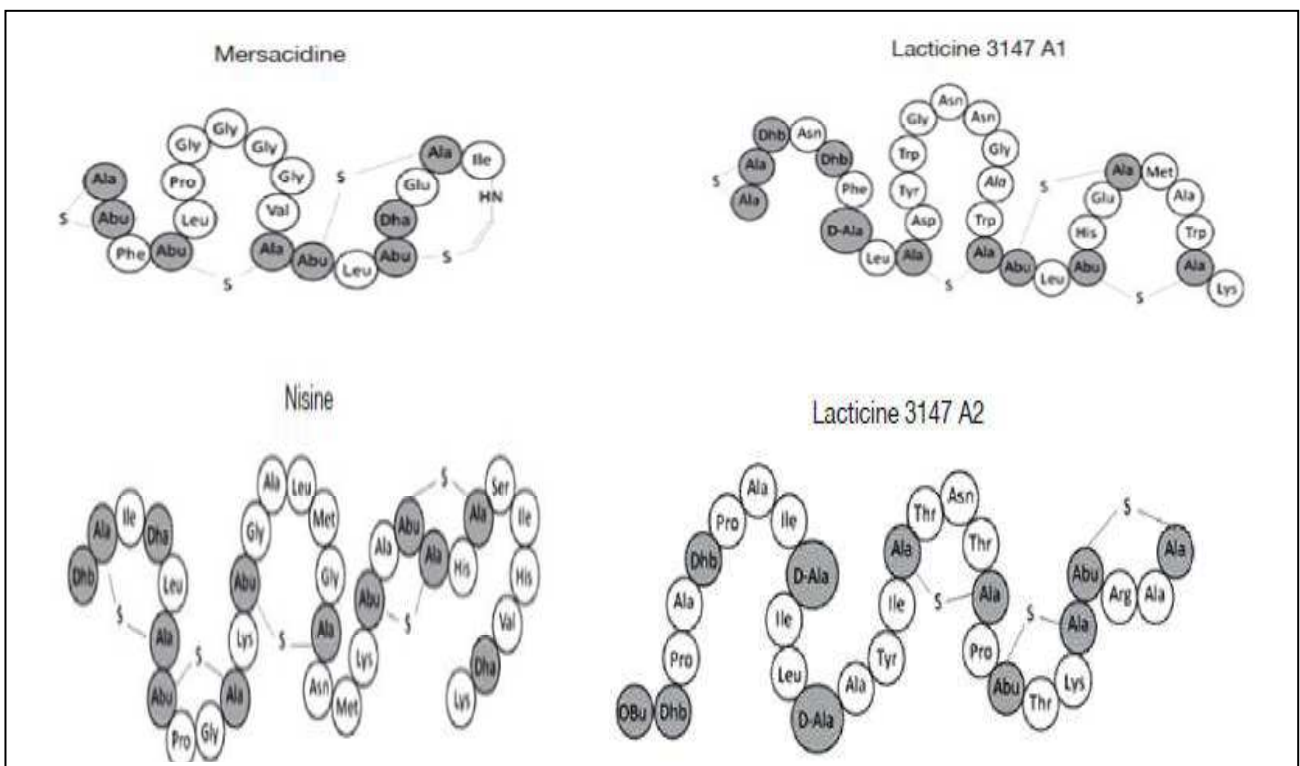


Figure 07 : Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique « two-peptides » (Lacticine 3147 A1 et A2) (**Dortu et Thonart, 2009**).

1.5.5.2. Bactériocine de classe II

Les bactériocines de la classe II sont de faible masse moléculaire (<10KDa) ; thermostables et ne subissent pas de modification post traductionnelle. Cette classe un grand nombre de bactériocines et a été divisée en trois sous classe (**Dridier et al., 2009**)

❖ Sous classe IIa

Sont des peptides composés de 36 à 48 acides aminés (**Dridier et al., 2009**). Ont une partie N-terminal hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (**Fimland et al., 2000 ; Richard et al., 2006**). Les bactériocines de classe IIa sont actives contre les bactéries des genres *Listeria*, *Enterococcus*, *Lactococcus* (**Calvez et al., 2007**)

Certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui structure tertiaire. Il semble par ailleurs qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne, une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (**Eijsink et al., 1998 ; Fimland et al., 2000 ; Dridier et al., 2006 ; Richard et al., 2006**).

❖ Sous classe IIb

La sous classe IIb représente les bactériocines à deux composants peptidiques qui y a un nombre d'acides aminés compris entre 30 et 40. Ces peptides, sont cationiques et portent des régions amphiphiles et ou hydrophobes (**Calvez et al., 2009**).les deux types de bactériocines, type E (Enhancing) ou la fonction de l'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (Sunergy) ou les peptides sont complémentaires (**Carine et al., 2009**).

❖ La classe IIc : les bactériocines circulaires

Les bactériocines circulaires se différencient des autres bactériocines par la présence d'un cycle liant d'une façon covalente leurs extrémités N- et C-terminales via un mécanisme enzymatique encore mal connu à ce jour. La structure circulaire est responsable de la protection de ces bactériocines à l'égard de la protéolyse, en raison de l'absence de site de clivage aux exopeptidases (**Maqueda et al., 2008**), et joue un rôle important dans l'augmentation de l'activité antimicrobienne due à une stabilité accrue de la molécule.

Comme les autres bactériocines, les bactériocines circulaires agissent par la perméabilisations de la membrane cytoplasmique et la perturbation de la force protomotrice membranaire de la bactérie cible aboutissant à la mort cellulaire. (**Cotter et al., 2005b**).

1.5.5.3. Bactériocines de classe III

Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques.

Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Nilsen *et al.*, 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigmatova *et al.*, 2007).

Tableau 05: Bactériocines de classe III produites par des bactéries lactiques

(Luquet et Corrieu, 2005).

Bactériocines	Producteurs
Hélvéticine J	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481
Milléricine B	<i>Streptococcus milleri</i> NMSCC 061
Zoocine A	<i>Streptococcus zooepidemicus</i> 4881

1.5.6. Mode d'action

Le mode d'action le plus connu et le plus répandu chez les bactériocines des BL implique une action visant la fonction de barrière de la membrane, mais il existe des exceptions à ce mode générale. Les bactériocines de la classe II représentent le cas typique de bactériocines agissent sur la membrane cytoplasmique des cellules sensible en dissipant la force proton motrice (PMF) par la formation de petits pores membranaire. Ceci est précédé par une interaction des résidus chargés positivement et des régions hydrophobes de structure hélicoïdale de la bactériocine avec les membranes cytoplasmiques, caractérisées par un potentiel transmembranaire élevé et des phospholipides chargé négativement. Deux étapes peuvent en réalité être distinguées : d'abord, les molécules de bactériocines se fixent à la surface de la membrane et quand la concentration locale est élevée, l'orientation des molécules change et elles sont insérées dans la membrane causant la déstabilisation de la structure de la bicouche et la formation de pores.

Ceci résulte en un flux d'ion, d'acides aminés et d'ATP vers l'extérieur de la cellule et en la dissipation de la PMF, avec comme conséquence la mort de la cellule par annulation de toutes les réactions énergie –dépendant A concentration minimale inhibitrice, les bactériocines tuent les bactéries beaucoup plus rapidement que les antibiotiques conventionnels. (**Chatterjee et al., 2005**).

Les lantibiotiques tel que la nisine, portant une structure cationique et amphiphile allongée, interagissent avec la membrane des cellules cibles soit en se liant au lipide II (un précurseur de peptidoglycanes) empêchant ainsi la synthèse de la paroi cellulaire conduisant à la mort de la cellule, soit en utilisant ce lipide comme une molécule d'appui pour s'insérer dans la membrane et y former des pores causant la destruction de la cellule suite à la dissipation du potentiel membranaire et l'efflux des petites molécules (ions, ATP, acides aminés, etc.). (**Gillor et al., 2008 ; Dortu et Thonart, 2009**).

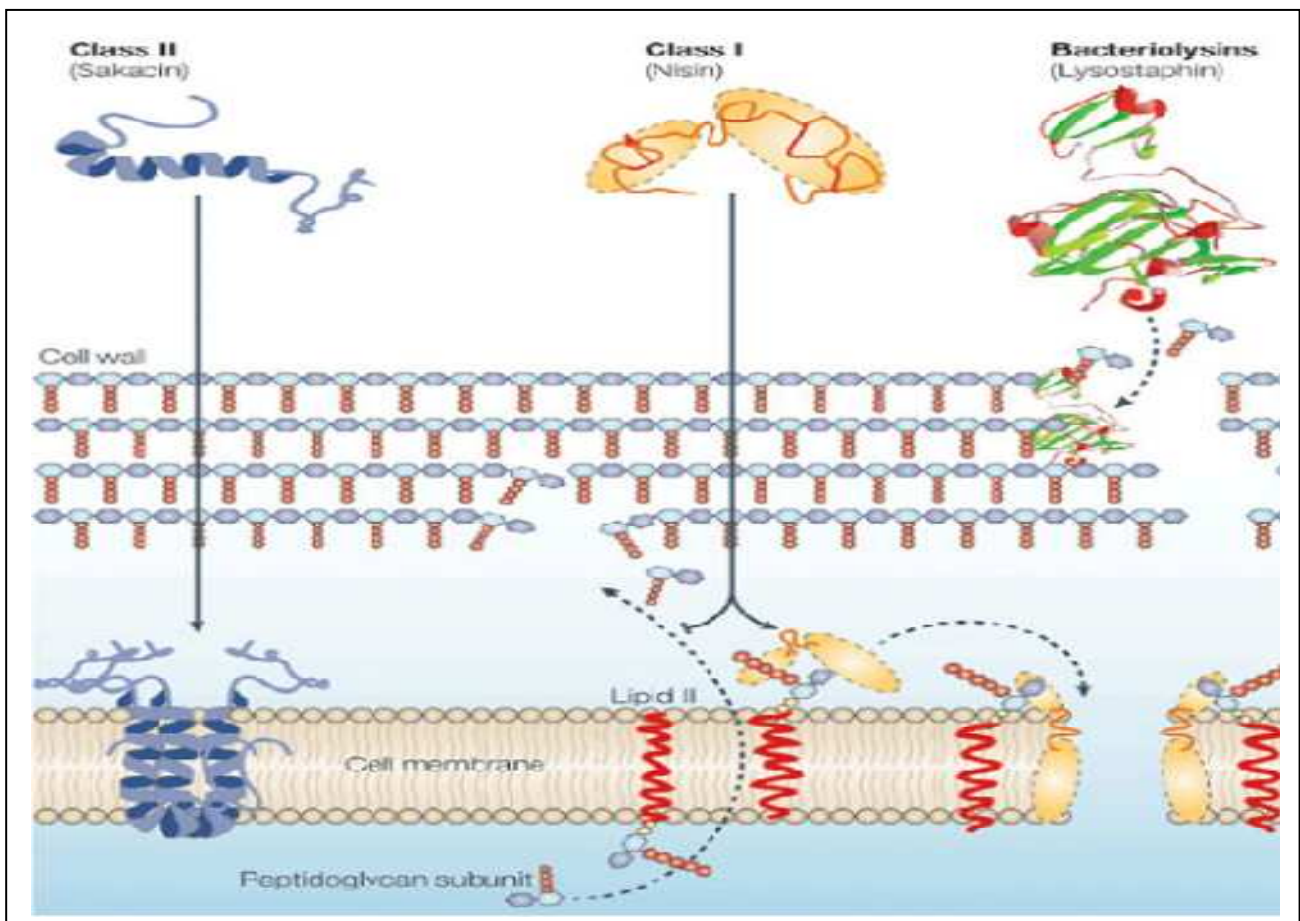


Figure 08 : Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques (**cotter et al., 2005**).

1.5.7. La production et conditionnement des bactériocines

1.5.7.1. Production

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance.

Elles peuvent ensuite être dégradées par les protéases produites par la bactérie lactique productrice (**Savijoki et al., 2006**) ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture. Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée. Comme l'ont montré **Moretro et al., (2000)** pour la production de sakacin P par *Lactobacillus sakei*, une même bactériocine peut être produite par des souches ou espèces différentes dont la capacité de production peut être variable.

1.5.7.2. Le conditionnement des bactériocines

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous une forme purifiée. La purification des bactériocines est une procédure longue et coûteuse qui nécessite la mise en œuvre de nombreuses techniques, à savoir une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, différentes combinaisons de chromatographies sur colonne telles que des échanges d'ions ou des interactions hydrophobes et une étape finale de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse. Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle. La stratégie souvent mise en œuvre consiste dès lors en l'adsorption de la bactériocine sur la cellule productrice suivie d'une centrifugation ou d'une ultrafiltration de la culture et de la désorption de la bactériocine par abaissement du pH à 2 et augmentation de la concentration en chlorure de sodium. (**Parente et al., 1999**).

Ces traitements ne sont pas applicables à l'échelle industrielle ; la stratégie souvent mise en œuvre est la semi purification. Les bactériocines semi-purifiées peuvent alors être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation la nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif alimentaire, est commercialisée sous une forme semi-purifiée. (**Smaoui, 2010**).

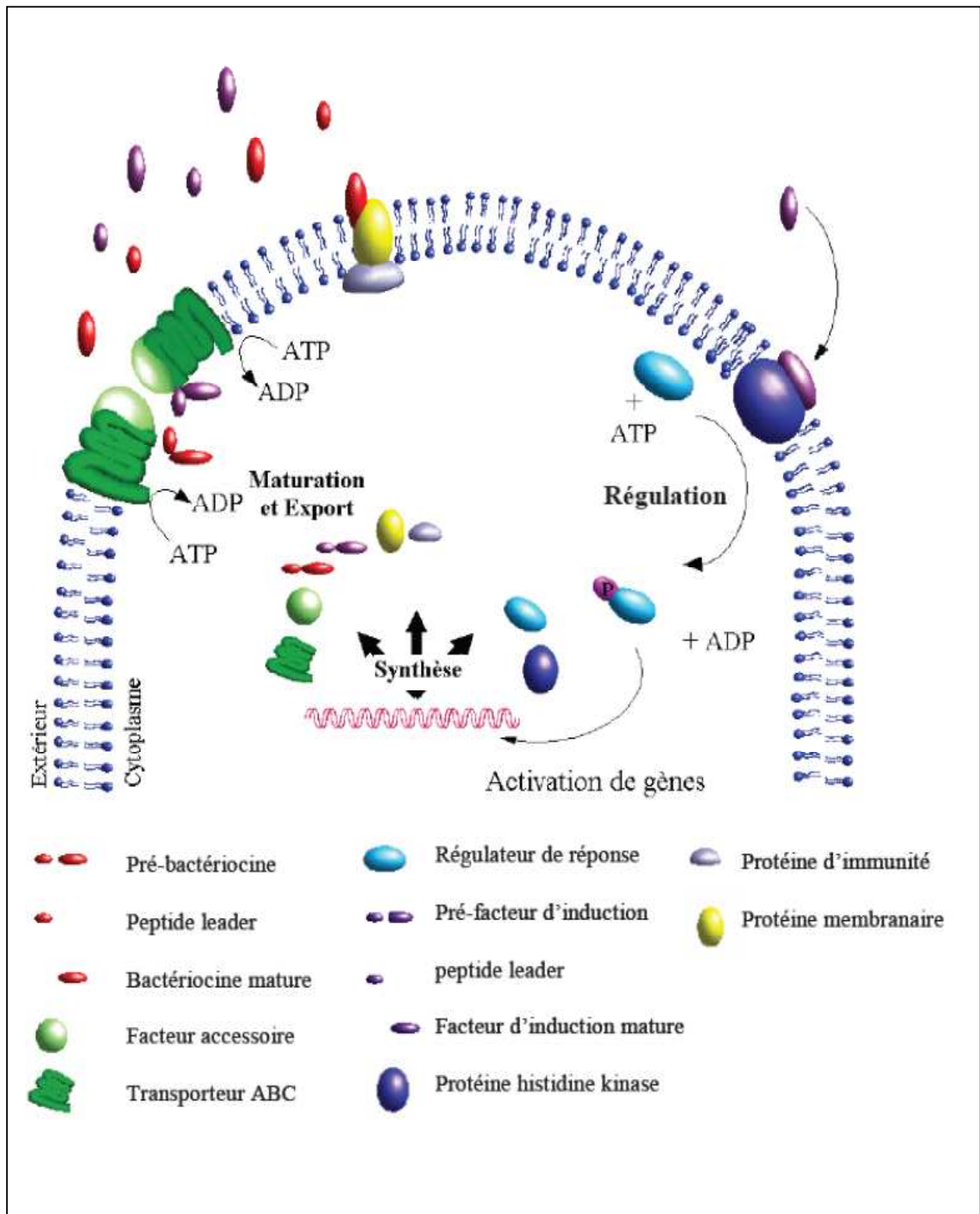


Figure 09: Les mécanismes cellulaires de production des bactériocines de classe II (Ennahar *et al.*, 2000).

1.5.8. 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**).

1.5.8.1. Les applications des bactériocines dans le secteur alimentaire

Les bactériocines purifiées ou semi-purifiées sont appliquées après production en fermenteur, purification ou semi-purification et conditionnement par les techniques adéquates, qui peuvent être relativement coûteuses. D'un point de vue législatif, une telle préparation est considérée comme un additif alimentaire. Jusqu'à présent, seule la nisine, un lantibiotique, est acceptée comme additif alimentaire (E234) (**Guinane et al., 2005**).

Les bactériocines peuvent également être appliquées sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice et atomisation d'un substrat alimentaire tel que le lait, par exemple. Cette préparation sera considérée comme un ingrédient fermenté. Elle contiendra la bactériocine mais également d'autres métabolites microbiens tels que l'acide lactique. La pédiocine, une bactériocine de classe IIa, est commercialisée sous cette forme sous le nom ALTA 2341. Des essais ont été récemment fait avec la lacticine 3147, un lantibiotique (**Deegan et al., 2006 ; Galvez et al., 2007**). Au niveau législatif, cette forme ne nécessite pas d'approbation. Cependant, si la culture n'est pas traditionnellement consommée, il faudra se référer à la législation sur les « *novel food* » (**EC258/97**).

Tableau 06 : Exemples d'applications des bactériocines comme conservateurs alimentaires(Gálvez *et al.*, 2011).

Applications	Bactériocines	Classe	Effets
Dans les produits laitiers	Nisine	I	Prévenir la prolifération d'endospores par <i>Li.monocytogenes</i> dans le fromage
	Lacticine 3147	I	Inhibition de <i>Li.monocytogenes</i> dans les yaourts naturels et le fromage écrémé
	Pédiocine PA-1/AcH	IIa	Inhibition de <i>Li. monocytogenes</i> dans les fromages blancs, crèmes et sauces à base de fromage
	Entéroccine AS-48	IIc	Inhibition rapide de <i>Li. monocytogenes</i> et inhibition lente de <i>S. aureus</i> dans le lait écrémé

1.5.8.2. Les applications des bactériocines 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 les quelles 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* (Dridier *et al.*, 2006)

Matériels et Méthodes



Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1. Matériels biologique

1.1.1. Le lait de vache

Les échantillons de lait ont été aseptiquement prélevés. Le pis et la mamelle ont été nettoyés à l'eau savonneuse, rincées à l'eau stérile et essuyées à l'aide d'une serviette de papier stérile. La traite est réalisée après lavage soigné des mains et aseptisation.

Le lait a été recueilli dans un flacon en verre de 250 ml stérile après avoir éliminé la première dizaine de jets. Conservé à 4°C puis transportés dans une glacière jusqu'au laboratoire de biologie de l'université de Khenchela.

Les échantillons de lait de vache proviennent de la région de Bouhmama, Khenchela (âge 4 ans de couleur noire blanche).

Ces prélèvements ont eu lieu entre le mois Avril et Mai 2016 (**tableau 07**).

Tableau 07: Répartition des prélèvements entre le mois avril et mai 2016

Prélèvement	Date
1 ^{er}	16/04/2016
2 ^{ème}	19/04/2016
3 ^{ème}	22/04/2016
4 ^{ème}	26/04/2016

1.1.2. Les souches indicatrices pathogènes

Pour les tests d'activité antibactérienne, nous avons choisi 03 micro-organismes pathogènes (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Klebsiella oxytoca* ATCC25922, *Bacillus subtilis* ATCC21332)

1.2. Verrerie

- Tubes à essai
- Béchers 500 ml
- Béchers 1l/1000ml
- Erlenmeyer 500ml
- Lames et lamelles
- Pipette graduée
- Pipette pasteur
- Verre de montre

1.3. Outils

- Anse de platine
- Portoirs des tubes essai
- Bec benzin
- Boite de pétri
- Pince
- Spatule
- Huile à immersion
- Papier para film
- Micropipette 10 μ l à 100 μ l

1.4. Appareillage

L'appareillage utilisé est le suivant :

- Autoclave
- Bain Marie
- Balance électrique
- Plaque chauffante
- Etuves électrique
- Microscope optique
- Centrifugeuse réfrigérée
- Réfrigérateur (4°)

1.5. Réactifs et solutions

- Eau distillée
- Eau physiologie (9g/1000ml Na CL)
- Colorants de Gram
- Huile de paraffine
- Réactif pour lecteur des galeries (Réactif du kovacs, acide sufanique, α naphtalamine, réactif TDA, réactif VP1 et VP2).

1.6. Milieux de culture

- Gélose MRS (de Man-Rogosa et Sharp)
- Bouillon MRS
- Muller Hinton
- Bouillon nitrate
- Bouillon nutritif.
- Mannitol mobilité
- Gélose nutritif
- Clark et lubs

2. Méthodes

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

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

2.1.1. Isolement

A partir de l'échantillon du lait, nous avons effectué initialement des dilutions décimales allant de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} à 10^{-6}

Après plusieurs essais, seules les dilutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} sont retenues pour ensemercer les milieux de cultures solides M17 (**Terzaghi et al., 1975**) ce milieu convient pour l'isolement des *Streptocoques lactiques* et MRS (**De Man et al., 1960**) utilisé pour l'isolement du genre *Lactobacillus* coulés en boîtes de Pétri. Ces dilutions permettent de repérer des colonies suffisamment séparées.

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

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

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

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

2.1.2. Purification

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

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

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

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

Remarque:

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

2.1.3. Conservation

Cette opération est nécessaire pour le maintien de la viabilité des souches isolées jusqu'à l'étape d'identification. Elle a été réalisée par ensemencement des souches isolées sur gélose MRS /M17, 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**)

2.2. Méthodes d'identification

Après l'activation des souches isolées par des repiquages successifs sur milieu Elliker, les cultures des souches à étudier sont prises en phase exponentielle de croissance pour subir les différents tests d'identification. Les bactéries lactiques isolées sont identifiées par les méthodes classiques, basées sur la connaissance d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques proposés par **Guiraud et Galzey (1980)**, **Deroissart, (1986)** et **Leveau et al., (1989 ; 1991)** et aussi selon les normes de la fédération internationale du lait **FIL-norme (1991)**. L'identification des isolats des bactéries lactiques au stade genre a été réalisée en deux étapes :

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

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

Les isolats de bactéries lactiques ont été identifiés au stade espèce sur la base des

Critères d'identification rapporte par plusieurs auteurs comme suit :

- La détermination du type fermentaire (homo-hétérofermentation) et la température optimale de croissance.
- Les tests de croissance en milieux hostiles telles que la croissance en présence de différentes concentrations en Na Cl et la thermo résistance.
- Les caractères biochimiques par l'étude du métabolisme enzymatique et fermentaire, tels que le profil glucidique, la recherche et de l'acétoïne.

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

2.2.1. Les tests communs

2.2.1.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies (taille, pigmentation, contour,...) dépend du milieu utilisé de la durée et de la température de l'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonie bien isolée : les colonies sont d'autant plus petites qu'elles sont rapprochées. La colonie peut apparaître à la surface de milieu de culture pour les germes aérobies, ou être en profondeur pour les germes anaérobies (**Benharba et al., 2014**)

2.2.1.2. Examen microscopique

L'observation microscopique permet de classe les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire, leur mode d'association (**Joffin, 1996**).

2.2.1.3. Coloration de Gram

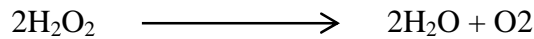
C'est la coloration de base en bactériologie que permet de distinguer les bactéries en Gram positif et en Gram négatif, cette distinction est fondamentale pour leur identification. Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au *violet de cristal*; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, 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 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 30 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**).

Avec cette coloration double, les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge (**Delarras, 2007**).

2.2.1.4. Test catalase

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 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 :



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 (O₂) (**Marchal *et al.*, 1991**).

2.2.1.5. 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 aensemencé 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**).

2.2.1.6. Test de Nitrate-réductase

Dans des tubes contenant chacun 5 ml de bouillon Nitrate sont ensemencés à l'aide d'une anse, après incubation à 30°C pendant 24 h, Les réactifs des nitrites sont toujours présents donc on ajoute deux gouttes de réactif Réductase I et Réductase II dans Les tubes. Deux cas sont possibles :

- Coloration rouge : Le nitrate réductase est donc Positif.
- Pas de coloration rouge : Le nitrate réductase est donc négatif.

Au cours de ce test, on recherche la production d'une enzyme : la nitrate-réductase par la bactérie. Cette étude va donc consister à mettre en évidence le métabolite nitrite ou la disparition des nitrates initiaux.

2.2.1.7. Cytochrome_Oxydase

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

Principe : Dans le test cytochrome oxydase, on utilise certains réactifs colorants que l'on substitue à l'O₂ comme receveur d'électron.

À l'état réduit, le réactif est incolore, en présence de l'enzyme cytochrome oxydase et de l'oxygène de l'air, le phénylènediamine est oxydé et forme un composé bleu-pourpre.

Technique : Déposer une goutte de réactif sur un papier filtre placé dans un pétri. Avec un fil bouclé, placer une ou plusieurs colonies sur le papier à un endroit où il y a du réactif.

Réactif : di ou tétraméthyl-p-phénylènediaminedihydrochlorure

Lecture et résultat: Immédiate

Oxydase Positive (+) : coloration violette ou pourpre

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

2.2.2. Les tests spécifiques

2.2.2.1. 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 aensemencé les souches. Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO₂, par contre les souches hétérofermentaires vont produire l'acide lactique et le CO₂ a proportions égales (**Carr et al., 2002**).

2.2.2.2. Production d'acétoine

La recherche d'acétoine est testée par la réaction de Voges Proskauer (VP). Après une culture de 24h a 37°C sur milieu Clark et Lubs. Ajouter 5 gouttes du réactif VP1 (solution de soude NaOH a16 dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VP2 (alpha naphthol a 6 dans l'alcool a95°).agiter soigneusement les tubes et attendre un temps maximum de 10 min. La présence d'acétoine se traduit par une coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu (**Joffin J.N. et Leyral G., 2001**).

2.2.2.3. Températures de croissance

Ce test est très important car il permet de différencier les bactéries mésophiles de celles qui sont thermophiles. D'autre part, ce test permet aussi de distinguer entre les deux sous-genres homofermentaires du genre *Lactobacillus* : *Thermobacteruim* et *Streptobacteruim* (**Lahtinen et al., 2012**)

Les tubes à essais contenant soient le M17 soit le MRS sontensemencés à l'aide d'une anse de platine bouclée, par les souches supposées appartenir aux genres *Streptococcus* et *Lactobacillus*. L'incubation est réalisée à des températures et des durées différentes.

Les streptocoques

10°C pendant 7 à 10 jours

30°C pendant 24 à 48 h

40°C pendant 24 à 48 h

45°C pendant 24 à 48 h

Les lactobacilles

15°C pendant 7 à 10 jours

45°C pendant 24 à 48 h

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

2.2.2.4. Test de croissance en milieux hostiles

- **Croissance sur bouillon hypersalé**

Ce test permet de voir l'aptitude des souches à se développer en présence de chlorure de sodium (Na Cl). 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 Na Cl. L'incubation est réalisée à 30°C pour les souches mésophiles et à 37°C pour les souches thermophiles et ce pendant 48 heures. La présence d'une trouble indique la croissance bactérienne. (**FIL-norme, 1991**)

- **La thermo-résistance**

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

Les tubes sont refroidis rapidement après chauffage, l'incubation est réalisée à 30°C (souches mésophiles) et à 37°C (souches thermophiles) pendant 24 à 48 h. (**Guiraud & Galzey, 1980**)

2.2.2.5. Fermentation des hydrates de carbone

Il s'agit d'apprécier l'aptitude des souches à métaboliser divers composés en particulier des sucres (Arabinose, Amylase, 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.

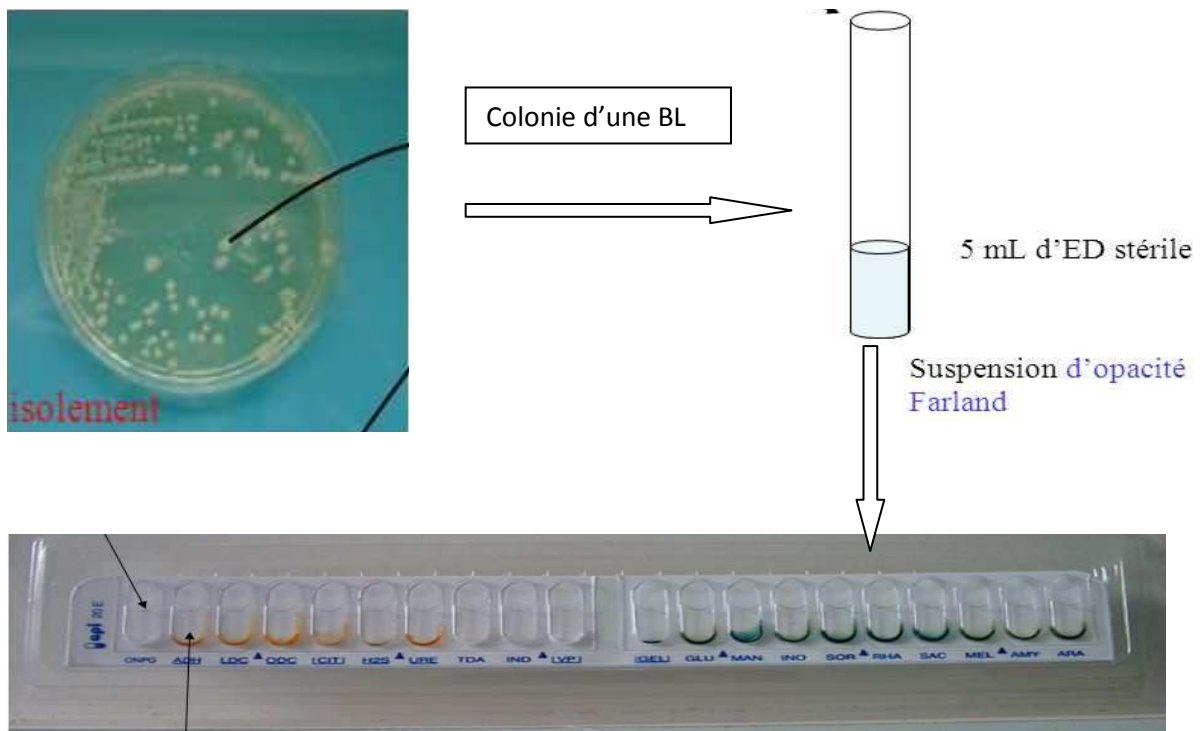
Le virage du milieu du rouge au jaune indique l'acidification du milieu donc la dégradation du sucre (Carbounelle *et al.*, 1990)

2.3. Galerie API 20E

On utilise ce type de galerie biochimique malgré qu'elle ne corresponde pas aux bactéries lactiques. La galerie API 20E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne (prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé, et homogénéiser dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique).

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture. L'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

NB : on a utilisé la galerie API 20E juste pour compléter et confirmer les tests de la galerie classique.



Incubation 24h a37°C

2.4. Mise en évidence de l'activité bactériocinogène

Les méthodes de détection des souches lactiques productrices de bactériocines sont basées sur la diffusion de ces substances protéiques dans un milieu de culture solide ou semi-solide préalablement inoculé par une souche indicatrice (**Elmoualdi et al., 2008**).

Il s'agit de trois souches : *Bacillus subtilis*, *Klebsiella oxytoca*, et *Staphylococcus aureus*. Les souches utilisées dans notre étude sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 08 : Souches utilisées dans le test antimicrobien.

Souche	Gram	Code
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC25923
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	ATCC25922
<i>Bacillus subtilis</i>	+	ATCC21332

2.4.1. Méthode des puits

Pour la mise en évidence de la production de bactériocine par les bactéries lactiques nous avons choisi la méthodes de diffusion et par la méthode des puits basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide qu'on inocule préalablement avec les souches pathogènes et la production de bactériocine se manifeste alors par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits.(**Oubekka, 2012**).

Le milieu Muller Hinton est coulé dans des boites de pétri stériles .Après solidification du milieu, les boites sontensemencées en surfaces par la suspension de la souches pathogènes, (**Tabak et al., 2012**).On réalise quatre puits par boite de pétri avec trois répétitions à des moment différents puis les puits sont remplis par 60 à 80 µl de surnageant obtenu après centrifugation à 10 000 tours /min filtré et neutralisé par NaOH 0,1N de façon à obtenir un pH de 6,5. La diffusion des agents antimicrobiens dans le milieu gélosé est améliorée par une incubation des boites à 37°C pendant 24 heure.

L'activité antimicrobienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour les puits .Les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour les puits seront mesurés, le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieure de 2mm, (**Tabak et al., 2012**).

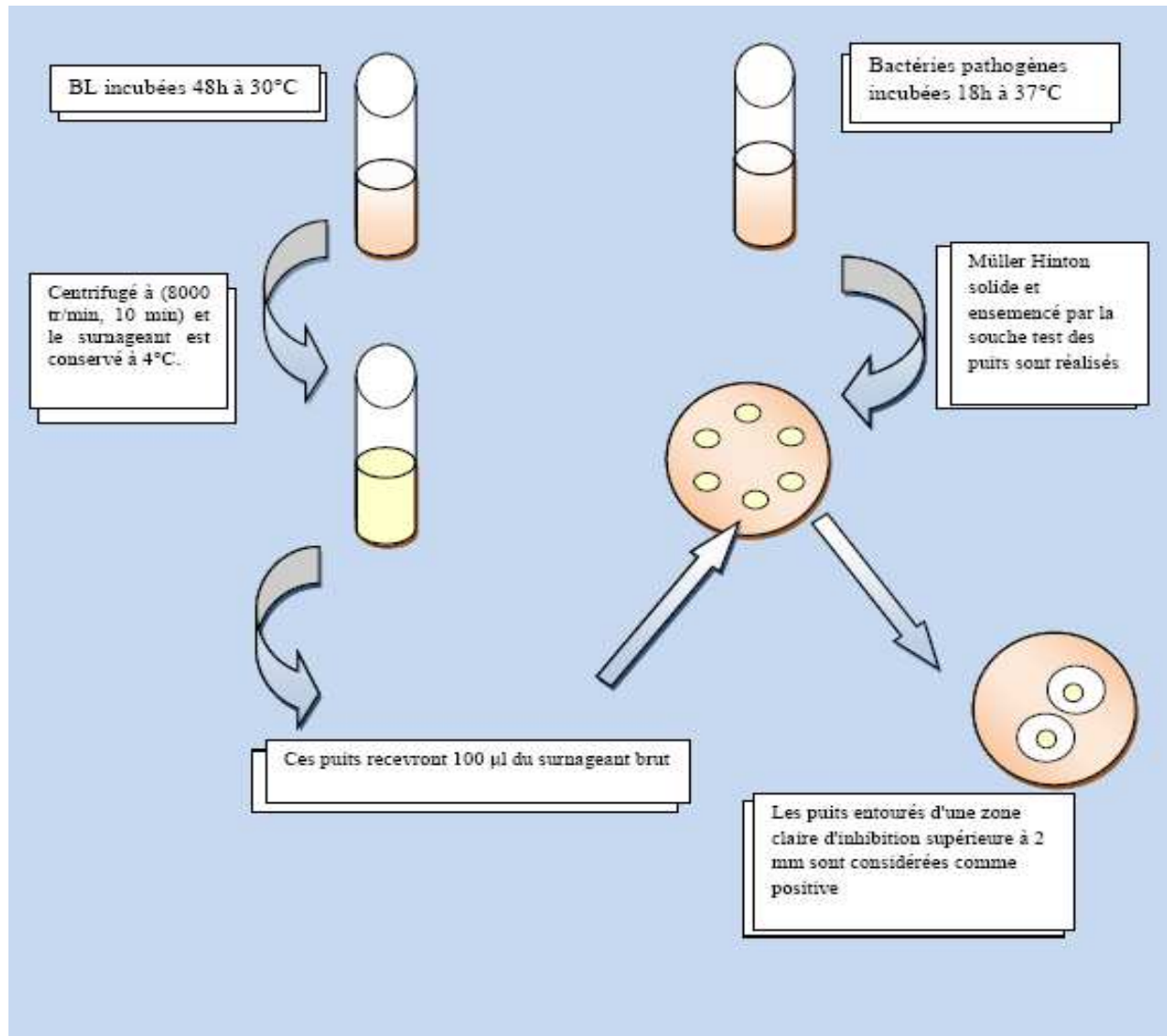


Figure 10 : schéma de la méthode de diffusion en puits

2.4.2. Méthode des disques

Dans cette méthode, un tapis de la souche indicatrice est réalisé sur la surface d'un milieu solide, les BL sont repiquées dans MRS liquide est incubées pendant 18 /24h à 30 °C après l'incubation, une centrifugation réfrigérée 4°C est réalisée 40000 tr/ min pendant 15min ensuite des disques stériles de papier Wattman imbibés de surnageant de la culture à tester sont déposés sur ce tapis. Après incubation, les boîtes sont examinées pour la présence des zones d'inhibition (Berecka *et al.*, 2009).

Résultats et Interprétations



Résultats et discussion

1. Isolement et identification des souches lactiques

Nous avons réussi à isolé et purifié 06 souches de bactéries lactiques appartenant à différents genres : *Lactobacilles*, *Lactocoques*, *Entérocoques*.

1.1. Identification des souches

1.1.1. Examen macroscopiques

L'examen macroscopique des colonies isolées sur le M17 a révélé que ces colonies sont en générale rondes, lenticulaire à contours réguliers, de coloration blanche crème, de petite taille. Celui des colonies isolée sur le milieu MRS, sont généralement de contours réguliers, rondes, parfois lenticulaires de coloration blanches, crème, transparentes, parfois jaunâtres, de taille moyenne ou grandes (**photos 01**).

1.1.2. Examen microscopiques

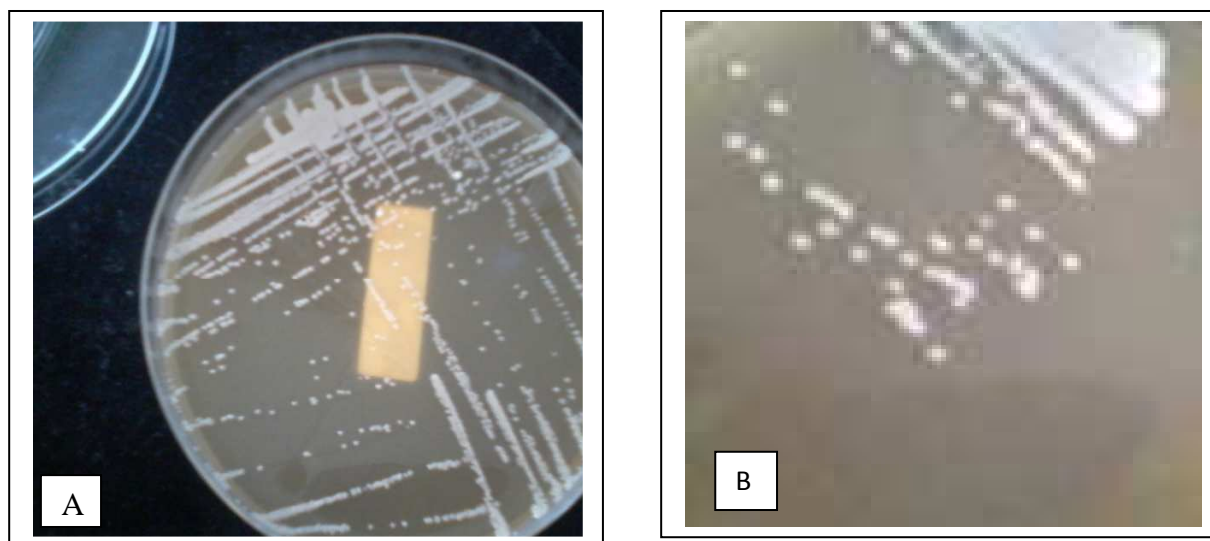
L'examen microscopique des bactéries provenant de M17 des coccis isolées montre des formes en diplocoques, en chaînettes plus au moins longues ou sous forme des amas de cellules .ces dernières ont en général une forme sphérique, de diamètre variable.

L'observation microscopique des bactéries provenant de MRS révèle la présence de cellules en forme de bacilles bâtonnets plus au mois courtes (*coccobacilles*) isolées, en paire et ne chaînette plus au moins longues (**photos 02**).

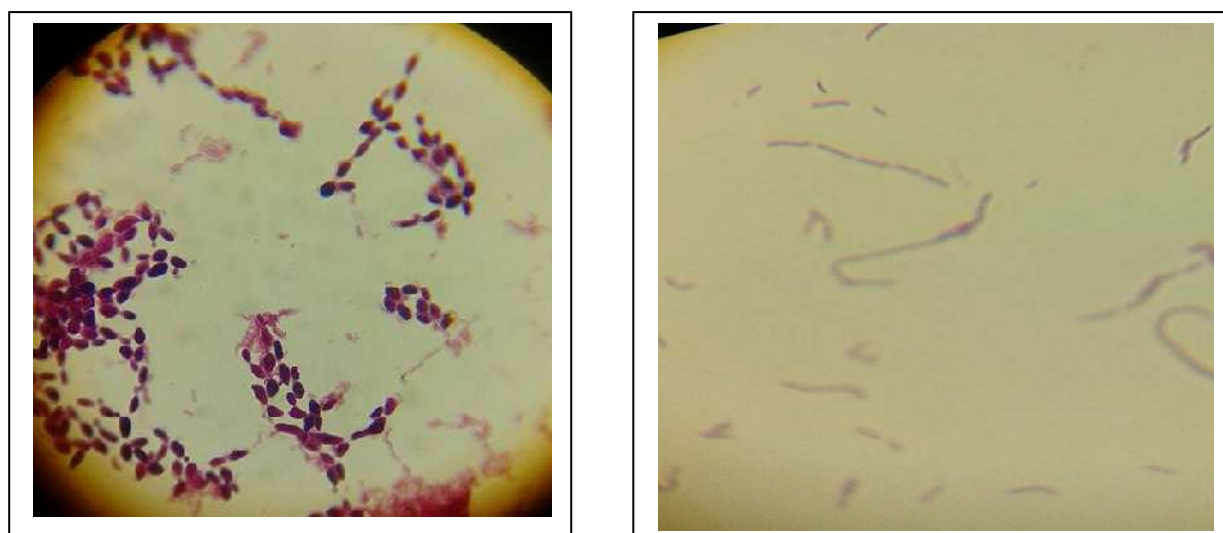
Le **tableau 09** rapporte toutes les observations macroscopiques et microscopiques des différentes souches isolées du lait cru.

Tableau 09 : caractères morphologiques des genres présumés des bactéries lactiques isolées.

Groupes	Micro morphologie	Macro Morphologie	GRAM
<i>Lactobacillus</i> S2, S3 et S6	Bâtonnets longs enroulés, Bâtonnets petits en chaînettes ou filamenteux, isolés ou en chaînettes	Petites colonies blanches à centre marron et bombé	Positif
<i>Streptocoques Lactiques</i> S1, S4 et S5	Coccis, diplocoques et en chaînette	Colonies blanches, Rondes lenticulaires et taille moyenne	Positif



Photos 01 : Aspect des colonies de bactéries lactiques sur gélose, (B) MRS/M17(A).



Photos 02 : aspect microscopique après la coloration de Gram (grossissement X 100)

1.1.3. Identification biochimique et physiologiques des isolats

1.1.3.1. Testes préliminaires

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

Les souches étudiées sont catalase négative car on n'a pas obtenu des bulles d'air après le dépôt de l'eau oxygénée sur la colonie cible, qui est conforme aux résultats trouvés par **CARR et al., (2002)**, ce qui nous oriente à déduire que les souches isolées sont des bactéries lactiques.

Les résultats obtenus ont montré également que toutes les bactéries lactiques sont des bactéries immobiles. Car, Il n'y a pas d'une diffusion dans la gélose (**Photo 03**). Concernant les deux autres tests (nitrate réductase et cytochrome_Oxydase), les résultats obtenus sont négatifs

car, il n'y a pas de coloration rouge et aucune coloration respectivement (**Photo 04**) (**Dellaglio et al., 1994**)

Les résultats ces testes préliminaires sont résumé dans le (**Tableau10**)

Tableau 10 : caractères préliminaires des souches isolées

Souche	Catalase	Mobilité	Nitrate réductase	Cytochrome_Oxydase
S1	-	Immobile	-	-
S2	-	Immobile	-	-
S3	-	Immobile	-	-
S4	-	Immobile	-	-
S5	-	Immobile	-	-
S6	-	Immobile	-	-

(-) : test négatif.

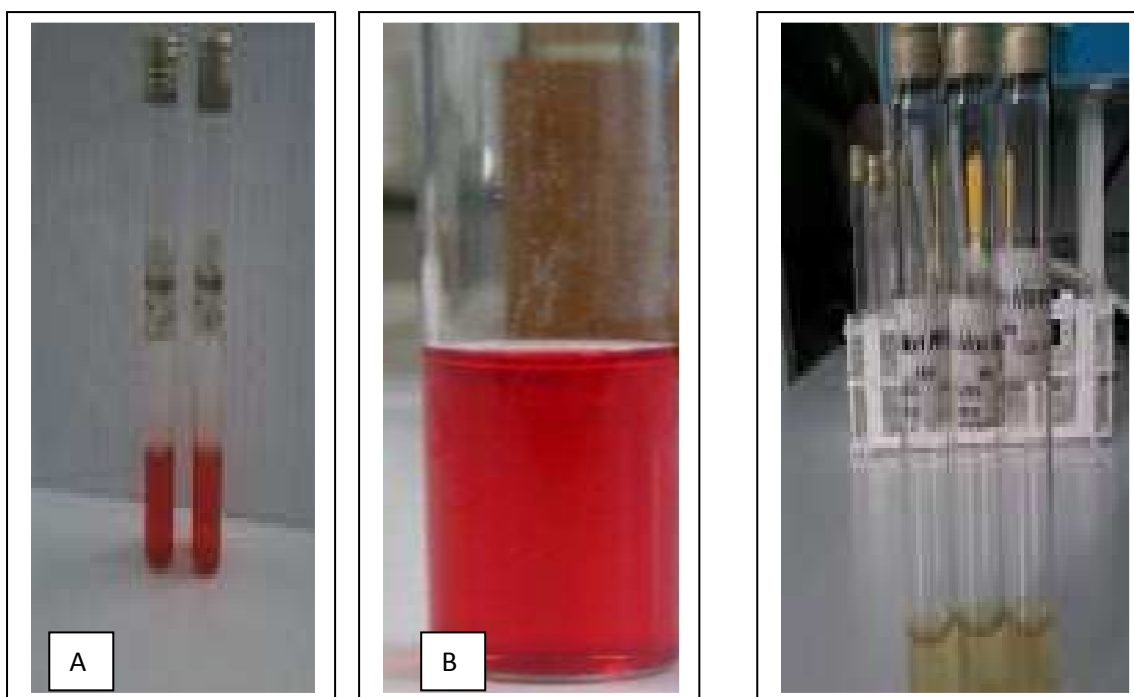


Photo 03 : Résultat de test de Mannitol

Mobilité [A] et le témoin [B]

photo04: Test nitrate réductase

1.1.3.2. Testes spécifiques

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

1.1.3.2.1. Test de production d'acétoïne (VP)

La réaction de Voges – Proskauer est caractéristique de certaines bactéries. D'après les résultats obtenus certaines souches produisent de l'acétoïne en formant un anneau rouge sur le mileu Clark et Lubs .

1.1.3.2.2. Test de connaissance du type fermentaire

D'après les résultats, toutes les souches sont homofermentaire dont les espèces de *Streptocoques lactiques*, ainsi que certains *lactobacilles*. (Tableau11).



Photo 05 : Résultat de test de type de fermentation par Cloche de Durham

Tableaux 11: Résultats du test de type fermentaire.

Souche	Type fermentaire
S 1	Homofermentaire
S 2	Homofermentaire
S 3	Homofermentaire
S 4	Homofermentaire
S 5	Homofermentaire
S 6	Homofermentaire

Le résultat de ce test est résumé dans le **tableau(12)**

Tableau12 : Résultats du profile fermentaire des souches lactiques sur galerie API20E

Souche Tests	S1	S2	S3	S4	S5	S6
ONPG	-	+	+	-	+	-
ADH	+	+	+	+	+	+
LDC	+	+	+	-	-	+
ODC	+	+	+	-	-	-
CIT	+	+	+	-	+	-
H2S	+	+	+	-	-	+
UREE	-	-	-	-	-	+
TDA	+	+	+	-	-	-
INDOLE	-	-	-	-	-	-
VP	-	+	-	+	+	+
GEL	-	-	+	-	-	+
GLU	+	+	+	+	-	-
MAN	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-
SAC	-	+	-	+	-	-
MEL	-	-	-	+	+	-
AMY	-	-	-	+	-	-
ARA	-	-	-	-	-	-

1.1.3.2.4. La fermentation des hydrates de carbones

L'identification est complétée avec l'étude de la fermentation des hydrates de carbones par les souches isolées.

L'identification des souches isolées est basée sur les profils des souches de référence selon les travaux de : Leveau *et al.*, 1991 ; Larpent J-P , 1996 ; Bjokroht J. et Holzappel W., 2006 ; Devoyod J.J. et Poullain F., 1988 ; Teuber M. et Geis A., 2006 ; Hammes W.P. et Hertel C., 2006.

Tableau 13 : Résultats du profil fermentaire des hydrates de carbone.

Souches \ Sucres	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Arabinose	-	+	±	-	-	+
Amylose	-	Nd		nd	nd	nd
Fructose	-	+	+	±	-	+
Galactose	+	+	+	+	±	-
Glucose	+	+	+	-	-	+
Glycerol	+	-	-	+	nd	nd
Lactose	+	±	±	+	+	+
Maltose	+	+	±	+	+	-
Mannitol	+	±	±	+	-	-
Mannose	-	±	+	-	+	-
Mélibiose	-	±	+	-	-	+
Raffinose	-	+	+	-	-	-
Rhamnose	+	±	±	+	±	-
Ribose	+	+	±	+	±	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	±	+	+	+	-	-
Tréhalose	+	+	+	+	+	±
Xylose	-	±	+	+	-	-

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

Résultats et discussion

Les isolats ont été rattachés à trois groupe distribués par ordre de dominance comme suit : *Lactobacilles* (50%), *Lactocoques* (17%) et *Entérocoques* (33%) et rapportés dans le tableau suivant qui représente l'identification phénotypique des souches isolées

Tableau 14 : identification biochimique et physiologique des souches appartenant aux genres : *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Lactobacillus*

Genre	<i>Lactobacillus</i>			<i>Enterococcus</i>		<i>Lactococcus</i>
	<i>Streptobacterium</i>		<i>Thermobacterium</i>			
Espèce	<i>Lb. Acidophilus</i>		<i>Lb. Plantarum</i>	<i>En. Faecalis</i>		<i>Lc. Lactis</i>
Nombre des souches	ST ₂	ST ₃	TH ₆	EN ₁	EN ₄	LCL ₅
Tests préliminaires:						
Gram	+	+	+	+	+	+
La catalase	-	-	-	-	-	-
Le nitrate réductase	-	-	-	-	-	-
Le cytochrome oxydase	-	-	-	-	-	-
La mobilité	-	-	-	-	-	-
La morphologie	B	B	B	C	C	C
Tests physiologiques:						
La croissance à 15 °C	+	+	-	-	-	-
La croissance à 37 °C	+	+	+	+	+	+
La croissance à 40 °C	±	±	+	+	+	+
La croissance à 45 °C	-	-	+	+	+	+
La production de CO ₂	-	-	-	-	-	-
L'ADH	-	-	-	+	+	-
H ₂ S	-	-	nd	-	-	nd
IND	-	-	-	-	-	-
L'halotolérance à 2 % NaCl	+	+	+	+	+	+
L'halotolérance à 4 % NaCl	+	+	+	+	+	+
L'halotolérance à 6.5 % NaCl	±	-	-	±	+	-
La thermorésistance à 63°C pendant 30 mn	-	-	-	+	+	-
La production d'acétoïne	-	-	-	-	-	-

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

Selon le schéma général de différenciation des genres appartenant aux bactéries lactique (**Carr et al., 2002**) et d'après l'utilisation des tests d'identifications morphologiques, physiologiques, biochimiques classiques et de la Galerie API 20 E, nos souches bactériennes isolées à partir du lait cru peuvent être apparentées probablement au genres :

- Souche 1(S1) : *Enterococcus faecalis* désignée EN₁
- Souche 2(S2) : *Lactobacillus acidophilus* désignée ST₂
- Souche 3(S3) : *Lactobacillus acidophilus* désignée ST₃
- Souche 4(S4) : *Enterococcus faecalis* désignée EN₄
- Souche 5(S5) : *Lactococcus lactis* désignée LCL₅
- Souche 6(S6) : *Lactobacillus plantarum* désignée TH₆

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

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (**Dortu et Thonart, 2009**).

Pour la production du facteur antimicrobien par les 6 souches des bactéries lactiques en employant la méthode des disques.

Les souches isolées du lait cru ont été testées pour leur capacité à inhiber les bactéries pathogènes Gram négative *Klebsiella oxytoca* ATCC25922 et les Gram positifs *Staphylococcus aureus* ATCC25923 et *Bacillus subtilis* ATCC21332.

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

Sur un totale de (06) souches lactiques criblées pour la production des substances antimicrobiennes en employant la méthode de diffusion en puits, la méthode des disques (**Photo 07, 08**) et la méthode de double couche, deux (02) souches ont présentés une activité antagoniste dirigée contre *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus subtilis* ATCC21332 et *Klebsiella*

oxytoca ATCC25922 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 montré que les deux (02) bactéries retenues sont identifiées comme suit :

Lactococcus lactis désignée LCL₅

Lactobacillus acidophilus désignée Lb6

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

1.1.4.1. Facteurs antibactériens produits par les lactobacilles

1.1.4.1.1. *Lactobacillus acidophilus* Lb6

Selon **Tagg et al., (1976)**, le spectre d'activité des bactériocines des bactéries Gram+, bien qu'il puisse être variable suivant les souches, ne concerne jamais les bactéries Gram-. Les souches bactériennes testées font partie d'espèces et de genres différents ; les bactéries Gram+ et Gram- sont testées par la méthode des disques.

Tableau15: spectre d'activité antimicrobienne présente par la Méthode des disques.

Souches indicatrices	Diamètre de zone d'inhibition (mm)	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ST ₂	<i>Lactococcus lactis</i> LCL ₅
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	7-14	10
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC21332	14-17	4-19
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC25922	00	00

La bactérie Gram+ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 et *Bacillus subtilis* ATCC21332 est sensible à l'action du facteur antibactérien produit par *Lactobacillus Acidophilus* ST₂ avec des diamètres de zone d'inhibition variés de 7 à 17 mm. (photos7) (Tableau15). 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 signalé que, le genre de bactéries Gram- testée *Klebsiella oxytoca* ATCC25922 n'est pas affectées par la substance inhibitrice produite par *Lactobacillus acidophilus* ST₂, ce qui est une caractéristique des bactériocines des bactéries Gram+ en général, et lactiques en particulier.

La résistance des bactéries Gram- est attribuée à la nature particulière de leur enveloppe cellulaire, les mécanismes d'action décrits pour les bactériocines faisant intervenir une adsorption de ces molécules aux cellules sensibles.

Selon **Bhunia et al., (1991)**, la pédiocine Ac H (produite par *P. acidilactici* H) interagit avec les acides lipotéchoïques, absents chez les bactéries Gram-.

Ces molécules joueraient le rôle de site de réception non spécifique nécessaire pour produire l'effet bactéricide. **Kalchayanand et al., (1992)** attribuent la résistance des bactéries Gram- à la pédiocine Ac H 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., 1994a**).

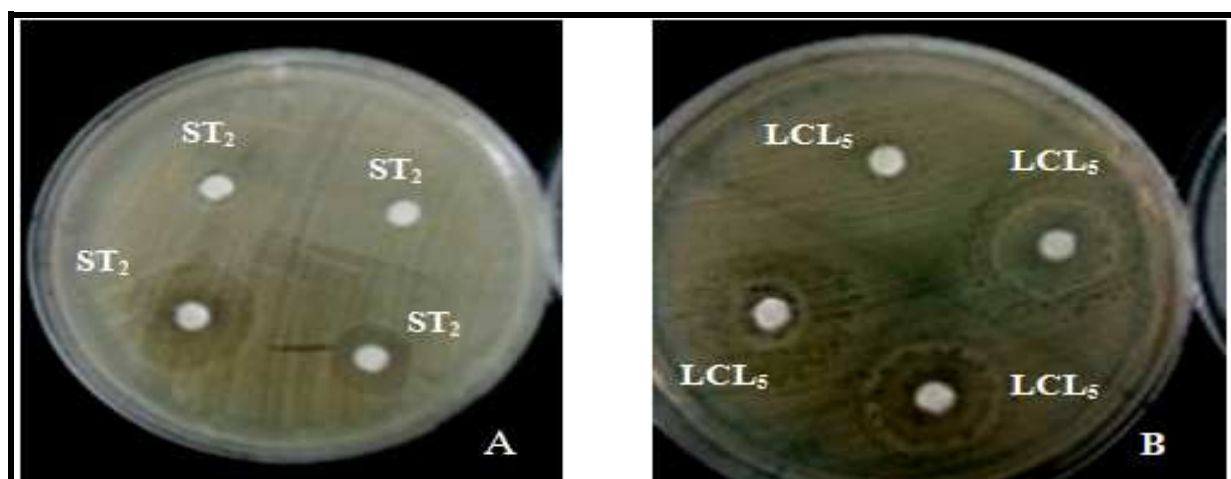


Photo 07 : Inhibition obtenue par la méthode des disques de la souche *Lactobacillus acidophilus* ST₂ contre *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (A) et *Bacillus subtilis* ATCC21332 (B)

1.1.4.2. Facteurs inhibiteurs produits par les lactocoques

1.1.4.2.1. *Lactococcus lactis* LCL₅

La substance antibactérienne produite par *Lactococcus lactis* LCL₅ possède un spectre d'activité large par rapport les souches indicatrices testées, avec des zones d'inhibition allant de 4 à 19 mm de diamètre (**Tableau 15**).

Le facteur antimicrobien produit par cette souche a montré une inhibition contre les bactéries Gram+ (*Bacillus* et *Staphylococcus*) avec des profils différents d'inhibition, Cela a déjà été constaté pour plusieurs bactériocines, comme la nisine (*Lc. lactis ssp. lactis* 11454) (**Benkerroum et Sandine, 1988**), cette propriété serait liée, selon **Schillinger et Lüke (1989)**,

à la position taxonomique des souches indicatrices, proche de celle des *lactococcus* (**Ludwig et al., 1984 ; Ruhland et Fiedler, 1987 ; Stackebrandt et Teuber, 1988**).

La spécificité de l'action des bactériocines parmi les bactéries Gram+ est fonction des caractéristiques des souches : composition des protéines et des phospholipides membranaires et de la couche de peptidoglycane.

Selon **Schved et al., (1994c)**, la séquence d'acides aminés d'une bactériocine donne lieu à un certain nombre de charges positives avec des positions relatives particulières, ce qui permet la reconnaissance d'un site récepteur par neutralisation des charges négatives se trouvant à la surface membranaire. Le deuxième facteur de spécificité concernerait l'interaction entre la séquence hydrophobe de la bactériocine et les phospholipides de la membrane (**Schved et al., 1994c**).

D'autre part, la bactérie gram-négative testée ; *Klebsiella oxytoca* ATCC25922 n'a pas été touchée par la substance antibactérienne, cette résistance peut être justifiée par la nature particulière de l'enveloppe cellulaire.

En effet, **Bhunja et al., (1991)**, montrent que la pédiocine Ac H (produite par *P. acidilactici* H) interagit avec les acides lipotéchoïques, absents chez les bactéries Gram-. Ces molécules joueraient le rôle de site de réception non spécifique nécessaire pour produire l'effet bactéricide. **Kalchayanand et al., (1992)** attribuent la résistance des bactéries Gram- à la pédiocine Ac H 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., 1994a**).

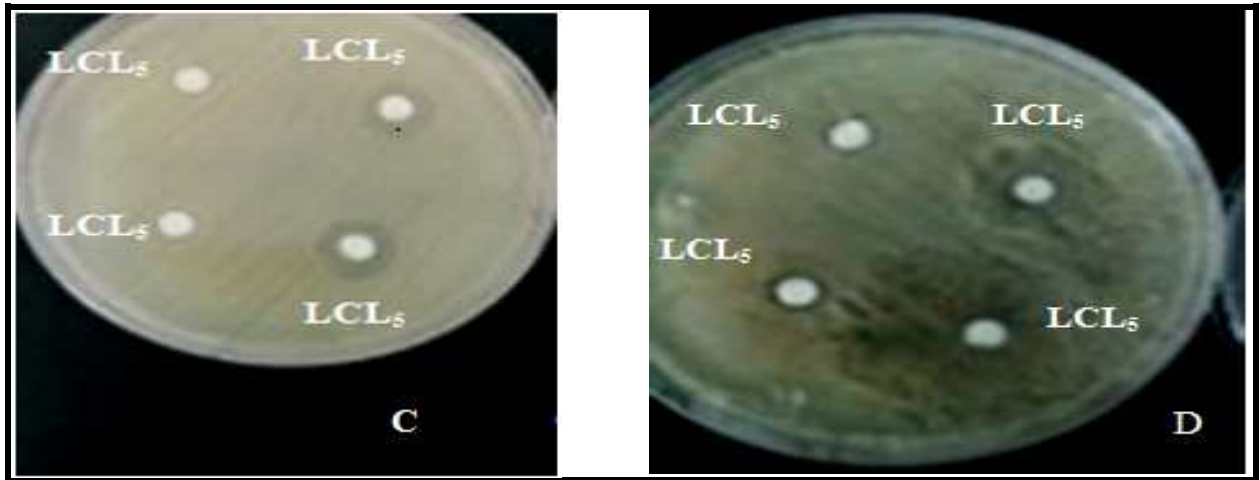


Photo 08: Inhibition obtenue par la méthode des disques de la souche *Lactococcus lactis* LCL₅ contre *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (C) et *Bacillus subtilis* ATCC21332 (D)

Conclusion

Conclusion général

Les études faites sur les différentes bactériocines depuis une vingtaine d'années ont permis d'acquérir beaucoup de reconnaissance sur les propriétés et les différents modes d'action des bactériocines. A ce jour, la nisine est la seule à posséder le statut GRAS (Generally Recognized As Safe). Ce statut fait qu'elle peut être ajoutée comme additif alimentaire dans plus d'une cinquantaine de pays (**Sahl et Bierbaum, 1998**). D'autres, comme la lacticine 3147, visent aussi cet usage. De plus, l'usage de certaines bactériocines comme agent thérapeutique a même été soulevé (**Ryan et al., 1998**).

Dans notre travail, nous avons d'abord isolé des bactéries lactiques à partir de lait cru 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'identification aux quels l'ensemble des souches isolées étaient soumises ont permis de cribler 06 souches lactiques appartenant aux genres de *Lactococcus*, *Enterococcus* et *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 bio-conservation des produits alimentaires. La recherche des activités antimicrobiennes chez les bactéries lactiques isolées nous a permis de constater que sur un total de 6 souches lactiques présentent le pouvoir de produire des bactériocines dirigées contre *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus subtilis* ATCC21332 et *Klebsiella oxytoca* ATCC25922, seulement deux souches (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*) possèdent une activité bactériocinogène.

Les substances antimicrobiennes produites par les souches bactériennes isolées du lait cru 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+ testées (*Staphylococcus aureus* ATCC25923 et *Bacillus subtilis* ATCC21332). 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**).

Conclusion

La nomenclature des bactériocines n'obéissant pas à des règles bien établies (**Tagg et al., 1976**), selon les résultats des tests de caractérisation des substances antimicrobiennes isolées, il a été décidé de désigner les bactériocines produites par les 2 souches isolées de la façon suivante:

- Acidocine ST₂ pour la bactériocine produite par : *Lactobacillus acidophilus* désignée ST₂
- Lactacine LCL₅ pour la bactériocine produite par : *Lactococcus lactis* désignée LCL₅

References bibliographiques

- **Aamime Y., (2002).** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York: pp 261-366.
- **Albano H., Pinho C., Leite D., Barbosa J., Silver J., Carneiro L., Magalhães R. (2009).** Evaluation of bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for « Alheira », a fermented meat sausage. *Food Control*, **20**: pp 764-770.
- **Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P., Simpson R. (2002).** Composition, propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait. In « V IGHOLA C.L, science et technologie du lait transformation du lait. Fondation de technologie laitière du Québec». Presses internationales polytechnique : p 600.
- **Ammor M. (2004).** écosystème microbien d'un atelier de salaison : identification et propriétés des bactéries lactiques : p123.
- **Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogens bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control* 17: pp 454-468.
- **Ammor M.S., Mayo B. (2007).** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production, an update. *Meat science*, **76**: pp138-146.
- **Axelsson L. (1998).** Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Lactic acid
- **Badis A., Guetarnib D., Moussa Boudjemaa B., Hennic D.E., Kihal M. (2004).** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, **21**: pp579–588
- **Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M., Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Technol.* Vol 23: pp 31.
- **Bakar M., Diop R., Dubois-Dauphin E., Tine A., Ngom J., Destain P., Thonart, (2007)** Bacteriocin producers from traditional food products. *Biotechnology. Agron. Soc. Environ*, 11: pp 275–281.
- **Barefoot S. T., Klaenhammer T. R. (1983).** Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied Environ. Microbiol.* , 45: pp 1808-1815.
- **Bekhouche F. (2006).** Les bactéries lactiques du lait cru de vache et microorganismes putréfactifs d'olives noires et vertes. Thèse de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie: génie alimentaire. Univ de Mentouri Constantine : pp 119.

- **Belguesmia Y., Naghmouchi K., Chihib N.E., and Drider D. (2011).** Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. In: Drider D. and Rebuffat S. (Eds) .*Prokaryotic Antimicrobial Peptides: from Genes to Applications*. Springer Verlag
- **Benharba S., Djebbar Z. (2014).** La recherche de l'activité antimicrobienne de bactéries lactiques isolées à partir de laits crus de deux fermes locales sur *Staphylococcus aureus* : p45
- **Benkerroum N., Sandine w.E. (1988).** New nomenclature of the γ -shaped lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: pp519-522
- **Berecka M. P., Wasko A., Koston D. (2009).** Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *Annales. Vol. LXIV*1.
- **Bierbaum G., Sahl H. G. (2009).** Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol.*10: pp 2-18.
- **Björkroth J., Holzapfel W. (2006).** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., and Stackebrandt E. (Eds). *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community (3rd edition)*. Springer Verlag. New York, USA : pp 267-319.
- **Boudjemaa Khaled, (2008).** Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactisérum par streptococcue thermophilus. Mémoire de magister. option biochimie et microbiologie appliquées. Université M'Hmed Bougara –Boumerdés
- **Boyoval P., Terré S et Corre C. (1988).** production d'acide lactique à partir de permet de lactosérum par fermentation continue en réacteur à membrane. *Lait*, 1 : pp 65-84.
- **Broadbent J.R. (2001).** Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: *Applied Dairy Microbiology* (Marth E.H. ET Steele J.L.). 2^e Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York : pp 243-300.
- **Calvez S., Belguesmia Y., Kergourley G. (2009).** in bactériocines : de la synthèse aux applications in bactéries lactiques : physiologique, métabolisme, génomique et applications industrielles edition : *Economica* .2009 : pp 100-122.
- **Carbonnelle B., Denis F., Mannonier A., Binon G., Vargiver K. (1990).** Bactériologie médicale. *Techniques visuelles* : pp23
- **Carine Dortu, Philippe Thonart, (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bio conservation des produits alimentaires, 13 : pp 143- 154.
- **Carr f, Don Chill , Nino Maida , Frank J. (2002).** The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Rev. Microbial.*

- **Chammas G.I., Saliba R., Béal C. (2006)** Characterization of the fermented milk Laban with sensory analysis and instrumental measurements. *J. Food Sci.* 71: pp 156–162.
- **Champagne et al., (1992). In Boudjani W. (2009).** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen : pp 73
- **Chatterjee C. M., Paul L., Xie W., van der A., Donk, (2005)** .Biosyntheses and mode of action of lantibiotics . *Chemical Reviewse* 105: pp 633-683.
- **Collins M.D., Jons D. (1981).** Growth *Bifidobacteria* in milk and preparation of *Bifidobacteria infantis* for a dietary adjunct. *J. Dairy Sci*, 67 : pp 1376-1380
- **Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J. et Wallbanks S. (1993).** Taxonomic studies of some *Leuconostoc* like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* (75): pp 595-603.
- **Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. (2005b)** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.*3: pp 777-788.
- **Coudou L. (1997)** : Etudes des faudesdu lait cru : moulage et écrémage .N 28°
- **Curk M.C., Peladan F., Hubert J.C. (1993):** Caractérisation biochimique des lactobacilles brassicoles. *Lait*, 73: pp 215-231.
- **Cuq J.L. (2007).** Microbiologie Alimentaire. Edition Sciences et Techniques du Languedoc. Université de Montpellier : pp 20-25.
- **Debry G. (2001).** Lait, nutrition et santé. Edition Tec et Doc Lavoisier, Paris.
- **Deegan. L. H., Cotter P. D., Hill C., Ross P. (2006).** Bacteriocins: biological tools for bio preservation and shelf-life extension. *International. Dairy. Journal.*
- **Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits.
- **Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M., Janssens C. (1994).** In : Bactéries lactiques aspects fondamentaux et technologiques, 1 : pp 25-114
- **Dellaglio F. (1994).**Caractéristiques générale des bactéries lactiques .Ed lorica Lavoisier, paris.
- **De Man J.C. (1960).**Mediums for the cultivation of lactobacilli
- **Demazeaud M., Congan M. (1996).** Role of cultures in cheese ripening. In: Cogan T.M.,Accolas J.P (Eds.), *Dairy Starter Cultures. VCH Publishers, Inc., New York:* pp 207-231.
- **De Roissart, (1986).** Bactéries Lactique dans le lait et produits laitieres. Ed. Technique documentation. Lavoisier. Paris : pp445

- **De Roissart H. (1986).** Bactéries lactiques IN écosystèmes microbien d'un atelier fermier de sa liaison identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de doctorat université de Rennes-France
- **De Roissart H., Luquet F.M. (1994).** Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol. 1 : pp 1-286
- **Desmazeaud M. (1983).** Comment les bactéries lactiques se comportent elles dans le lait. Technique laitière: 976 : pp11-14.
- **Desmazeaud M.J., De Roissart, Oissard H. (1992).** Métabolisme général des bactéries lactiques, Bactérieslactiques, aspects fondamentaux et technologiques. *Ed. Lorica Uriage*. 1: pp 169 -207.
- **Diep D.B., Nes I.F. (2002).** Ribosomal synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Current Drug Targets* 3: pp 107–122.
- **Dillon J.C. (2008).** Place du lait dans l'alimentation humaine en région chaude. Edition A. P.G. (Agro Paris Tech).
- **Drider D. et al., (2006).** The continuing story of class Iia bacteriocin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(2) : pp 564-582.
- **Drider J., Prevost H. (2009).** Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. Ed. Economica., paris : pp 99 -12
- **Dortu C., Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* , 13: pp 143-154.
- **Eijsink V.G. et al., (1998).** Comparative studies of class Iia bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9): pp 3275-3281.
- **Ennaher et al., (2000).** Class Iia bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbial Rev.* 24: pp 85-106.
- **Elmoualdi L., Labioui H., Boushama L., Benzakour A., Ouhssine M., El Yachioui M. (2008).** Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis subsp.Cremoris*. *Bull. Soc.Pharm. Bordeaux* : pp 147
- **El-Ziney M.G., Uyttendaele M., Debevere J. and Jakobsen M. (1998).** Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol co fermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol.Let.* (2010): pp 913-916.

- **Falagas M. E., Betsi G. I., Athanasiou S. (2006).** Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother.*58: pp 266-272.
- **Farber J.M. (1991).** Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology: Is view. *J. Food Prot.* 54: pp 58-70.
- **Fil-Norme. (1991)** .Yaourt identification des micro-organismes caractéristiques: *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *Sterptococcus. salivarius* subsp *thermophilus*. *Revue* .46: pp1-4.
- **Fimland G. et al., (2000).** A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.*, 182 : pp 2643- 2648
- **Fujitaya, Okamoto, Irie, (1984).** Plasmid distribution in *lactic streptococci*. *Agricultural and biological chemistry* ,48: pp 2013 -2015
- **Galvez A., Abriouel H., Lucas López R., Ben Omaret N. (2007).** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol.*120: pp 51-70
- **Gálvez A., Abriouel H., Ben Omar N., Lucas R. (2011).** Food Applications and Regulation In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer Verlag. Jaen, Spain: pp 253-390.
- **Gevers D. (2002).** Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse Doc. Univ. Gent. Fac. Sci. Gent. Belgium.
- **Gillor O., Etzion A., Riley M. A. (2008).** The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl.Microbiol. Biotechnol.*, 81: pp 591-606.
- **Gonzalez, et al., (2007).** In **Boudjani, W. (2009).** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen : pp 73.
- **Guinane C. M., Cotter P. D., Hill C., Ross P. (2005).** Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J Appl Microbiol.*98: pp 1316-1325.
- **Guiraud J., Galzey P. (1980).** Analyse microbiologique dans les industries alimentaires. *Ed. Lusine nouvelle*, Paris : pp 236.
- **Guiraud J.P. (1998).** Microbiologie des principaux produits alimentaires, Microbiologie alimentaire. Ed ©Dunod, Paris.
- **Harris L., Daeschel M., Stiles M., Klaenhammer T. (1989).** Journal of food protection, 52: pp 384.

- **Hebboul F.Z., Mazouzi H., Soltani S. (2005).** Etude comparative de la qualité Alimentaire entre trois types de lait frais : bovin, caprin, camelin. Mémoire d'ingénieur, Département de Biologie, Université de Laghouat : pp 71.
- **Heng N. C. K., Wescombe P. A., Burton J. P., Jack R. W., Tagg, J. R. (2007a).** The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley, M. A., and Chavan, M.A. (Eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer Verlag, Berlin Germany: pp 45-92.
- **Hermier J., Lenoir J., Weber F. (1997).** Rôle des bactéries lactiques dans la production des facteurs anti microbien, les groupes microbien d'intérêt laitier. Ed. Cepil. Paris : pp 9-60.
- **Holzappel W. H., Geisen R., and Schillinger U. (1995).** Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol.*24: pp 343-362.
- **Holzappel W.H., Haberer B., Geisen R., Bjorkroth J. ET Schilinger. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (Suppl): pp 365-373.
- **Hotchkiss J.H., Chen J.H., Lawless H.T. (1999).** Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. *J. Dairy Sci.* 82: pp 690-695.
- **Ho T.N.T., Tuan N., Deschamps A., Caubetr, (2007).** Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. *Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology*: pp 134-142.
- **Hughenoltz J .et Starrenburg M .J. C. (1992).** diacetylyle production by different strain of *Lactococcus lactis sub sp ,lactis var , diacetylatis and leuconostoc ssp* .Applied Microbiology and biotechnology ,38: pp17-22.
- **Huyghebaert. (2006).** Stratégies des produits à base de lait cru. Bruxelles

-J-

- **Jedidi, H. (2007).** Effet du stress gastro-intestinal sur la physiologie et le métabolisme des bactéries lactiques et probiotiques. Mémoire de Maître Es-Sciences, Institut de biologie, Université de Tlemcen. Université Laval Québec: pp 90
- **Joffin J. N. (1996)** .Microbiologie technique. Centre régional de documentation pédagogique d'aquitane Bordeaux .France : pp 219-223.
- **Joffin J.N. et Leyral G. (2001).** Microbiologie.Dictionnaire des Techniques, 3ème Ed.Collection Biologie Technique. CRDP d'aquaine, Bordeaux.

-K-

Kalchayanand N., Hanlin M.B., Ray B. (1992). Sublethal injury makes Gram-negative And resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl*

- **Karthikeyan V., Santhosh S.W. (2009).** Study of bacteriocin as a food preservative and the *L. acidophilus* strain as probiotic. *Pak. J. Nutr.* **8**: pp 335-340.
- **Klaenhammer T. R. (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*.**70**: pp 337-349.
- **Klein G., Pack A., Bonaparte C., and Reuter, G. (1998):** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*.**41**: pp103-125.
- **König H., Fröhlich J. (2009).** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg.
- **Kostinek M., Specht I., Vinod A., Edward, Ulrich Schillinger U., Hertel C., Wilhelm H., Holzappel, Charles M.A.P., Franza. (2006).** Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gary, a traditional African food. *Systematic and Applied Microbiology*. **28**: pp527–540.

-L-

- **Laease, (2005).** In **Boudjani W. (2009).** Action de la flore lactique sur les bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de Tlemcen : p73.
- **Lahtinen S., Ouwehand A.C., Seppo S., Von wrigh A. (2012).** Lactic Acid Bacteria microbiological and functional aspects , Fourth edition . Taylor et Francis Group, **13**: 978-1-4398 -3678-1 .UK.
- **Larpent J.P. (1997).** Mémento technique de microbiologie .3eme Ed. Technique et Documentation Lavoisier. Paris : p910.
- **Lenoir J., Hermier J., Weber F. (1992).** Les groupes microbiens d'intérêt, Ed Cidil : pp 30-50.
- **Leveau J. Y., Bouix M. (1989).** La flore lactique .In- Guide pratique d'analyse micro Biologique du lait et produits laitiers. *Tech Documentation, Lavoisier* : p250
- **Leveau J.Y., Bouix M., Deroissart H. (1991).** La flore lactique. In : techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Vol 2. Ed .Tech
- **Luquet F. M. (1985).** Lait et produits laitiers - Vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits De la mamelle à la laiterie. Tech. & Doc., Coll. STAA, Lavoisier, Paris.

-M-

- **Makhloufi K. (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat de L'uni Pierre et Marie Curie : p228.
- **Marcel Mazyoyer CM, Larpent J.P. (1996).** Microbiologie Alimentaire, Tom 2, Aliment fermentés et fermentation alimentaire 2^{eme} édition, Technique documentation.
- **Marchal N., Bourdon J.L., Richard Cl. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3^{ème} Ed., Doin éditeurs, Paris
- **Matamoros S. (2008).** caractérisation de bactéries lactiques psychotrophe en vue de leur utilisation dans la bio préservation des aimants .Etude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid.
- **Marth E. H., Steele J. L. (2001).** Applied dairy microbiology. 2^{ème} Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- **Maqueda M., Sanchez-Hidalgo M., Fernandez M., Montalban-Lopez M., Valdivia E., and Martinez-Bueno M. (2008).** Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*32: pp 2-22.
- **McAuliffe O., Hill C. (2001).** Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: pp 285-308.
- **Meftouh W., Sabah k., Laacheb Z. (2011).** Les bactéries lactiques et leur utilisation dans l'industrie laitiere (production de fromage).diplôme d'étude supérieures (D.E.S).uni El Hadj Lakhdar-Batna : p54.
- **Mkrtchyan H., Gibbons S., Heidelberger S., Zloh M., Llmakki H.K. (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.* Vol. 35: P 255-260
- **Moretro T., Aasen I.M., Storro I., Axelsson L. (2000).** Production of sakacin P by *L. sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbiol.*, 88(3) : pp 536-545.
- **Moraes M. P., Perin L. M., Ortolani M. B. T., Yamazi A. K., Viçosa G. N., Nero L. A. (2010).** Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *Food Sci.Technol.* 43: pp1320-1324.
- **Morency H., Mota-Meira M., LaPointe G., Lacroix C., and Lavoie M.C. (2001).** Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a .mutacin or a lantibiotic. *Can J Microbiol.*47: pp 322-331.

- **Nilsen T., Nes I.F. & Holo H. (2003).** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(5) : pp 2975-2984.
- **Novel G. (1993).** Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. et Doc. Lavoisier Paris : pp 170-374.
- **Ogunbanwo S.T., Sanni A. I., Omilude A. A. (2003).** Characterization of lactobacilli in cheese. *Journal of dairy research*, 25: pp 431-438.
- **Oubekka D. (2012).** Dynamique réactionnelle d'antibiotique au sein des bio films de *Staphylococcus aureus* Apport de la microscope de florescence multimodale .Institut des sciences Moléculaire d Oray (ISMO) UMR 8214 Bâtiment 201 – Université Paris sud 11 - 91405 Orsay
- **Papamanoli F., Lanciotti R., Mathara J. M., Guerzoni, M. E. and Holzapfel. W. H. (2006).** Potential of functional strains isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks, *Int. J. Food Microbiol.* 107: pp 1 – 11
- **Pilet M.F., Magras C., Federigh M. (2005).** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2^e Ed., *Economica*. Paris: pp 219-240.
- **Pirotta M., Gunn J., Chondros P., Grover S., O'Malley P., Hurley S., and Garland S. (2004).** Effect of *Lactobacillus* in preventing post-antibiotic vulvovaginal candidiasis: a randomised controlled trial. *BMJ*.329: p548.
- **Pot B., Devriese L.A., Uris D., Vandamme P., Haesebrouck F. ET Kersters K. (1996).** Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: pp 213-222.
- **Pot B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris: pp1-106.
- **Pringsulaka O., Thongnam N., Suwannasai N., Atthakor W., Pothivejkul K., Parente E., Ricciardi A. (1999).** Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: pp 628-638.
- **Priyanka S., Prakash A. (2009).** Screening of Lactic Acid Bacteria for Antimicrobial Properties against *Listeria monocytogenes* Isolated from Milk Products at Agra Region. *Internet Journal of Food Safety*, 11: pp81-87
- **Ramose p., Novel M., et Novel G. (1983).** Fragmentation des plasmides lactose –protéase de *Streptococcus lactis* et de *S lactis* ssp .diacetylactis .Analyse Microbiologique. (Ins .pasteur) 143B : pp387 -399.

- **Rangsiruji A. (2011).** Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control*, 23: pp547-551
- **Richard C. et al., (2006).** Evidence on correlation between number of Disulfide Bridge and toxicity of class Iia acteriocins. *Food Microbiol.*, **23**(2): pp 175-183.
- **Riley M. A., Chavan M. A. (2007).** Bacteriocins: Ecology and Evolution. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- **Roissared et Luquet, (1985).** Les bactéries lactiques édition Lorisa, volume 1, Luquet F. M, lait et produits laitiers, *Tec et Doc*, édition Lavoisier, Paris : pp362-400-402.
- **Ruiz F. O., Gerbaldo G., Asurmendi P., Pascual L. M., Giordano W., and Barberis I. L. (2009).** Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol.*59: pp497-501
- **Saad N. (2010).** Caractérisation d'entités moléculaire de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique lactobacillus plantarium 299V avec l'hôte : approche in vitro .N (7/2010).
- **Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D. E., Prevost H et Kihal M. (2002).** "Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides d'Algérie", *Journal. Algérien des Régions Arides* : pp 1-10.
- **Saidi Noureddine, (2007).** La microflore lactique du lait cru de chèvre local : études, microbiologique, biochimique et génétique des bactéries lactiques d'intérêt bio-préservateur Thèse de Doctorat. Université d'Oran : pp216.
- **Salminen S., Wright N. A. V., Ouwehand A. (2004).** Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.
- **Savijoki K., Ingmer H. & Varmanen P. (2006).** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: pp 394-406.
- **Schillinger U., nd Lucke F.K. (1987).** Identification of lactobacilli forms meat and meat product *J.Food Microbiol*, 4: pp199-208.
- **Siegumfeldt H., Rechinger KB., Jakobsen M. (2000).** Dynamic changes of intracellular Ph in individual lactic acid.
- **Singleton P. (1999).** Bacteriologies, 4ème Eds. Dunod, Paris: pp 380- 415.
- **Smaoui S. (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.
- **Stackebrandt E. et Teuber M. (1988).** Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70: pp317-324.

- **Stiles M. E. and Holzapfel W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.*36: pp1-29.
- **Tabak S., Bensoltane A. (2012).** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus, bifidobactérium bifidum et lactobacillus bulgaricus*) Revue « Nture & Technologie » .N° 06 : pp71 -79
- **Terzaghi B .F. (1975).** Improved medium for lactic Streptococci and their bactériophage .*Applied .Microbiol .*29: pp807-813
- **Tichaczek P. S., Vogel R. F., Hammes W.P. (1993).** Cloning and sequencing of *curA* encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. *Arch Microbiol.*160: pp 279-283.
- **Tichaczek P. S., Vogel R. F., Hammes W. P. (1994).** Cloning and sequencing of *sakP* Encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH 673. *Microbiology.*140 (Pt 2): pp 361-367.
- **Uehara S., Monden K., Nomoto K., Seno Y., Kariyama R., Kumon H. (2006).** A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Int. J. Antimicrobial Agents.* Vol. 28.it. 3éme édition. Edition la maison rustique, Paris : pp30-34
- **Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J. (1996).** Polyphasictaxonom, a concensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: pp407-438.
- **Veisseyre R. (1975).** Technologie du lait constitution, récolte, traitement et transformation du lait. 3éme édition. Edition la maison rustique, Paris.
- **Vierling E. (2008).** Aliments et boissons filières et produits. 3éme édition Biosciences et techniques. Paris : pp15-16
- **Vignola C.L. (2002).** Science et technologie du lait, transformation du lait. Ecole polytechnique de Montréal, 29 : p 355
- **Wagner M.K., Moberg L.J. (1989).** Present and future use of traditional antimicrobials.*Food Technol.*1 : pp143-14
- **Yateem A., Balba M.T., Al-Surrayai T., Al-Mutairi B., Al-Daher R. (2008).** Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Sci.* Vol. 3 : pp194-199.

Site internet

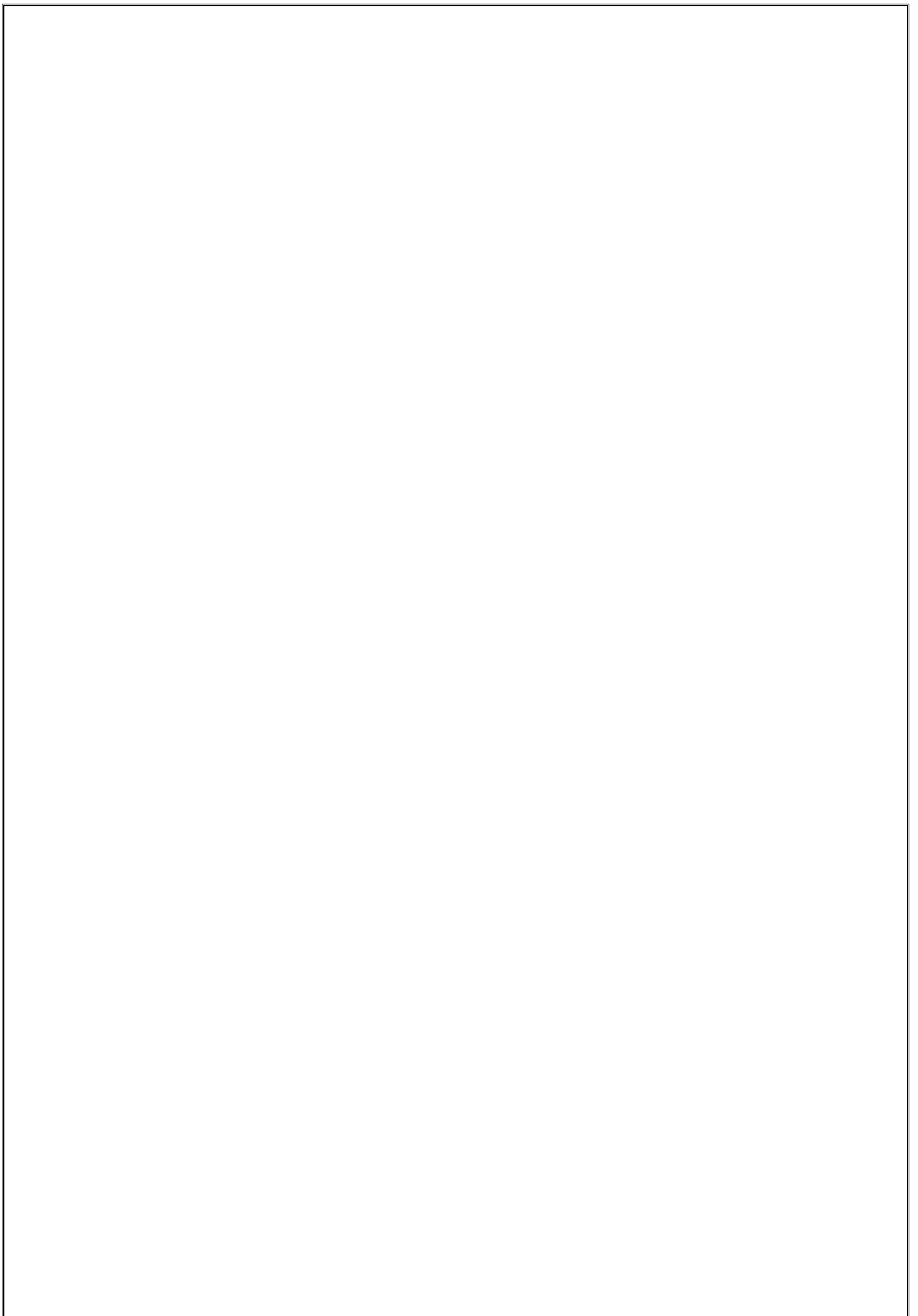
Site01 :(http://www.institutrosell-lallemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus_R52_big.jpg).

Site02 :(<http://www.oocities.com/cheezyfr/photos/Leuconostoc.jpg>).

Site03 :([https://www.google.dz/le rôle des bactéries lactiques dans la fabrication du yaourt](https://www.google.dz/le_rôle_des_bactéries_lactiques_dans_la_fabrication_du_yaourt)

Annexes





Les annexes

Annexe 1: Composition des milieux de cultures (g/l)

1. Milieux solides

Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure	05g
Extrait de viande	05g
Peptone	10g
Acétate de sodium	05g
Citrate de sodium	02g
Glucose.....	20g
KH ₂ PO ₄	02g
MgSO ₄	0.1g
MnSO ₄	0.05g
Agar.....	12g
Tween80	01ml
Eau distillée q. s. p	1000ml

Milieu M17

Extrait de levure	2.5g
Extrait de viande	0.5g
Peptone de caséine	2.5g
Peptone de viande	2.5g
Peptone de soja	05g

Les annexes

Peptone de soja	05g
Acide ascorbique	0.5g
B-glycérophosphate de sodium	19g
Agar.....	12.75g
Sulfate de magnésium	0.25g
Eau distillée q.s.	1000ml

Mannitol-mobilité

Peptone trypsique de viande	20g
Agar.....	04g
Mannitol	02g
KNO ₃	01g
Rouge de phénol à 1 %.....	04ml

2. Milieux liquides

Eau physiologie

Na Cl	09g
Eau distillée	1000ml

Clark et Lubs

Peptone trypsique ou poly peptone	5-7g
Glucose	05g
Phosphate di potassique	05g
Eau distillée q.s.	1000ml

Annexe 2: Coloration de Gram

- 1- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- 3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 9- Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement. Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres ;

Annexe 3:

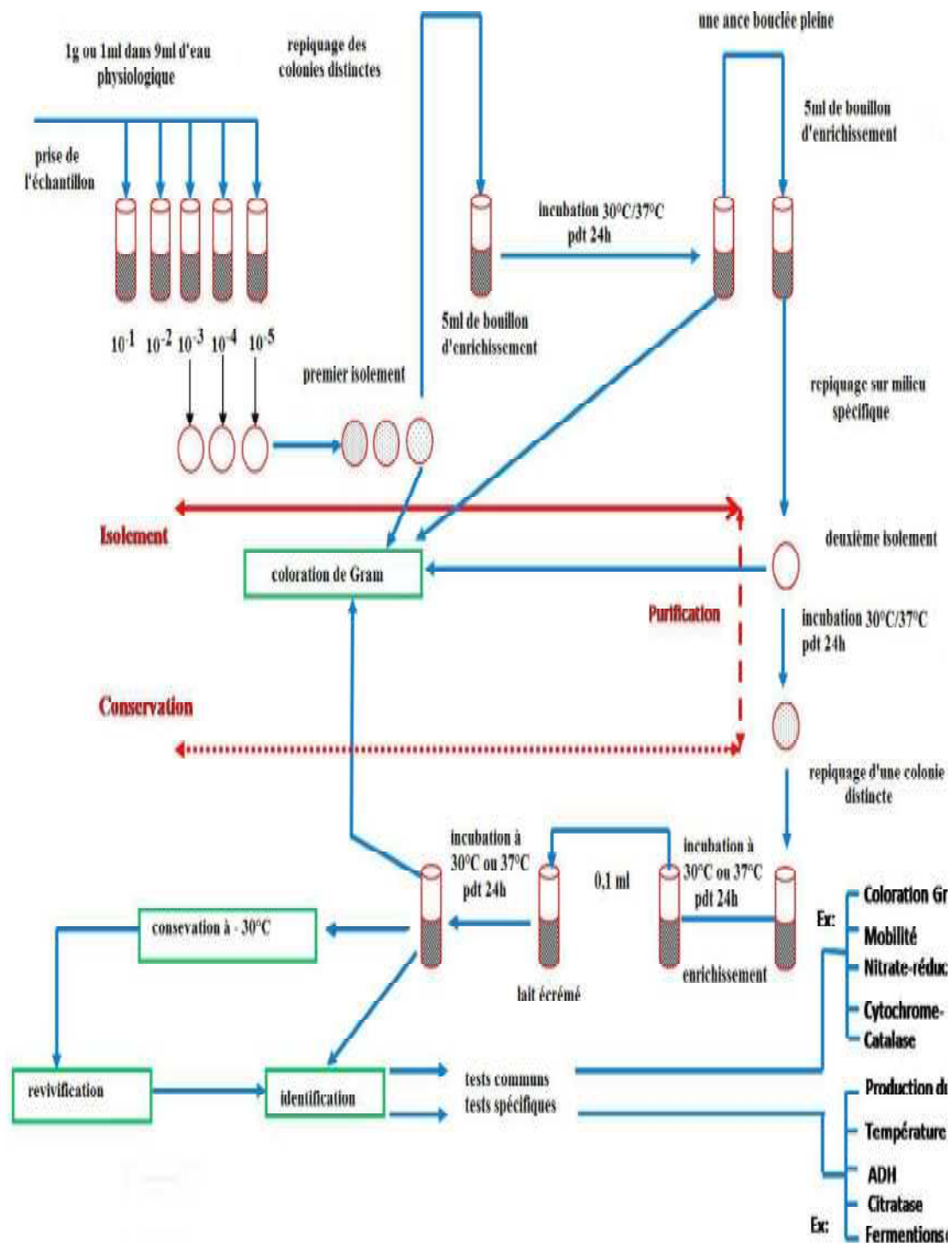


Figure : Protocole d'isolement, de purification et d'identification des souches lactiques

Annexe 4 : les photos



Photo02 : dilution décimale

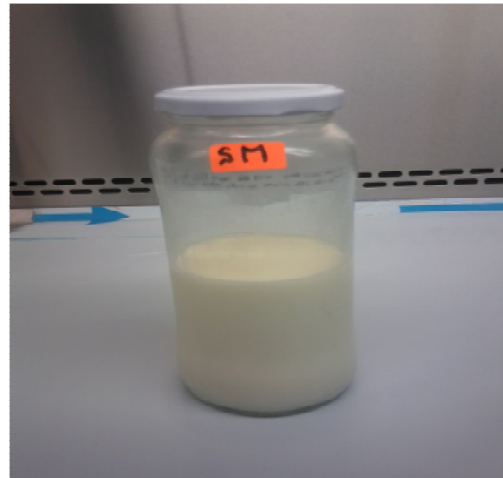


Photo 01 : solution mer



photo03 : Aspect des colonies



photo04 : apparition des zones des inhibitions



Photo 05: L'étuve

L'étude des potentiels antimicrobiens (bactériocines) des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de vache

Résumé

Le lait cru est le lait à la plus forte valeur nutritive .IL est récemment fait l'objet de débats assez intenses. IL Constitue un produit de base dans le modèle de consommation algérienne.

L'analyse de lait cru provenant de la région de Khenchela a permis l'isolement de six souches de bactéries lactiques appartenant aux genres : *Lactococcus* (une souche), et *Lactobacillus* (trois souche). *Enterococcus* (deux souches) sur le milieu MRS agar et milieu M17 agar à la base des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques et le système API 20.

La recherche des bactéries lactiques à effet antimicrobien a montré que sur un total de six souches seulement deux souches (*Lactobacillus acidophilus* ST₂ et *Lactococcus lactis* LCL₅) ont montré une activité antibactérienne, due à la production d'agent inhibiteur, contre Les bactérie pathogènes Gram+ (*Staphylococcus aureus* ATCC25923 et *Bacillus subtilis* ATCC21332) et Gram- (*Klebsiella oxytoca* ATCC25922) par la méthode des disques.

En tenant compte de leur activité contre les bactéries indésirables, certaines des souches isolées dans cette étude pourraient être des candidats potentiels utilisables dans la bioconservation des produits alimentaires.

Mots clés : Lait cru, bactéries lactiques, bactériocines, bactéries pathogènes, activité antibactérienne, bioconservation

The study of potential antimicrobial (bacteriocins) lactic acid bacteria isolated from raw milk

Abstract

Raw milk is with the highest nutritional value .It has recently been quit intense debate. It is a commodity in the model Algerian consumption.

The analysis of raw milk from the region Khenchela allowed the isolation of six strains of lactic acid bacteria belonging to the genera *Lactococcus* (strain) and *Lactobacillus* (three strain). *Enterococcus* (two strains) on the MRS agar agar and M17 at the base of morphological tests, biochemical and physiological system and the API 20

Search lactic acid bacteria to antimicrobial effect showed that a total of six strains only two strains (*Lactobacillus acidophilus* ST2 and *Lactococcus lactis* LCL5) showed antibacterial activity, due to the production of inhibiting agent against Gram pathogenic bacteria + (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* ATCC25923 ATCC21332) and Gram- (*Klebsiella oxytoca* ATCC25922) by the disc method.

Considering their activity against harmful bacteria, some strains isolated in this study could be potential candidates for use in the bioconservation food.

Key Word: raw milk, Lactic acid bacteria, pathogenic bacteria, bactericides,undesirables bacteria. bioconservation

دراسة مضادات الميكروبات المحتملين (bacteriocins) بكتيريا حمض اللبنيك معزولة من الحليب الخام

الملخص

الحليب الخام هو الحليب ذو قيمة غذائية عالية فهو غالبا ما يكون موضوع دراسات مكثفة و يعتبر الحليب الخام من الاغذية الأساسية في النظام الغذائي الجزائري.

تحليل الحليب الخام لمنطقة خنشلة سمح لنا بعزل ستة سلالات من بكتيريا حمض اللاكتيك التي تنتمي الى اجناس لاكتوكوكيس (سلالة واحدة) ولاكتوبسيليس (ثلاثة سلالات) وانتيروكوكيس (سلالتين) على اجار اجار ام 17 وام ر س في قاعدة اختبارات مورفولوجية و نظام بيوكيميائي (ابي 20)

البحث عن بكتيريا حمض اللكتيك التي تؤدي الى تأثير مضاد لميكروبات اظهرت مجموعة من ستة سلالات اثنين فقط من سلالات اظهر النشاط المضاد للبكتيريا ، ويرجع ذلك الى انتاج عامل تثبيط (لاكتوبسيليس اسيدو فيليس لسل 5 ولاكتوكوكيس لكتيس ست 2) ضد البكتيريا + المسببة للامراض (ستا فيلو كوكيس اريس ات س س 21332 وبسيليس سيبتيليس ات س س 252923) و غرام- (كلبسيلا اوكسيوكا ات س 25922 من خلال طريقة القرص بالأخذ بعين الاعتبار نشاطهم ضد البكتيريا الضارة المسجل و نطاق نشاطهم الواسع يمكن لبعض السلالات المعزولة في هذه الدراسة ان تكون من المرشحين المحتملين لاستخدامها في حفظ الطعام

الكلمات المفتاح هي الحليب الخام، منطقة تثبيط ، نشاط ضد بكتيري، بكتيريا ممرضة، بكتيريا اللبنيّة، حفظ الاغذية

Présenté par : MEDDOUR Siham AZIZI Malika	Soutenu le : 31 Mai 2016
<p style="text-align: center;"><i>Diplôme : Master académique en Biologie</i></p> <p style="text-align: center;">OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUE</p>	
<p style="text-align: center;"><u>Thème</u> : L'étude des potentiels antimicrobiens (bactériocines) des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de vache</p>	
<p>Résumé</p> <p>Le lait cru est le lait à la plus forte valeur nutritive .IL est récemment fait l'objet de débats assez intenses. IL Constitue un produit de base dans le modèle de consommation algérienne.</p> <p>L'analyse de lait cru provenant de la région de Khenchela a permis l'isolement de six souches de bactéries lactiques appartenant aux genres : <i>Lactococcus</i> (une souche), et <i>Lactobacillus</i> (trois souche). <i>Enterococcus</i> (deux souches) sur le milieu MRS agar et milieu M17 agar à la base des tests morphologiques, biochimiques et physiologiques et le système API 20.</p> <p>La recherche des bactéries lactiques à effet antimicrobien a montré que sur un total de six souches seulement deux souches (<i>Lactobacillus acidophilus</i> ST₂ et <i>Lactococcus lactis</i> LCL₅) ont montré une activité antibactérienne, due à la production d'agent inhibiteur, contre Les bactérie pathogènes Gram+ (<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 et <i>Bacillus subtilis</i> ATCC21332) et Gram- (<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC25922) par la méthode des disques.</p> <p>En tenant compte de leur activité contre les bactéries indésirables, certaines des souches isolées dans cette étude pourraient être des candidats potentiels utilisables dans la bioconservation des produits alimentaires.</p>	
<p><u>Mots clés</u> : Lait cru, bactéries lactiques, bactériocines, bactéries pathogènes, activité antibactérienne, bioconservation</p>	
<p style="text-align: center;">Jury de soutenance :</p> <p>Président : BENREDJEM Lamia M.A.A Université Abbès_Laghrour khenchela</p> <p>Promoteur : THABET Rachid M.A.A Université Abbès_Laghrour khenchela</p> <p>Examineur : BOUTARFA Soumia M.A.A Université Abbès_Laghrour khenchela</p>	