N° série: ….
N° d'ordre: ….

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérien Démocratique et Populaire

وزارة التعـليـم العالي والـبحـث الـعلـمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifiqu
جامـعة الشهيد حمه لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de biologie Cellulaire et Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

THÈME

Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru

Présenté Par :

DAOUDI Hinda & KHELEF Chérifa

Devant le jury composé de :

Président :	**M. MEDJOUR A.**	**MAA**	**Université d'El Oued**
Examinatrice :	**Mme. MEKHEDEMI N.**	**MAB**	**Université d'El Oued**
Promoteur :	**M. LAICHE A.T.**	**MAA**	**Université d'El Oued**

Année universitaire

2017/2018

Remerciement

Tout d'abord, nous remercions ***le DIEU****, notre créateur tout puissant de nous avoir donné la force, la volonté et le courage de mener ce modeste travail à terme.*

Nous adressant nos respects et reconnaissance à notre encadre ***Mr LAICHE AMMAR TOUHAMI****, pour m'avoir proposé ce sujet si intéressant et nous avoir accepté d'encadrer.*

Nous tenons à remercier vivement, ***Mr MADJOUR Abdelhak****, de nous faire présider le jury de ce mémoire.*

Nous adressons nos sincères remerciements à ***Mme MEKHEDEMI Nour El houda****, pour l'honneur qu'elle nous fait d'examiner ce modeste travail.*

On adresse aussi nos chaleureux remerciements à toute l'équipe du laboratoire de contrôle de la qualité ***FATILAB.*** *La gérante* ***Mme ZOUBIRI Fatia*** *qui grâce à leur disponibilité et à leur bonne humeur Nos ont soutenu en rendant agréables les moments*

Nous adressons une profonde reconnaissance au ***Mr BOUAL Zakaria****, maitre assistante au département de biologie de l'U.K.M.O.,pour nous avoir accueilli au sein du laboratoire de recherche.*

Un grand merci aussi à toute l'équipe de Centre Algérien de Contrôle de Qualité et d'Emballage (CACQE) d'El Oued.

Tous nos enseignants trouveront ici l'expression de notre profond respect. Un grand merci à ***Melle MHALOU Zineb*** *et* ***Mr TLIBA Ali.***

Enfin, tout ceci n'aurait pas été possible sans le soutien de nos famille et de nos amis, bien qu'ils l'ignorent surement. Nous espérons que ces quelques mots répareront cette erreur.

Chérifa et Hinda

Table de matière

Remerciements	
Résumés	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	01
PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre 1 : Les bactéries lactiques	
I-1 Histoire	03
I-2 Définition et caractéristiques	03
I-3 Habitat	04
I-4 Classification	04
I-5 Métabolisme fermentaire	07
I-5.1 Métabolisme des carbohydrates	07
I-5.1.1 La voie homofermentaire	08
I-5.1.2 La voie hétéro fermentaire	08
I-5.2 La protéolyse	08
I-5.3 La lipolyse	09
I-6. Les intérêts des bactéries lactiques	10
I-6.1Industrie alimentaire	10
I-6.2 Thérapeutique	11
I-7 Mécanisme antimicrobien des bactéries lactiques	13
I-7-1 Les acides organiques /effet de PH	13
I-7.2 Le peroxyde d'hydrogène	13
I-7.3 Le dioxyde de carbone	13

I-7.4 Le diacétyle	13
I-7.5 La reutérine	14
I-7-6 Les bactériocines	14
CHAPITRE II : Les bactériocines	
II-1 Définition et nomenclature	16
II-2 Structure et principaux caractères	16
II-3 Classification	17
II-3.1 Classe I	18
II-3.2 Classe II	18
II-3.3 Classe III	18
II-4 Biosynthèse et régulation de production	20
II-4.1 Biosynthèse	20
II-4.2 Immunité	21
II-4.3 Résistance	21
II-5 Mode d'action	22
II-6 Spectre d'activité	24
II-7 Applications des bactériocines	25
II-8 Limite d'utilisation des bactériocines	27
II-9 La différence entre les bactériocines et d'antibiotiques	27
II-10 Principales bactériocine	29
II-10.1 Nisin	29
II-10.2 Enterocins	29
II-10.3 Lacticin 3147	29
II-10.4 Pédiocins	30
PARTIE II : ETUDE EXPERIMANTALE	
CHAPITRE I : Matériels et Méthodes	
I-1 Matériels utilisées	31

I.1.1 Matériels biologiques	31
I-1.1.1 Lait cru	31
I-1.1.2 Souche bactérienne indicatrice (pathogène)	32
I.1.2 Matériels techniques	33
I- 2 Méthodes	35
I-2.1 Analyses physicochimiques du lait	36
I-2.1.1 Préparation de l'échantillon en vue de l'analyse physique et chimique	36
a-Détermination de l'acidité titrable	36
b- Détermination de la matière sèche	36
c- Détermination des cendres	36
d- Détermination de la teneur en matière grasse	37
e- Détermination de la densité	37
I-2.1.2 Analyse statistique	37
I-2.2 Isolement et identification des bactéries lactiques	37
I-2.2.1 Isolement et purification des bactéries lactiques	37
I- 2.2.2 Conservation des isolats	39
a- Conservation à court terme	39
b- Conservation à long terme	39
I-2.2.3 Identification des bactéries lactiques	40
a- Critère morphologique	40
b- Critères physiologique et biochimique	40
I-2.3 Etude de l'aptitude technologique des bactéries lactiques isolées	42
I-2.3.1 Pouvoir acidifiant	42
I-2.3.2 Pouvoir antimicrobiennes	43
a- Préparation des pré cultures des bactéries	43
b- Interactions Bactéries lactiques / Bactéries pathogènes	43
I-2.4 Production et purification de la bactériocine	44
I-2.4.1 Culture de la souche	44
I-2.4.2 Purification de la bactériocine	45
a- Préparation et traitement du surnageant de culture	45

b- Précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse	45
I-2.4.3 Dosage de protéine	45
I-2.5 Activité antibactérienne	47
I-2.5.1 Activité antibactérienne des bactériocines précipitées	47
I-2.5.2 Concentration minimale inhibitrice (CMI)	47
Chapitre II : Résultats et discussion	
II- 1 Analyses physico-chimiques	49
II-2 Isolement et identification des bactéries lactiques	51
II-2.1 Isolement des bactéries lactiques	51
II-2.2 Identification des isolats	51
II-2.2.1 Critères morphologique	51
II-2.2.2 Critères biochimique et physiologique	52
II-3 Etude de l'aptitude technologique des bactéries lactiques isolées	57
II-3.1 La diminution du pH par les bactéries lactiques	57
II-3.2 Activité antagoniste des bactéries lactiques	57
II-4 Effet antagoniste de bactériocine	61
II-4.1 Activité antibactérienne	62
II-4.2 Dosage protéique (bactériocine)	64
II-4.3 Concentration minimale inhibitrice (CMI)	64
Conclusion	66
Références bibliographiques	68
Annexe	79

RESUME

La contamination des aliments est un problème majeur pour le consommateur. L'exploitation des interactions bactériennes est un nouveau moyen pour lutter contre les germes indésirables. L'objectif de ce travail est la recherche des bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes vis-à-vis des germes nuisibles, la purification de les bactériocines produits par ces bactéries et la détermination de leurs spectres d'activités.

Après l'échantillonnage du lait cru de caprin, bovin et de chamelle dans les régions d'El Oued, on était évalué la qualité du lait par des tests physicochimiques. Le résultat montre que les paramètres d'acidité, la matière grasse, la matière sèche et le cendre sont dans la norme algérienne. Sauf, la densité est un peu moins que la norme.

Les méthodes microbiologiques et biochimiques ont été utilisées pour identifier les bactéries présentant une activité antimicrobienne et la purification de la bactériocine produite.

Neuf isolats de bactéries lactiques ont été identifiés . Les espèces dominantes appartenant au genre *Lactocoque* sont: *Lactococcus. lactis subsp.lactis*, *Lactococcus. lactis subsp. Cremoris*, *Lactococcus sp*, au genre Pediocoques sont: *Pediococcus acidilactici*, au genre Streptocoques sont: *Streptococcus. Sp*, *Streptococcus. Thermophilus* et au genre Lactobacilles sont: *Lactobacillus. Amylophilus*. La recherche de la substance antagoniste a été réalisée suivant la méthode de diffusion des puits. Les six souches lactiques ont données des zones d'inhibition à l'égard des les bactéries pathogènes.

Ensuite, une extraction des peptides bioactifs par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium. La bactériocine purifiée a été utilisée pour démontrer leur activité antimicrobienne contre les souches indicatrices. le résultat obtenu montre un effet inhibitrice de bactériocine contre certains agents pathogènes humains. La plus grande inhibition (8mm) à été remarqué pour la bactériocine de la souche *Lac. lactis subsp. Cremoris* contre *Staphylococcus aureus*, Puis on étudie leur activité bactéricide contre *Staphylococcus aureus* par la méthode de concentration minimale inhibitrice (CMI). En conclu que la bactériocine a non seulement l'activité bactéricide, mais aussi la dose dépendante de différentes bactéries.

Mots Clés: lait cru , Bactéries lactiques, Bactériocine, Purification, Spectre d'activité.

ABSTRACT

The food contamination is a major problem for the consumer especially during the summer period in the Mediterranean countries. The bacterial interactions exploitation is a new strategy to fight against these pathogenic microorganisms. Bacteriocins are peptides produced by lactic acid bacteria (BL) and having antibacterial activity. The objective of this study is firstly the search for lactic bacteria producing antimicrobial substances toward harmful germs, and secondly the purification of bacteriocins produced by BL (s) and determination of their spectrum of activity.

After the sampling of the milk from goat, bovine and camel milk in the El Oued regions. , we was assessed his quality by physicochemical tests. The result shows that the acidity parameters, the fat, the dry matter and the ash are in the Algerian norm. Except, the density is a little less than the norm.

The microbiological and biochemical methods were used to identify isolates of lactic acid bacteria which have an antimicrobial activity and purification of the bacteriocin produced.

Nine isolates of lactic acid bacteria were identified The dominant species belonging to the genus Lactococcus are: Lactococcus. lactis subsp. lactis, Lactococcus. lactis subsp. Cremoris, Lactococcus sp, at the genus Pediococci are: Pediococcus acidilactici, at the genus Streptococci are: Streptococcus. Sp, Streptococcus. Thermophilus and the genus Lactobacilli are: Lactobacillus. Amylophilus. The search for the antagonist substance was carried out according to the well diffusion method. Six lactic acid strains gave zones of inhibition with respect to pathogenic bacteria .

Next, an extraction of the bioactive peptides by the method of precipitation with ammonium sulphate .The purified bacteriocin was used to demonstrate their antimicrobial activity against the indicator strains. The result obtained shows a bacteriocin inhibitory effect against certain human pathogens.

The greatest inhibition (8mm) was observed for bacteriocin of the Lac strain. lactis subsp. Cremoris against Staphylococcus aureus، then their bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* is studied by the method of minimal inhibitory concentration (MIC). In conclusion, bacteriocin has not only the bactericidal activity, but also the dependent dose of different bacteria.

KEY WORDS: raw milk, lactic acid bacteria, activity spectrum, bacteriocin, antimicrobial activity.

الملخص

يعد تلوث الطعام مشكلة كبيرة للمستهلك خاصة خلال أشهر الصيف في دول البحر الأبيض المتوسط. تشغيل التفاعلات البكتيرية هي وسيلة جديدة لمكافحة البكتيريا الممرضة. والهدف من هذا العمل أولا البحث عن البكتيريا اللبنية المنتجة لمضادات الميكروبات ضد البكتيريا الممرضة وثانيا تنقية البكتيريوسينات التي تنتجها البكتيريا اللبنية وتحديد أطياف أنشطتها.

بعد أخذ عينات الحليب الطازج من الماعز, البقر و الناقة المجلوب من منطقة الوادي ، تم تقييم جودة الحليب بالتحاليل الفيزيوكيميائية. حيث أظهرت النتائج لمقاييس الحموضة والمادة الدسمة و الجافة والرماد في المعدل للقانون الجزائري. باستثناء الكثافة أقل قليلاً من المعدل.

وكما استخدمنا الطرق الميكروبيولوجية والكيميائية الحيوية لتحديد البكتيريا ذات النشاط المضادة للبكتيريا وتنقية البكتيريوسينات التي تنتجها.

تم عزل تسعة أنواع من البكتيريا اللبنية تنتمي إلى جنس Lactococcus هي: *Lactococcus lactis subsp. lactis*، *Lactococcuslactis subsp. Cremoris,* *Lactococcus sp*، و جنس Pediococcus : *Pediococcus acidilactici*، و جنس Streptocoques : *Streptococcus. sp,* *Streptococcus thermophilus*، و جنس Lactobacilli : *Lactobacillus amylophilus*. بعد البحث عن المادة المضادة وفقا لطريقة الانتشارحيث أعطت النتائج ستة سلالات من البكتيريا اللبنية تثبيط ضد البكتيريا المسببة للأمراض.

وكان استخلاص الببتيدات النشطة بيولوجيا عن طريق الترسيب بكبريتات الأمونيوم. اذ تم استخدام البكتيريوسين المنقى لإظهار نشاطه المضاد للميكروبات ضد سلالات الممرضة ، وتظهر النتائج تاثير البكتيريوسين ضد بعض مسببات الأمراض البشرية. ولوحظ أكبر تثبيط (8مم) للبكتيريوسين من سلالة *Lac. lactis subsp. Cremoris* ضد *Staphylococcus aureus*، كما تم دراسة نشاطهم التثبيطي ضد *Staphylococcus aureus* بواسطة طريقة الحد الأدنى من تركيز المثبط (MIC).

ومنه ، يمكن القول ان للبكتريوسين نشاط مثبط وقاتل للجراثيم ، لكن ذلك يعتمد على جرعته الفعالة التي تختلف من بكتيريا لاخرى.

الكلمات المفتاحية: الحليب الطازج، البكتريا اللبنية، طيف النشاط، مضاد جرثومي، نشاط مضادات الميكروبات

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Bactéries lactique sous microscope électronique	03
02	Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre «*Lactobacillales*» dans la classe des «*bacilli*»	06
03	Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques	07
04	Système protéolytique des bactéries lactiques	09
05	Principales voies de la lipolyse	10
06	Vue schématique d'un possible système de production d'une bactériocine: système de régulation à trois composants ,synthèse ,maturation et immunité	22
07	Mode d'action des bactériocine	24
08	Aperçu du potentiel d'application de la production de bactériocine par LAB	26
09	Prélèvement des échantillons de lait (photo p., 2018).	32
10	Procédure expérimentale.	35
11	Protocole d'isolement des souches lactiques.	38
12	Méthode utilisée pour la recherche de substances antimicrobienne.	44
13	Protocole de précipitation au sulfate d'ammonium.	46
14	Protocole de recherche de concentration minimale inhibitrice (CMI)	48
15	Aspect macroscopique des souches lactiques	53
16	Aspect microscopique des colonies (Gx100); A : Cocci ; B : Bacille	53
17	Inhibitions obtenues contre *A*: *Listeria innocua clip, B* : *Pseudomonas aeruginosa , C*: *Klebseilla pneumoniae, D*: *Escherichia coli , E* : *Salmonella sp, F*: *Bacillus cereus, G: Staphylococcus aureus*	58
18	Effet de bactériocine productrice par les bactéries lactiques contre les souche pathogène	61
19	Densité optique de *Staphylococcus Aureus* après traitement par les bactériocines produites par les bactéries lactiques	64

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Familles et principaux genres des bactéries lactiques	05
02	Effets positifs des probiotiques sur la santé humain	12
03	Classification de bactériocine produit par LAB	19
04	Classification des bactériocines	28
05	Caractéristiques des races dont on a prélevé le lait	32
06	Souches cibles utilisées et leur origine	33
07	Liste des appareilles utilisées	33
08	Liste des produits	34
09	Milieux utilisés et conditions d'incubation pour l'isolement des bactéries lactiques	39
10	Résultats des analyses physico-chimiques de lait cru.	49
11	Caractères morphologiques des genres présumés des bactéries lactiques isolées	52
12	Critères biochimique et physiologique des bactéries lactiques isolées de lait cru.	54
13	Diminution de PH de milieu par les bactéries lactiques.	57
14	Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques	59
15	Présentation de la concentration de bactériocine	64

Liste des abréviations

API : Analytical Profile Index

ATCC : American Type Culture Collection

DO : Densité Optique

Ech. : Échantillon

^{x}g : gravité de la terre

g : gramme

G+C : le ratio guanine + cytosine

h : heure

JOA: Journal official algérienne

KDa : Kilodalton

LAB : Acid Lactic Bactéria

M17 : Milieu de Terzaghi et Sandine

M17 BCPL : Milieu M17 additionnée de pourpre de Bromocrésol lactosé

MH : Miller Hinton

MRS BCPL : Milieu MRS additionnée de pourpre de Bromocrésol lactosé

MRS : Milieu de Man, Rogosa et Sharpe

N : normalité

NF : Norme française

nm : nano mètre

pH : Potentiel d'Hydrogène

Photo P : Photo personnel

Sp : Espece

T : Température

tr : tour

VP : Voges-Proskaeur

Zi : Zone d'inhibition

λ : Longueur d'onde

Introduction

Introduction

Le lait occupe une place stratégique dans l'alimentation quotidienne de l'homme, de par ses composants noble et sa richesse en vitamines et en minéraux, notamment en calcium alimentaire **(RAHLI, 2015)**.

Le lait cru de part sa richesse en substances nutritives (protéines, graisses, glucides, vitamines…etc.), constitue un milieu favorable pour le développement des germes. Lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions, le lait cru contient peu de germes (103 germes par ml). Il s'agit de germes saprophytes et parmi eux, on trouve les Lactobacillus, *Streptococcus* et *Leuconostoc* **(MENAD, 2017)**.

Il possède aussi un effet antimicrobien contre les bactéries pathogènes, parmi elle on trouve *Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Staphylococcus aureus et Salmonella typhimurium*. Cette activité antimicrobienne est attribuée à la présence les bactéries lactiques qui produit des substances antimicrobienne telles que le bactériocine.

La microflore microbienne du lait cru, composée essentiellement de bactéries lactiques, participe de façon importante à l'élaboration des caractéristiques organoleptiques des produits laitiers fermentés (lait fermenté, fromage)**(BOULLOUF, 2016)**. Sur le plan hygiénique, elles freinent le développement de la flore indésirable et améliorent la conservation de l'aliment, par l'abaissement du pH et la production de plusieurs métabolites ayant un effet anti microbien **(HAMMI, 2016)**.

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupes des bactéries bénéfiques, dans les vertus se ressemblent, et qui produisent de l'acide lactique comme produit final du processus de fermentation. Elles sont répandues dans la nature, et se trouvent aussi dans le système digestif de l'homme **(MAMECHE, 2008).**

Ces microorganismes sont des bactéries non pathogènes et comptées pour la majorité parmi les microorganismes « GRAS » (« Generally Recognized As Safe ») par la « Food and Drug Administration » (FDA). Néanmoins, certaines espèces de *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes **(LEONARD, 2013).**

Il est aujourd'hui possible de sélectionner, identifier et cultiver ces germes pour toute sorte d'usages : alimentaires (starters de fermentation), médicaux (probiotiques) ou

biotechnologiques (production de molécules : bactériocines, polysaccharides) **(MATAMOROS, 2008)**.

La bio-conservation par les bactéries lactiques est due à leurs capacités à produire plusieurs métabolites antimicrobiens, tels que les acides organiques (acide lactique, acide acétique....), le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, le diacétyle, la reutérine, le dioxyde de carbone et les bactériocines **(HAMMI, 2016)**. 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 **(ABABSA, 2012)**. Ces dernières, font depuis quelques décennies, l'objet d'innombrables études notamment dans l'objectif d'applications alimentaires.

La bactériocine de bactéries lactiques est de polypeptide antibactérien synthétisé dans le processus de métabolisme, il a un effet antibactérien sur les bactéries pathogènes **(NARENDRAKUMAR *et al*., 2017)**.

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 **(ABABSA, 2012)**

Dans ce contexte, les objectifs assignés de notre travail consistent à réaliser:

- ✓ Des analyses physico-chimiques du lait de caprin, bovin et camelin
- ✓ L'isolement, la purification et la caractérisation phénotypique des bactéries lactiques à partir d'un lait cru.
- ✓ La mise en évidence de l'activité inhibitrice, des bactéries lactiques isolées à l'égard de certains germes d'altération, qui posent des problèmes majeurs dans l'industrie agro-alimentaire et la santé humaine.
- ✓ La purification des bactériocines et la détermination de leurs spectre d'activité vis-à-vis ces bactéries pathogènes.

Première partie

Synthèse bibliographique

I-Les bactéries lactiques

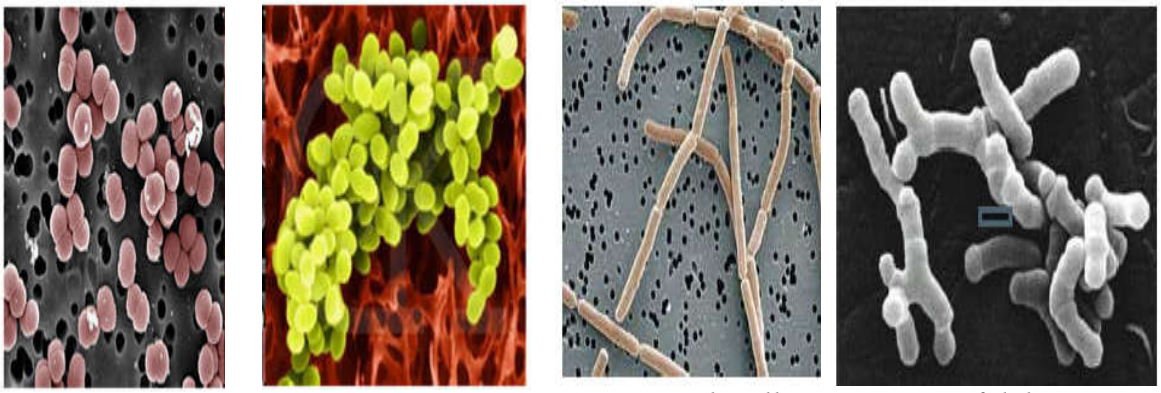
I-1 Histoire

Bien avant que l'on soit conscient de leur existence, les bactéries lactiques, ont toujours été utilisées comme ferment **(BOUMEDIENE, 2013).**Depuis, plus de 4000 ans, elles sont utilisées pour fabriquer bon nombre des produits fermentés et notamment des produits laitiers (fromages, yaourts....) **(DJADOUNI, 2013).**

Au début du XXème siècle, Elie Metchnikoff remarque que la longévité et la bonne santé des paysans bulgares est liée à leur consommation de produits laitiers fermentés et suggère que certains micro-organismes pourraient exercer des effets bénéfiques sur la santé humaine **(SAMOT, 2012).**

I-2 Définition et caractéristiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont définies comme des organismes vivantes, procaryotes hétérotrophe et chimio-organotrophes **(BELARBI, 2011)**, hétérogènes, à gram-positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%, immobiles, non sporulées, aéro-anaérobies. En présence d'oxygène, elles sont incapables de phosphorylation oxydatives car elles ne peuvent synthétiser les cytochromes et les enzymes à noyau hème **(BEKHOUCHE, 2006)**, de catalase négatif, avec des rares souches possèdent des activités pseudo-catalasiques, aéro-tolérantes, tolérantes à acidité, d'une forme qui varie des coques aux bacilles et leur produit majeur du métabolisme est l'acide lactique **(BENMOUNA, 2012)**.



A : *Pediococcus* **B :***Lactococcus lactis subsp. Lactis* **C** : *Lactobacillus acidophilus* **D :** *Bifidobacterium bifidum*

Figure 01 : Bactéries lactique sous microscope électronique (MAGHNIA, 2011)

Les bactéries lactiques synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. On distingue en deux groupes biochimiques : les homofermentaires et les hétérofermentaires ; le glucose est converti principalement en acide lactique (homofermentaires), ou en acide lactique, en CO_2, en éthanol et/ou en acide acétique (hétérofermentaires) **(CORRIEU & LUQUET, 2008)**.

Elles sont mésophiles mais elles sont capables de croître dans un intervalle de températures allant de 5°C à45°C. Le pH optimal de croissance varie de 5,0 à 9,0 mais elles tolèrent les milieux acides (pH 3,2) et alcalins (pH 9,6). Les bactéries lactiques ont des besoins complexes en facteurs de croissance tels que la vitamine B, des acides aminés, des bases azotées, des peptides. Il est donc difficile d'obtenir de bons milieux sélectifs car les milieux de croissance ont besoin d'être « riches ». L'abaissement du pH sera généralement utilisé comme moyen de sélection **(LEONARD, 2013)**.

I-3 Habitat

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires qui sont fréquemment retrouvés dans certains aliments tels que le lait et ses dérivés, la viande, les fruits et les légumes. Elles représentent aussi une partie de la microflore intestinale et génitale humaine et animale **(LEONARD, 2013)**.

Les bactéries lactiques sont 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 **(MAKHLOUFI, 2011)**.

I-4 Classification

Décrite la première fois par Or la-Jensen du début du XXe siècle, les bactéries lactiques (LAB) constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vu taxonomique **(CHENTOUF, 2015)**.

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques : la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone.

Cependant, les études basées sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S ont montré que certains taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne concordent pas avec les relations phylogénétiques suggérées **(BOUMEDIENE, 2013)**.

Ce groupe compte plusieurs genres qui appartiennent tous auphylum *Firmicutes*, à la classe *Bacilli*et à l'ordre des Lactobacillales. Par contre, il est représenté par différentes familles (Tableau 01).

Tableau 01: Familles et principaux genres des bactéries lactiques (LEONARD, 2013).

Familles	**Principaux genres**
Lactobacillaceae	*Lactobacillus sp., Pediococcussp*
Leuconostocaceae	*Leuconostocsp.,Oenococcussp., Weissellasp*
Streptococcaceae	*Streptococcus sp., Lactococcussp*
Carnobacteriaceae	*Carnobacteriumsp*
Enterococcaceae	*Enterococcussp., Tetragenococcussp., Vagococcussp*
Aerococcaceae	*Aerococcussp*

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* sont parfois considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de leurs propriétés physiologiques et biochimiques et à leur présence dans le même habitat écologique. Cependant, ces microorganismes appartiennent au phylum *Actinobacteria* et sont donc phylogénétiquement éloignées des bactéries lactiques. Les bactéries lactiques forment donc un groupe hétérogène en raison non seulement de leur métabolisme mais aussi de leur aspect, leur habitat **(LEONARD, 2013)**.

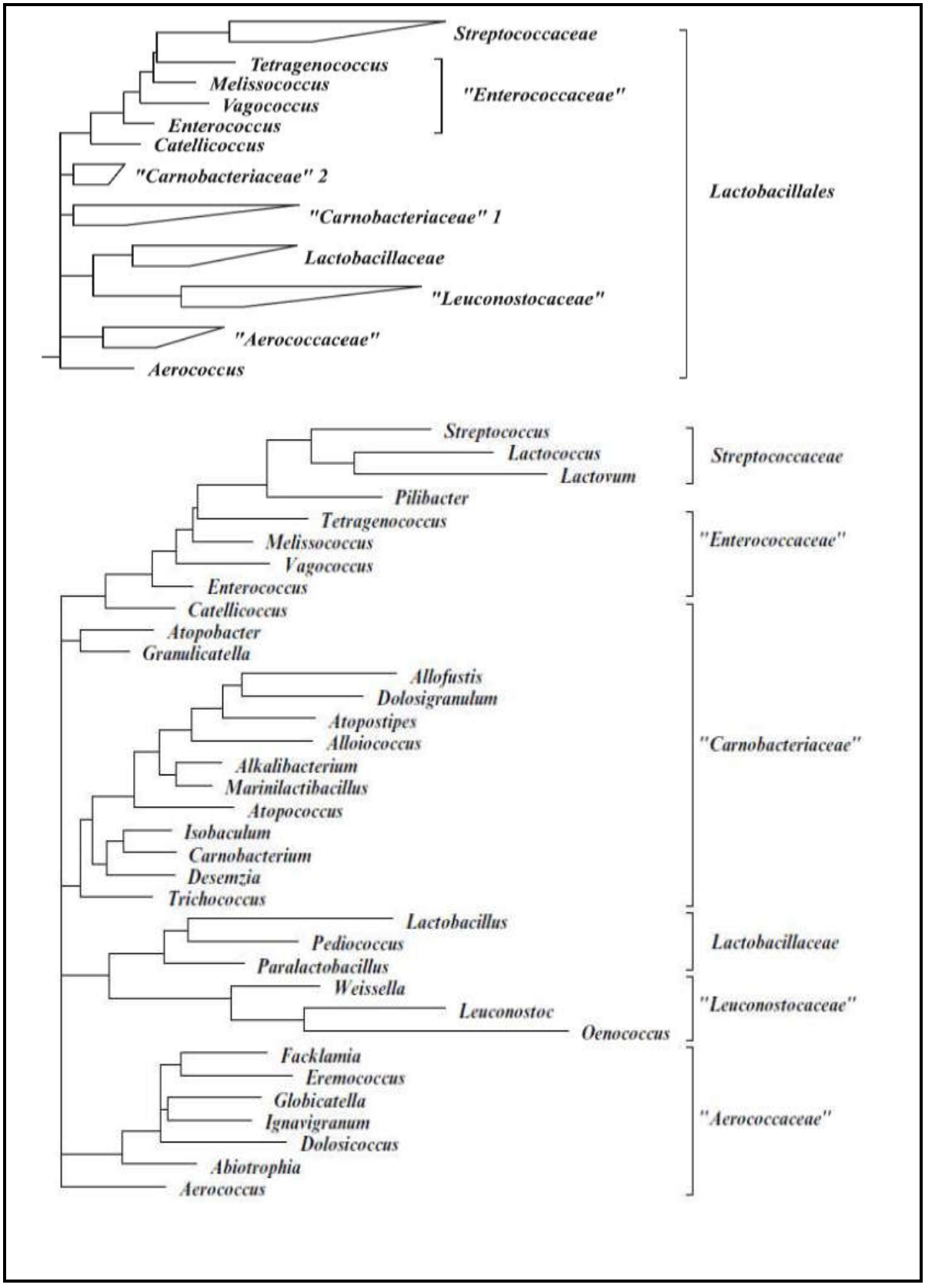


Figure 02 : Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques de l'ordre «*Lactobacillales*» dans la classe des «*bacilli*» (ABABSA, 2012)

I-5 Métabolisme fermentaire

I-5.1 métabolisme des carbohydrates

Le lactose est le sucre majoritaire fermentescible du lait. Le lactose est transporté par un système perméase, après sa pénétration dans la cellule, il sera coupé par une β-galactosidase pour donner du glucose et du galactose. Le principal produit final de la dégradation du lactose est le lactate auquel peut s'ajouter l'acétate, l'éthanol et le gaz carbonique pour les espèces hètèrofermentaires. Les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres **(ABABSA, 2012)**.

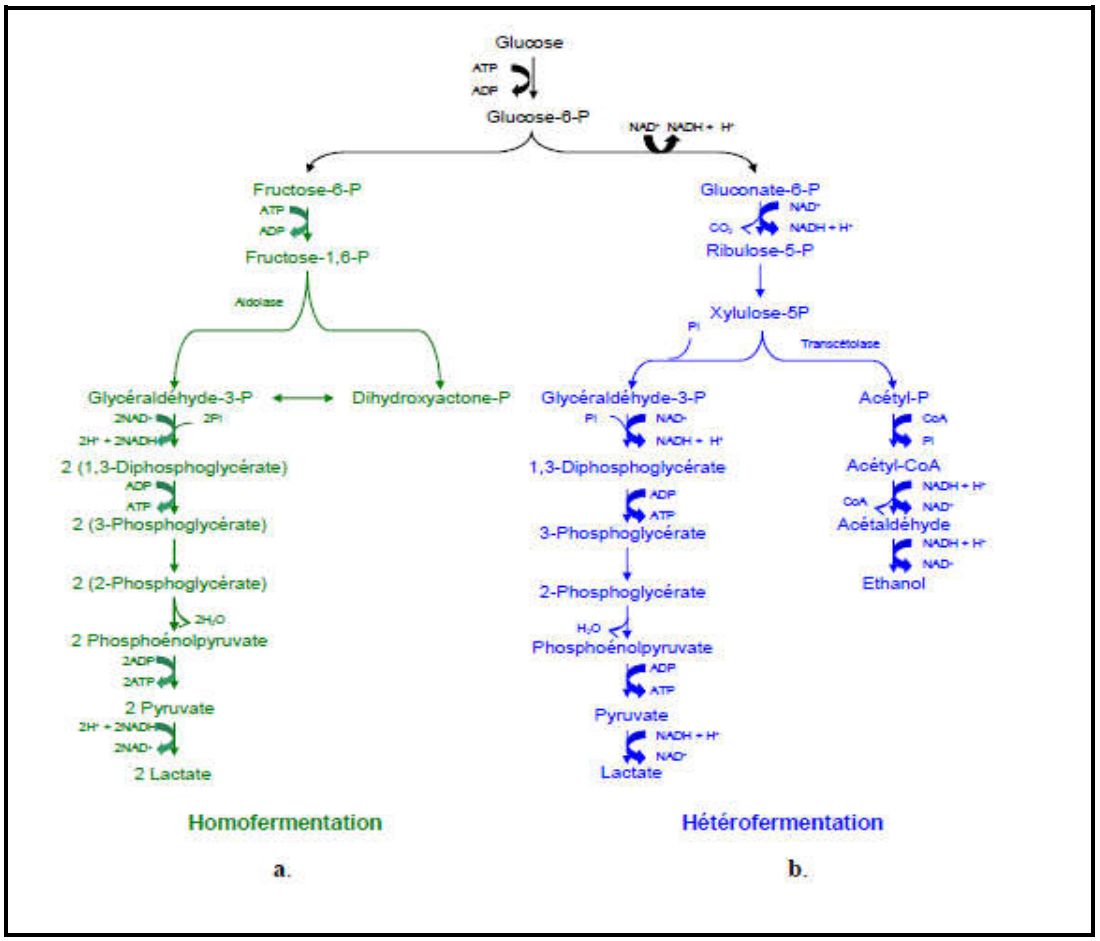


Figure 03 : Représentation schématique des principales voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (MAKHLOUFI, 2011)

ATP : adénosine triphosphate. ***ADP :*** adénosine diphosphate. ***Pi :*** phosphate inorganique.

NAD+/ NADH, H+ : Couple oxydant/réducteur du nicotinamide adénine dinucléotide.

I-5.1.1 La voie homofermentaire

Les groupes principaux de bactéries lactiques appartenant à cette classe des espèces de s*treptocoques*, d'*entérocoques*, de *lactocoques*, de *pédiocoques*, et de *lactobacilles* homofermentaires. Ils convertissent presque quantitativement le glucose en acide lactique (90 à 95 %) [voie d'Embden- Meyerhof- parnas (EMP)] **(MAKHLOUFI, 2011 ; ABABSA, 2012)**.

I-5.1.2 La voie hétéro fermentaire

Les groupes principaux de bactéries lactiques appartenant à cette classe sont les *Leuconostocs* et certains *Lactobacille*. Ces espèces fermentent le glucose en produisant moins de 1,8 mole d'acide lactique/mole de glucose, en plus de l'éthanol, de l'acétate,et du CO2 [voie pentose-phosphocétolase **(ABABSA, 2012)**.

Le métabolisme des bactéries du genre Bifidobacterium a une voie particulière appelée voie fermentaire bifide Ou voie de la fructose-6- phosphocétolase(FPC)**(BRAHIMI, 2015)**.

I-5.2 La protéolyse

L'incapacité des bactéries lactiques à synthétiser les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique nécessite un fonctionnement actif de leur système protéolytique dans les environnements où les protéines constituent la principale source d'azote. Le système protéolytique est composé de protéases associées à la paroi cellulaire ,qui catalyse l'hydrolyse de protéines **(MAGHNIA, 2011)**.

Certaines souches de *L. lactis*subsp. *Lactis* sont capables de synthétiser la plupart des acides aminés dont elles ont besoin **(LEONARD, 2013)**.

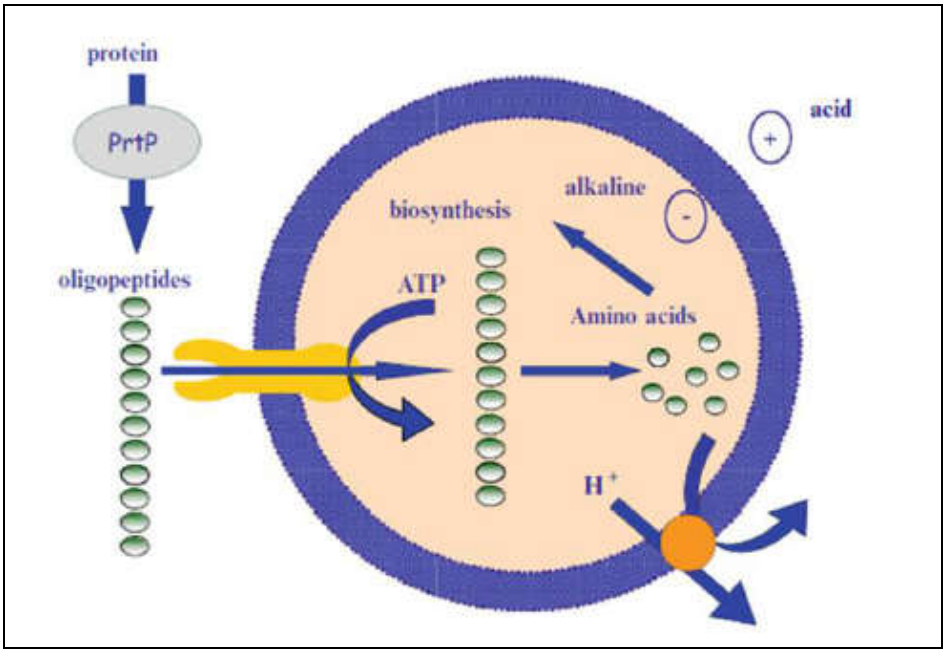


Figure 04: Système protéolytique des bactéries lactiques (BOULLOUF, 2016)

I-5.3 La lipolyse

Les lipases bactériennes catalysent en partie la production des acides gras a longues chaines à partir des mono et di glycérides, alors que les estérases permettent la libération des acides gras volatils. Les acides gras, dont la concentration augmente pendant l'affinage, seraient responsables en partie de la flaveur typique des fromages a pâte pressée cuite. Ils sont également des précurseurs pour la formation de metylcetones, alcools, lactones et esters **(BOULLOUF, 2016)**.

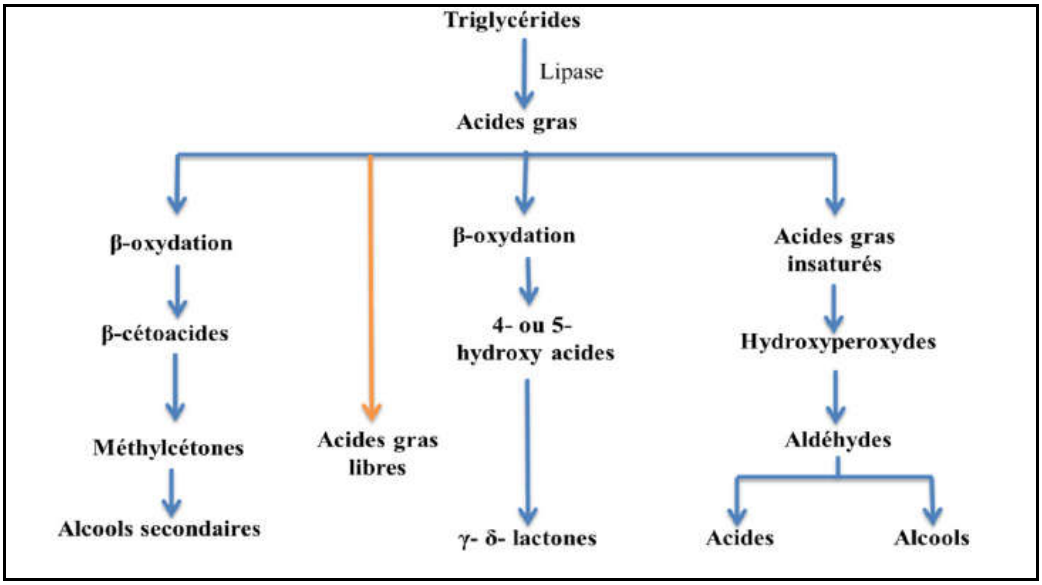


Figure 05: Principales voies de la lipolyse (BOULLOUF, 2016)

I-6. Intérêts des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs technologies pour répondre aux besoins de l'industrie alimentaire, cosmétique, et pharmaceutique **(BOUZAID *et al*., 2016)**.

Dans la Food and Drug Administration (FDA), il existe quatre catégories réglementaires informées par l'utilisation prévue du produit et chacune d'entre elles a des exigences différentes. Ces catégories sont les médicaments ou les produits biologiques; Compléments alimentaires; Nourriture ou ingrédient alimentaire; et la nourriture médicale **(MDUDUZI, 2017)**.

I-6.1 Industrie alimentaire

Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à certains critères : absence de pathogènicité 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 **(ABABSA, 2012)**.

Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et augmenter la durée de conservation **(DJADOUNI, 2013)**.

- L'industrie laitière a pris un essor considérable par la sélection des souches de bactéries lactiques basée sur la capacité de production d'acide lactique, de composés aromatiques, de bactériocines, de production de CO_2 et de résistance aux phages **(LEKSIR, 2012)**.

- Les bactéries lactiques sont la base de la fabrication des différents produits alimentaires tels que les produits laitiers (yaourt, fromage, …), les produits carnés, et les produits végétaux, aussi elles procurent une meilleure conservation pour ces denrées alimentaire. Ainsi elles sont dotées de plusieurs pouvoirs **(BOUMEDIENE, 2013)**.
- L'effet conservateur des LAB est souvent dû à la capacité à produire des composés inhibiteurs, y compris le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, les acides organiques (acide lactique et acétique), le dioxyde de carbone, les bactériocines ou les substances analogues aux antibiotiques **(NGOZI, 2017)**.

I-6.2 Thérapeutique

L'action des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques **(BOUMEDIENE, 2013)**. En 2001 un comité d'experts de l'Organisation des Nations pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'organisation Mondiale de la Santé (OMS) définissait les probiotique comme des micro- organismes vivants qui lorsqu'il sont consommés en quantité suffisante dans l'alimentation ,ont un effet bénéfique sur la santé de la hôte **(SHEHATA *et al*., 2016)**.

Dans des études récentes, les bactéries lactiques ont démontré leur potentiel à promouvoir la santé cutanée et à exercer une réponse immunitaire cellulaire nécessaire à la défense cutanée **(YAN YAN & MIN TZE, 2014)**. Ensuite les utiliser dans un procédé semi industriel pour obtenir d'autres produits fermentés avec une meilleure qualité hygiénique et à caractère thérapeutique très poussé, surtout que ces dernières années; des recherches se sont accentuées pour trouver des voies de thérapies à base des probiotiques pour le traitement de diverses maladies chroniques **(LAIRINI *et al*., 2014)**.

On peut résumer les effets positifs des probiotiques sur la santé humain dans le Tableau 02.

Tableau 02 : Effets positifs des probiotiques sur la santé humain

(ESTHER IZQUIRDO, 2009)

Effets des probiotiques	Mécanismes d'activité proposés
Amélioration de la digestion du lactose	-Action de la β-galactosidase bactérienne dans l'intestin grêle
Diminution des allergies alimentaires	-Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité intestinale -Stimulation du système immunitaire
Réduction du risque des diarrhées	-Résistance à la colonisation par des pathogène -Stimulation du système immunitaire
Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin	-Modulation de la flore intestinale -Stimulation du système immunitaire
Réduction du cholestérol	-Assimilation du cholestérol -Déconjugaison des sels biliaires
Prévention du cancer du côlon	-Stimulation du système immunitaire -Production de composés antimutagénique -Modulation des enzymes fécales carcinogéniques -Dégradation la carcinogènes -Elimination des bactéries impliquées dans la production de cancérogènes

I-7 Mécanisme antimicrobien des bactéries lactiques

Les propriétés anti microbiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques **(CHENTOUF, 2015)**. Elles synthétisent des molécules à actions bactéricides et ou bactériostatiques **(BOUZAID *et al*., 2016)**.

I-7-1 Les acides organiques /effet de Ph

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides Organiques, qui sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Grâce à cette production des acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe **(DORTI, 2008)**.

I-7.2 Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires **(DORTI, 2008)**.

I-7.3 Le dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est produit principalement par les BAL hétérofermentaires. Le mécanismes précis de ses propriétés antimicrobiennes est encore inconnu. Cependant, le CO_2 peut jouer un rôle en créant un environnement anaérobie qui inhibe la décarboxylation enzymatique, et l'accumulation de CO_2 dans la bicouche lipidique de la membrane peuvent provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité **(BELLIL, 2013)**.

I-7.4 Le diacétyle

Le diacétyle ($C_4H_6O_2$) est un produit du métabolisme de citrate qui est responsable de l'arôme "beurre" de produits laitiers. Le diacétyle inhibe la croissance bactérienne en interférant probablement avec les mécanismes gouvernant l'utilisation de l'arginine. Il est rarement présent dans l'aliment en quantité suffisante pour y exercer une activité antimicrobienne importante **(HANSAL, 2015)**.

I-7.5 La reutérine

La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldehyde HPA) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobique du glycérol par certaines espèces de Lactobacillus ainsi que par d'autres genres bactériens non lactiques **(DORTI, 2008)**.

Leur mode d'action n'est pas complètement compris. Deux principales hypothèses ont été proposées : La première serait que la reutérine pourrait inactiver les protéines et autres petites molécules présentant ces fonctions. Une deuxième hypothèse serait que le composé dimérique de HPA pourrait interférer avec la ribonucléotide réductase (enzyme universelle impliquée dans la synthèse d'ADN), ceci conduisant à la mort cellulaire **(SAMOT, 2012)**.

La reutérine a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les procaryotes (Gram-positif ou Gram-négatif), les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires **(DORTI, 2008)**.

I-7-6 Les bactériocines

Les bactériocines sont des composés protéi niques produits par diverses bactéries Gram positives et Gram négatives **(SIDHU & NEHRA, 2017)** avec un mode d'action bactéricide ou bactériostatique contre des espèces étroitement apparentées **(JAYA CHITRA & SIVA KUMAR, 2018)**. Ils sont produits et secrétés à l'extérieure de la cellule productrice. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelquefois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices **(BOUZAID *et al*., 2016)**.

Les bactériocines sont synthétisés par voie ribosomique par des procaryotes, avec une longueur inférieure à 10 acides aminés ou jusqu'à 688 résidus, qui inhibent ou tuent les micro-organismes phylogénétiquement apparentés et/ou non apparentés qui partagent la même niche microbienne **(PACHECO-CANOA *et al*., 2014)**. Codé par des gènes qui peuvent être codés par des chromosomes ou des plasmides **(BHARTI *et al*., 2015).**

La formation de bactériocines est une caractéristique des organismes héréditaires, consistant en ce que toutes les souches ont la capacité de synthétiser une ou plusieurs substances bactériocinogènes strictement définies et spécifiques **(ALEXANDER *et al*., 2017)**. Selon COTTER *et al*. (2005), entre 30 et 99% des procaryotes (Bactéries et Archaea) produisent au moins une bactériocine **(BARBOSA et al., 2015)**, par exemple, la production

de deux bactériocines synergiques a été rapportée pour plusieurs espèces d'*Enterococcus :*les entérocines L50A et L50B, les entérocines 1071A et 1071B **(BATDORJ *et al*., 2005)** et certaines souches de *Lactobacillus B plantarum* sont capables de produire plus d'un peptide avec un effet antibactérien synergique **(BARBOSA *et al*., 2015)**.

Cette capacité antimicrobienne fournit à la bactérie hôte non seulement un avantage compétitif, mais plus significativement, la possibilité d'une communication spécifique à l'espèce grâce à la détection du quorum conduisant à la mise en place d'un microbiote potentiellement stable **(PACHECO-CANOA *et al*., 2014)**.

II- Les bactériocines

II-1 Définition et nomenclature

Le premier bactériocines a été reportés en 1925 par Gratia, qui a observé l'inhibition d' *Escherichia coli* φpar *E. coli* V**(RILEY & CHAVAN, 2007)**. La colicine est la première bactériocine produite à partir d'Escherichia coli V et présente une activité inhibitrice contre E. coli S **(BHARTI *et al*., 2015)**.

la bactériocine a été définie comme ayant un spectre bactéricide étroit avec une biosynthèse létale, une activité intra-spécifique, et une fixation à des récepteurs cellulaires spécifiques..**(LUNDSTRÖM, 2012)**.

Parmi les bactéries productrices de bactériocine, les principaux producteurs sont les bactéries lactiques Gram-positives (LAB) **(KHOCHAMIT *et al*., 2014)**.

Plusieurs types de bactériocines provenant de LAB ont été identifiés et caractérisés, dont les plus importants sont Nisin, Diplococcin, Acidophilin, Bulgarican, Helveticins, Lactacins et Plantaricins **(JAYA CHITRA & SIVA KUMAR, 2018)**.

La nomenclature des bactériocines en général est une notion surjective car elle est basée sur l'ajout du suffixe "cin" pour le genre ou l'espèce, nom pour désigner l'activité bactériocinogènes **(DJADOUNI, 2013)**.

La nomenclature des bactériocines est basée sur le générique du genre ou de l'espèce productrice .Par exemple *Escherichia coli* produit une bactériocine nommée colicine. L'espèce *Pediococcus* produit une bactériocine nommée pediocine **(MAMECHE, 2008)**.

II-2 Structure et principaux caractères

Tagg, Jadani et Wannamaker (1976) ont appelé bactériocines les substances qui sont produites par la bactérie Gram-positive et ont les propriétés suivantes:

leur molécule est constituée de peptides ayant une activité antimicrobienne,ils ont un faible poids moléculairequi varient entre les différentes bactériocines comme leur spectre antimicrobienet le mode d'action, et en général sont actifs contre les espèces étroitement liées à la souche productrice **(TOLDRÁ, 2009)**.

Ces peptides ou protéines antibactériens codés ribosomiquement ont une taille varie de peptides à de grands complexes multiprotéiques **(GHEQUIRE *et al*., 2018)**. Les bactériocines peuvent être soit de composition simple constituée uniquement de protéines telles que la nisine et la machines 481, soit de composition complexe par la présence de lipides de carbohydrate additionnés à la protéines telle que la l'actine 27 **(MAMECHE, 2008)**. Sa structure générale, molécules amphipathiques avec une charge nette positive. Cela favorise leur interaction avec les membranes plasmiques **(MARTINEZ *et al*., 2016)**.

Les bactériocines peuvent posséder une puissance très élevée (aux concentrations pico-nanomolaires) et une spécificité **(SHARON EDITH *et al*., 2017)**. BacSp222 est un bactériocine qui tue les bactéries Gram-positives à des concentrations inhibitrices minimales allant de 0,1 à plusieurs micromoles/L **(NOWAKOWSKI *et al*., 2018)**.

Les bactériocines LAB sont intrinsèquement tolérantes aux fortes contraintes thermiques et sont connues pour leur activité sur une large gamme de pH. Ces peptides antimicrobiens sont également incolores, inodores et insipides, ce qui augmente encore leur utilité potentielle (PEREZ *et al*., 2014). Les bactériocines de faible poids moléculaire sont très thermostables, à l'opposé de celles qui sont à poids moléculaire élevé qui sont très sensibles aux traitements thermiques **(MAMECHE, 2008)** et sont généralement stables dans les milieux acides et neutres, par contre elles perdent leur stabilité en milieu basique. Leur activité peut être affectée par la présence de surfactants chimiques, tels que l'EDTA, et présenter un effet de synergie lorsqu'elle est appliquée avec certains antibiotiques **(TODOROV *et al*., 2018)**. Sont sensibles aux enzymes protéolytiques **(SENBAGAM *et al*., 2013)**.

II-3 Classification

Les bactériocines de LAB ont été classées par KLAENHAMMER (1993) en quatre classes sur la base de caractéristiques communes, principalement structurale **(BATDORJ *et al*., 2005)**. Depuis le premier système de classification des bactériocines LAB par KLAENHAMMER (1993), de nombreux schémas modifiés ont été proposés **(WAN, 2017)**.

La classification la plus récente des bactériocines produites par LAB a été proposée par ALVAREZ-SIEIRO *et al*. comme suit:

II-3.1 Classe I

les bactériocines sont des lantibiotiques, c'est-à-dire de petits peptides cationiques, hydrophobes et thermostables qui contiennent des acides aminés inhabituels (thioéther aminoacides lanthionine et / ou méthyl lanthionine) qui sont formés post-traductionnellement **(ELAYARAJA *et al*., 2004)**.

Protéines de poids moléculaire inférieur à 10 kDa avec modifications post-traductionnelles. Cette classe comprend les protéines susceptibles de subir certaines modifications par leur biosynthèse, en raison de la présence d'une séquence de peptides signaux cela permettra la reconnaissance, le transport et le maintien du peptide inactif **(GONZALEZ-PEREZ *et al*., 2018)**.

II-3.2 Classe II

La bactériocine sont des petits peptides cationiques, hydrophobes et thermostables **(ELAYARAJA *et al*., 2014)**. Protéines de poids moléculaire inférieur à 10 kDa sans modifications post-traductionnelles. Cette classe est constituée de protéines qui n'ont pas de modifications inhabituelles et ne nécessitent aucun effecteur pour le transport. Semblables à la classe I **(GONZALEZ-PEREZ *et al*., 2018)**.

II-3.3 Classe III

Protéines de poids moléculaire supérieur à 10 kDa sans modifications post-traductionnelles. Ceux-ci peuvent exercer un mécanisme d'action lytique et non-lytique. Contrairement aux bactériocines de classe I et II, celles de classe III sont thermolabiles **(GONZALEZ-PEREZ *et al*., 2018)**.

Tableau 03: Classification de bactériocine produit par LAB (BHARTI *et al*., 2015)

Classe	**Sous classe**	**Caractères**	**Exemple**	**PM (Da)**	**Souche productrice**
Classe I		Peptides linéaires ou globulaires post-traductionnellement modifiés contenant de la lanthionine, de la β-méthyl , lanthionine et des acides aminés déshydratés.	Nisin A Nisin U Nisin Z	3352 3029 3029	*Lactococcus lactis subsp. Lactic* *Streptococcus uberis* *Lactococcus lactis subsp. Lactic*
Classe II	Classe IIa	Stable à la chaleur, non modifié Bactériocines ne contenant pas de lanthionine, classe hétérogène de petits peptides, bactériocines de type Pediocine PA-1	Pediocine PA-1	4629	*Pediococcus acidilactici* *PAC-1*
	Classe IIb	Composé de deux peptides	Lactacin F	4755	*Lactobacillus spp.*
	Classe IIc	peptide circulaire	Enterocin AS-48	7149	*Enterococcus faecalis*
	Classe IId	Linéaire, sans pédiocine, Monopeptide.	Lactococcin A	5778	*Lactococcus lactis subsp. Cremoris*
Classe III		Grandes protéines thermiques instable.	Caseicin80 Helveticin J	42000 37511	*Lactobacillus casei B80* *Lactobacillus Helveticus481*

II-4 Biosynthèse et régulation de production

II-4.1 Biosynthèse

Des études antérieures ont montré que la production de bactériocine peut être augmentée par l'optimisation des conditions de croissance telles que la température de culture, le pH, l'aération et le milieu de croissance **(TELKE *et al*., 2018)**.

Les bactériocines sont généralement produites à la fin de phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance **(DESALEGN, 2017)**. Les gènes associes à la biosynthèse des bactériocines sont regroupés en opérons. Ils sont souvent associés à des éléments transférables tels que des transposons et des plasmiques .Toutefois, plusieurs bactériocines ont des systèmes de production situés sur des chromosomes **(HAMMI, 2016)**.

Différentes protéines sont impliquées dans la production des bactériocines et sa régulation. Cette production est souvent régulée par un système de Quorum Sensing, un mécanisme permettant à certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité de la population bactérienne **(GHADBANE, 2014)**.

1) Le gène de structure code pour la pré-probactériocine, contenant un N-terminal reconnues par les transporteurs ABC pour le traitement de la séquence leader et sécrétion de la bactériocine mature dans le milieu extracellulaire.

2) Gène d'immunité, code de petites protéines, avec des tailles d'environ 51 à 154 acides aminés, qui protègent la souche productrice de la bactériocine elle-même.

3) Gènes codant pour des protéines responsables du traitement, du transport et de la sécrétion de la pré-probactériocine.

4) Gènes codant pour les enzymes responsables des modifications post-traductionnelles de la probactériocine.

5) Gènes codant des composants impliqués dans la régulation de la synthèse **(LAFUENTE-RINCON *et al*., 2016)**.

Les bactériocines sont généralement synthétisées sous forme de pré-peptides inactifs, comprenant une séquence leader N-terminale .Cette dernière permet à la bactériocine de rester inactif dans la cellule productrice. La séquence leader est habituellement éliminée lors de l'exportation par le système de transport de bactériocines, soit de type transporteur *ABC* (ATP

Binding Cassette),soit, moins fréquemment, par la voie de sécrétion générale (*Sec*) de la cellule afin de liberter la bactériocines mature **(HAMMI, 2016)**.

La production de bactériocines est par un système de transduction de signal de trois composants comprend typiquement l'histidine protéinase (HPK), le régulateur de réponse (RR) et le facteur d'induction (IF), qui sont nécessaires pour induire la transcription des gènes cibles **(DESALEGN, 2017)**.

II-4.2 Immunité

Les souches productrices de bactériocines ont développé un système de protection contre leur propre produit, appelé immunité. Chaque bactériocine possède un système immunitaire qui est généralement exprimé de manière concomitante avec les gènes structurels de la bactériocine **(RAI & CHIKINDAS, 2011)**.

Pour les bactériocines LAB, deux types de systèmes immunitaires ont été décrits. Un système dépend de l'immunité spécifique Lan I, bien que le second système dépende d'un transporteur ABC multicomposant séparé (Lan EFG) **(ZACHAROF & LOVITT, 2012)**.

La protéine Lan I est très probablement attachée à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Il fournit une immunité aux cellules productrices . **(ZACHAROF & LOVITT, 2012)**.

II-4.3 Résistance

Cependant, dans l'évolution de la guerre bactérienne, les souches sensibles à la bactériocine peuvent devenir résistantes en raison de la pression sélective de la présence de bactériocine. Cette résistance implique des changements structurels ou physiologiques dans la souche en fonction du mode d'action de cette bactériocine particulière **(LUNDSTRÖM, 2012)**.

La résistance pourrait être un changement temporaire impliquant des modifications cellulaires telles que des changements dans la fluidité de la membrane, la charge de surface et l'épaisseur de la paroi cellulaire. Il peut également s'agir d'une résistance plus permanente telle qu'une mutation provoquant les cellules **(LUNDSTRÖM, 2012)**.

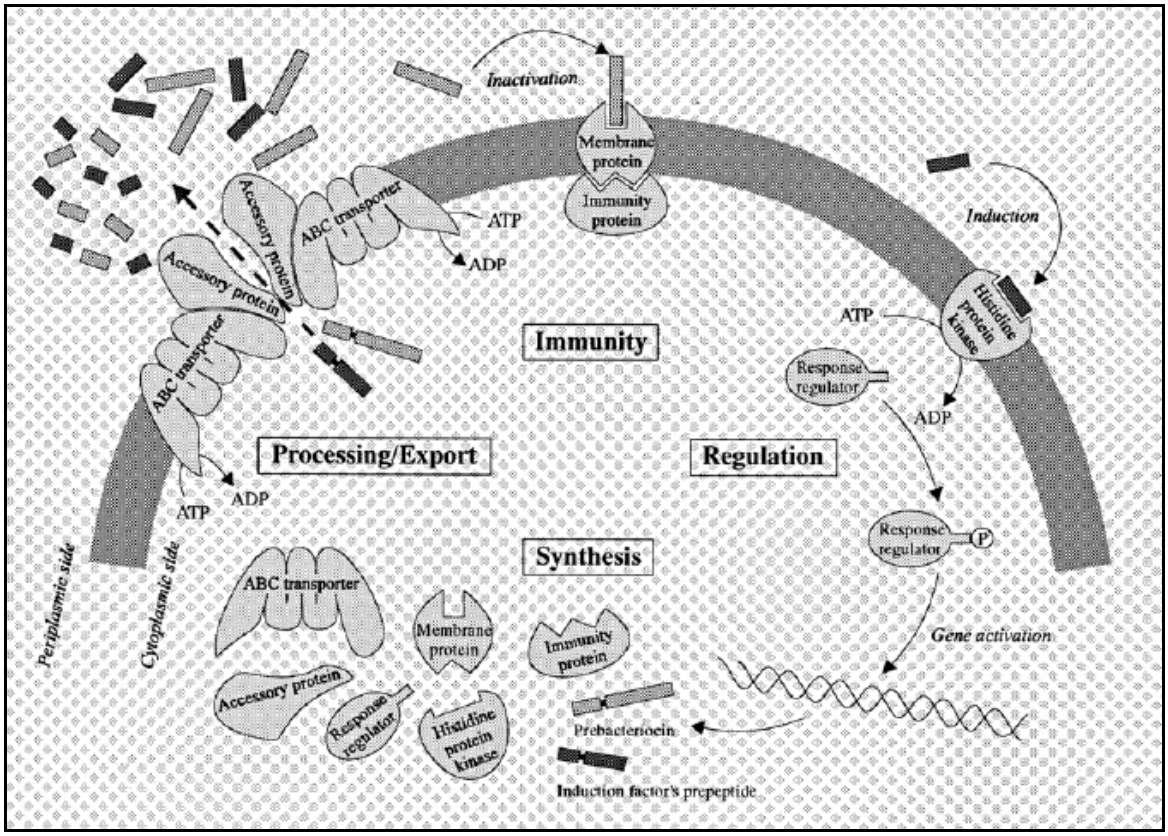


Figure 06: Vue schématique d'un possible système de production d'une bactériocine: système de régulation à trois composants ,synthèse ,maturation et immunité (ESTHER IZQUIRDO, 2009)

II-5 Mode d'action

Le mécanisme d'action spécifique des bactériocines n'est pas clair. En général, de nombreux des bactériocines sont supposés interagir avec la surface de la membrane bactérienne de leur hôte cible, principalement par des forces électrostatiques **(KYRIAKOU *et al*., 2016).**

D'une manière générale, ces bactériocines sont présumées provoquer la mort cellulaire par perméabilisation membranaire et formation de pores, en raison de leurs caractéristiques cationiques et amphipathiques. Certaines bactériocines sont capables d'altérer la formation de la paroi cellulaire, compromettre la résistance de l'enveloppe cellulaire **(BASTOS, 2015)**.

Ils se lient au récepteur de la cellule cible et leur mode d'action comprend la formation de pores, la dégradation de l'ADN cellulaire, la rupture par un clivage spécifique de l'ARNr 16S et l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane. Les bactériocines étant des agents protéiniques diffèrent de la plupart des antibiotiques parce qu'elles sont rapidement digérées par des protéases dans le tube digestif **(TENEA & YÉPEZ, 2016)**.

Le mode d'action biologique connu des bactériocines est lié à leur capacité à se lier rapidement aux liposomes anioniques. Après que les bactériocines interagissent avec les lipides anioniques, elles forment des pores dans la membrane lipidique en interagissant avec le lipide II du précurseur du peptidoglycane, empêchant ainsi la biosynthèse du peptidoglycane et perturbant l'organisation de la couche lipidique de la membrane **(HANAFYA *et al*., 2016)**.

Ils provoquent ainsi une fuite membranaire de substances de faible poids moléculaire telles que des protons, des ions potassium et des ions phosphate, conduisant à une perturbation du potentiel membranaire, à l'arrêt de la synthèse de l'ATP et à la mort cellulaire **(SHARON EDITH *et al*., 2017)**.

Une fois à l'intérieur des cellules cibles, ces molécules peuvent se lier aux acides nucléiques pour empêcher l'expression des gènes et interrompre la biosynthèse cellulaire **(González-Pérez *et al*., 2018)**.

Les représentants des bactéries lactiques sont capables de synthétiser une large gamme de bactériocines mais deux groupes peuvent être distingués. Le premier groupe provoque la mort d'organismes proches de l'organisme producteur. Le second groupe comprend de telles bactériocines qui inhibent le développement de la plupart des types de micro-organismes gram-positifs **(ALEXANDER *et al*., 2017)**.

Les bactéries à Gram négatif sont intrinsèquement résistantes aux bactériocines peptidiques produites par des organismes Gram-positifs en raison du rôle protecteur de leur membrane externe qui empêche l'atteinte de leur cible, c'est-à-dire la membrane plasmique **(González-Pérez *et al*., 2018)**.

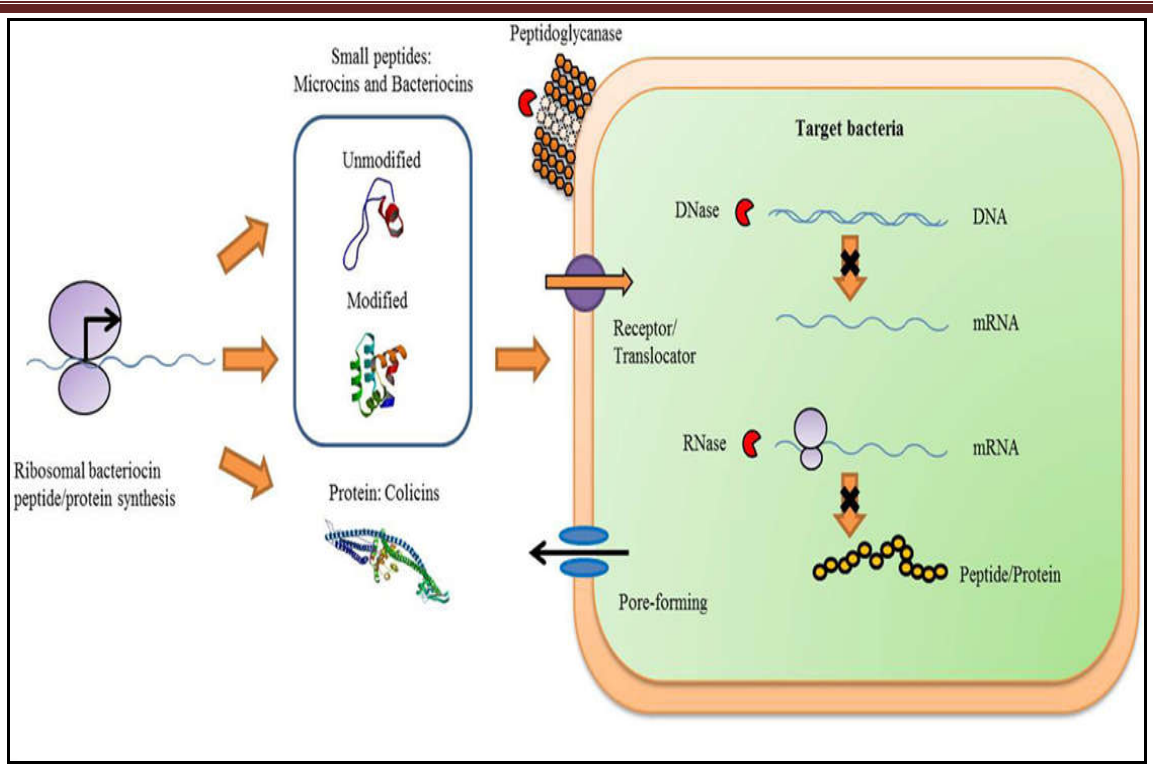


Figure 07: Mode d'action des bactériocine (YANG *et al*., 2014)

II-6 Spectre d'activité

L'activité des bactériocines concerne en général une gamme étroite de bactéries et est spécifique à la souche. Elle peut aussi passer inaperçue si elle est testée sur un nombre faible de souches cible. Ce spectre d'activité bactéricide spécifique distingue les bactériocines des BAL des antibiotiques classiques **(ESTHER IZQUIRDO, 2009)**.

La plupart des bactériocines de classe 1 , on un spectre d'activité relativement large, touchant à la fois à des bactéries lactiques elles-mêmes mais aussi des espèces pathogènes **(BELARBI, 2011)**.

Certaines bactériocines ayant une activité antibactérienne dans des gammes très limitées d'espèces pourraient être appliquées en tant qu'agents antibactériens hautement sélectifs.

Si elles permettent de contrôler spécifiquement les bactéries cibles, les doses peuvent être réduites et la résistance aux bactéries non ciblées ne se développera pas.

Leurs mécanismes d'action spécifiques devraient fournir des idées pour concevoir de nouvelles balles magiques à utiliser contre les bactéries **(TAKESHI, 2013)**.

II-7 Applications des bactériocines

Les bactéries lactiques (LAB) ou des substances telles que les bactériocines produites par LAB ont attiré trop d'attention en raison de leur utilisation sûre et naturelle en tant qu'inhibiteur contre micro-organismes pathogènes dans la production alimentaire **(ESRA & GAMZE, 2017)**.

Les bactériocines peuvent être utilisées comme additifs alimentaires, actuellement ; La nisine est un agent de conservation autorisé dans au moins 48 pays, dans lequel il est utilisé dans une variété de produits, y compris le fromage, les aliments en conserve et la viande salée **(DUHAN *et al*., 2013)**.

La production de bactériocines améliore la capacité du LAB à contrôler la croissance des bactéries pathogènes et des bactéries alimentaires dans les produits alimentaires et les rend particulièrement intéressantes pour l'industrie alimentaire, offrant des alternatives naturelles aux additifs chimiques pour améliorer la sécurité et la qualité des produits alimentaires **(KONDROTIENE *et al*., 2018)**.

Il a été trouvé que la poudre LAB lyophilisée contenant de la bactériocine inhibe la Listeria chez les hotdogs **(WAN, 2017)**.

La nisine est un bactériocine utilisée comme conservateur alimentaire principalement dans les produits laitiers. Il est non toxique et digéré par les enzymes intestinales. Il est stable à la chaleur et ne contribue pas aux saveurs **(DUHAN *et al*., 2013)**.

Nisine produite par *Lactococcus (Lc) lactis*, est la seule bactériocine approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) **(CASTELLANO *et al*., 2017)**.

Parce que les bactériocines sont généralement sûres et stables et peuvent avoir un potentiel thérapeutique en tant qu'agents anti-biofilm à large spectre **(SHARMA *et al*., 2018)**.

Les bactériocines offrent une stratégie thérapeutique alternative potentielle pour traiter à la fois les infections bactériennes multi résistantes et les infections bactériennes chroniques. Ce sont des antibactériens hautement spécifiques qui ne tuent que des bactéries étroitement liées au producteur. Cette spécificité les rend attractifs en tant que thérapeutiques car ils offrent une approche plus ciblée. En effet, un problème majeur avec les antibiotiques conventionnels est la dysbiose induite par la destruction à large spectre des bactéries **(BEHRENS *et al*., 2017)**.

Les antibiotiques sont actuellement restreints à une utilisation dans les aliments et les aliments pour animaux, et les bactériocines constituent un groupe intéressant de biomolécules ayant des propriétés antimicrobiennes qui peuvent constituer une bonne alternative **(PARADA *et al*., 2007)**.

La plupart des applications alimentaires impliquant des bactériocines peuvent être divisées en trois catégories: les bactériocines partiellement purifiées, les produits laitiers et autres produits fermentés de qualité alimentaire contenant des bactériocines sous forme de fermentate brut, et des cultures protectrices produisant des bactériocines **(CHIKINDAS *et al*., 2018)**.

Les AMP bactériocines sont relativement favorables à la bio-ingénierie et ont démontré une efficacité thérapeutique considérable, par conséquent, ces peptides sont considérés comme des agents prometteurs pour les thérapies anticancéreuses **(BAINDARA *et al*., 2017)**.

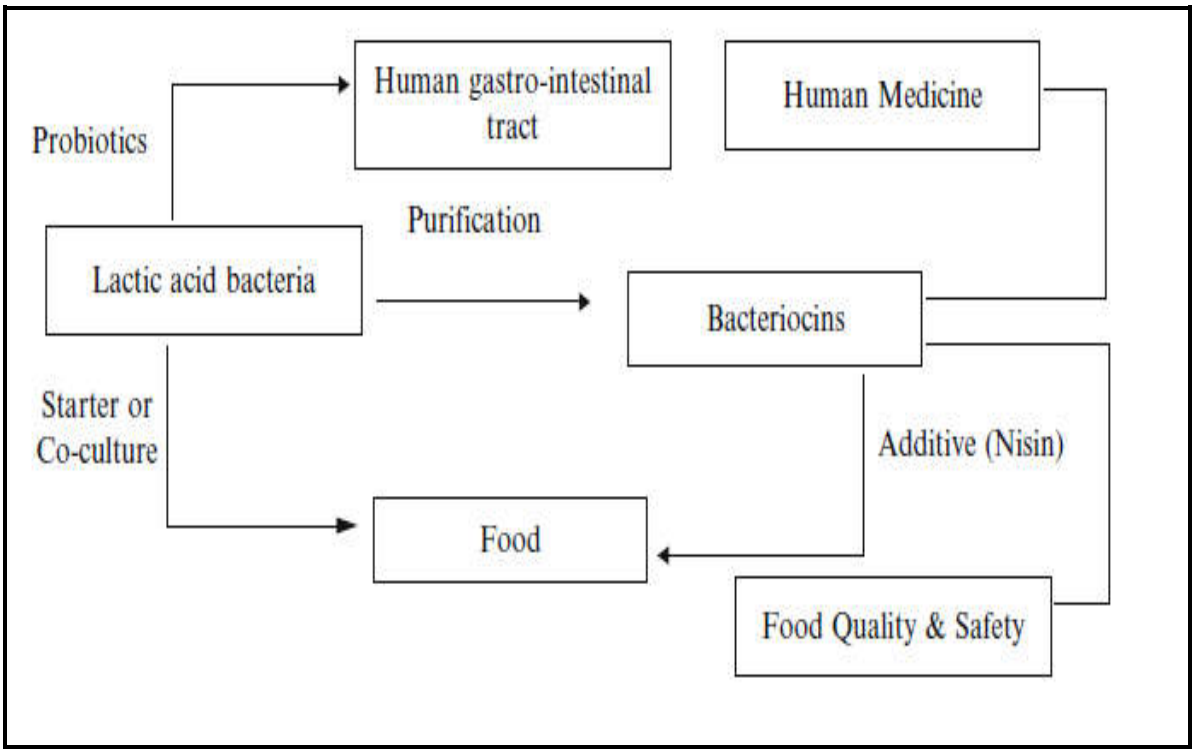


Figure 08: Aperçu du potentiel d'application de la production de bactériocine par LAB (DUHAN *et al*., 2013)

II-8 Limite d'utilisation des bactériocines

La composition de l'aliment représente le premiers facteur pouvant réduire ou totalement dissiper l'activité inhibitrice de la bactériocine en raison de son adsorption sur des composants du produit, la limitation de sa solubilité et de sa diffusion, sa dégradation par des protéases, l'interaction avec des additifs alimentaires ou des ingrédients et/ou un pH inapproprié **(BOUMEDIENE, 2013)**. Certains ingrédients alimentaires comme le chlorure de sodium, le nitrite de sodium, l'acide ascorbique, l'alginate et le lactate de sodium peuvent interférer avec l'activité de la bactériocine **(DUHAN *et al*., 2013)**.

Les traitements appliqués aux produits constituent un deuxième facteur pouvant limiter l'effet antimicrobien de la bactériocine dans un produit alimentaire. En effet, des traitements thermiques trop élevés peuvent dégrader les bactériocines **(MAKHLOUFI, 2011)** ou peut avoir des effets néfastes sur la capacité bioactive d'une bactériocine qui est incapable de supporter le traitement thermique, ce qui pourrait la rendre moins efficace **(DUHAN *et al*., 2013)**.

Le dernier facteur limitant l'activité des bactériocines est la présence de bactéries résistantes .Développement de souches résistantes: induction de souches résistantes aux bactériocines et les mutants peuvent poser d'autres problèmes dans l'utilisation des bactériocines dans la biopréservation **(DUHAN *et al*., 2013)**.

II-9 La différence entre les bactériocines et d'antibiotiques

Le terme antibiotique est génériquement utilisé pour décrire des substances produites par des organismes qui interfèrent sélectivement avec la croissance d'autres organismes **(RILEY & CHAVAN, 2007)**.

Les bactériocines diffèrent des antibiotiques traditionnels d'une manière critique:

Ils ont un spectre de destruction relativement étroit et ne sont toxiques que pour les bactéries étroitement liées à la souche productrice **(RILEY& WERTEZ, 2002)**.

L'émergence de résistances multiples aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes a stimulé la demande d'antibiotiques plus puissants. Les bactériocines sont devenues l'un des centres d'attention pour le développement potentiel en tant qu'agents thérapeutiques alternatifs en raison de leur action bactéricide ou bactériostatique spécifique **(KHOCHAMIT *et al*., 2014)**.

Le mode d'action des bactériocines est l'un des mécanismes de l'antagonisme bactérien qui a reçu le plus d'attention, principalement en raison de leur similarité avec la fonction des antibiotiques **(LEONARD, 2013)**.

Tableau 04: Caractéristiques des bactériocines et antibiotiques (RODNEY *et al*., 2014)

Caractéristique	**Bactériocine**	**Antibiotique**
Application	Aliments	Clinique
Synthèse	Ribosomique	Métabolite secondaire
Activité	Spectre étroit	Spectre variable
Immunité de cellule hôte	Oui	Non
Mécanisme d'action sur la cellule cible	Affecter la composition de membrane de cellules	Selon le mode de l'action
Condition d'interaction	Parfois accouplement des molécules	Cible de spécifie
Mode d'action	La plupart du temps formation de pore	Membrane de cellules ou cibles intracellulaire
Effets de toxicité	Aucun connu	Oui
Intensité de la bioactivité	Actif dans la gamme molaire nano-micro	Actif dans la gamme micro-à-milli molaire
Dégradabilité des enzymes protéolytiques	Élevé	Modéré à nul

II-10. Principales bactériocines

Sur les 156 bactériocines Gram-positives, 113 sont synthétisées par des bactéries lactiques (LAB) **(TODOROV *et al*., 2018)**.

II-10.1 Nisin

La bactériostine "nisin" est un polypeptide qui appartient à lantibiotics, il est composé de 24 acides aminés. Son poids moléculaire est de 3511 Dalton (GSO, 2016).

La nisine est un mélange de polypeptides antimicrobiens étroitement apparentés produits par des souches de *Lactococcus lactis subsp*. *lactis* dans des conditions de fermentation appropriées. Le principal polypeptide de la fermentation est la Nisine A **(DECRIT, ♣1434)** isolé à partir de lait et de produits à base de légumesl'importance est due à son large spectre d'activité contreBactéries à Gram négatif et à Gram positif **(SOBRINO-LÓPEZ & MARTIN-BELLOSO, 2015)**.

Les bactériocines, comme la nisine, sont acceptées sans danger comme conservateur alimentaire dans les légumes **(BHARTI *et al*., 2015)**.

II-10.2 Enterocins

Enterocines Un groupe de bactériocines produites par des Enterococci appartient au groupe des bactéries lactiques à Gram positif (LAB), isolées à partir de différentes sources alimentaires, à savoir le fromage, la viande, le poisson et les saucisses. Ce sont principalement des cocci, des paires ou des chaînes courtes, sans formation de spores, anaérobies facultatifs, oxydase et catalase négative. Les entérocines présentent une activité bactéricide contre les agents pathogènes et les micro-organismes responsables de la détérioration des aliments, notamment *Listeria monocytogenes, Clostridium sp., E. coli, Vibriocholerae, Staphylococcus aureus et Bacillus cereus*et servent de conservateurs alimentaires naturels **(BHARTI *et al*., 2015)**.

II-10.3 Lacticin 3147

Bien que la lacticine 3147 n'ait pas été commercialiséeexploités, de nombreuses études ont suggéré cette bactériocine commeétant potentiellement adapté à de nombreuses applications. Plus en particulier, l'intérêt pour la lacticine 3147 a régulièrement augmentéen raison de son activité contre un large éventail d'organismes de importance dans les aliments **(SOBRINO-LÓPEZ & MARTIN-BELLOSO, 2015)**.

II-10.4 Pédiocins

Les pédiocines sont classées dans la classe II des peptides antimicrobiens non modifiés (36-48 résidus), également connus sous le nom de bactériocines «antilistérielles» ou «Listeria-actives» produites par Pediococcus spp. Les bactériocines de type pédiocine sont petites (<5 kDa), ont une similarité de séquence d'acides aminés de 40-60% et sont caractérisées par une terminaison a-Y-G-N-G-V-N-amino. Récemment, une pédiocine de formulation contenant *P.acidilactici* est commercialisée sous le nom commercial Alta 2341®. La caractéristique importante de la pédiocine est qu'elle est stable dans l'environnement complexe des aliments lorsqu'elle est utilisée comme additif alimentaire **(BHARTI *et al*., 2015)**.

Deuxième partie
Etude expérimentale

Chapitre I
Matériel &méthodes

I- Matériel et Méthodes

Notre étude repose d'une part sur l'évaluation des quelques paramètres physicochimiques intervenant dans la variation de la qualité et la quantité des éléments composants le lait cru ; et d'autre part sur la valorisation des potentialités technologiques de sa flore lactique et d'évaluer le spectre d'activité de leur bactériocine vis-à-vis de certains germes pathogènes.

.

Ce travail a été réalisé au sein de laboratoire d'analyse et de contrôle de la qualité et de la conformité *FATILAB* d'El Oued, Centre Algérien de Contrôle de Qualité et d'Emballage (CACQE) d'El Oued et au niveau de laboratoire de recherche (protection des écosystèmes en zone aride et semi-aride) à l'Université Kasdi Merbah Ouargla.

I-1 Matériel

I-1.1 Matériels biologiques

I-1.1.1 Lait cru

Les échantillons du lait servent à un support d'isolement et de sélection des souches bactériennes à activité technologique et biologique. Pour cela trois (03) types de lait ont fait l'objet de cette étude.

- **Provenance et prélèvement des échantillons**

Nos échantillons proviennent de différentes régions de la wilaya d'El Oued durant le mois de février 2018 de différentes races. La traite des animaux (caprin, bovin, camelin) a lieu le matin, la quantité prélevée est de 250 ml dans des conditions aseptiques afin d'éviter toute sorte de contamination (Fig.09). Cette collecte serte à la fois à une étude physico-chimiques et microbiologie. Le tableau 05 représente les caractéristiques des races dont on a prélevé le lait.

Figure 09: Prélèvement des échantillons de lait (photo p., 2018)

Tableau 05: Caractéristiques des races dont on a prélevé différentes lait

		Région	Couleur	Age (ans)	Race/ Population	Heure de prélèvement	Production journalière (L)
Caprin	Ech.1	Guémar	Maron	2	Cherki	7 :00	0.5
	Ech.2	Guémar	Maron	2.5	Cherki	7 :15	0.75
	Ech.3	Guémar	Maron	1.5	Guermit	6 :50	0.75
	Ech.4	Guémar	Blanc	1.5	Cherki	7 :30	0.75
	Ech.5	Guémar	Noir/blanc	2.5	Arbia	6 :30	1
Bovin	Ech.1	Debila	Noir/blanc	8	Djamouse	10 :00	15 – 20
	Ech.2	Debila	Noir/blanc	7	Djamouse	10 :05	15 – 20
	Ech.3	Debila	Noir/blanc	7	Djamouse	10 :10	15 – 20
	Ech.4	Debila	Noir/blanc	8	Djamouse	10 :15	15 – 20
	Ech.5	Debila	Noir/blanc	9	Djamouse	10 :20	15 – 20
Camelin	Ech.1	El Oeud	Maron	3	Targui	8 :00	3-4
	Ech.2	El Oeud	Maron	2	Sahraui	8 :00	6-7
	Ech.3	El Oeud	Sablé	2.5	Sahraui	8 :20	6-7
	Ech.4	El Oeud	Sablé	4	Sahraui	8 :10	6-8
	Ech.5	El Oeud	Maron	3.5	Targui	8 :30	3-4

I-1.1.2 Souche bactérienne indicatrice (pathogène)

Pour la mise en évidence des activités antimicrobiennes des souches lactiques, sept (07) bactéries indicatrices ont été utilisées.

Tableau 06: Souches cibles utilisées et leur origine

Souche	Gram	Référence	Origine
Escherichia coli	Négatif	ATCC 25922	Institut Pasteur
Pseudomonas aeruginosa		ATCC 27853	
Klebseilla pneumoniae		ATCC 700603	
Salmonella sp			
Staphylococcus aureus	Positif	ATCC 25923	
Listeria innocua clip		ATCC 74915	
Bacillus cereus			

I-1.2 Matériels techniques

Les analyses ont été effectuées par l'appareillage et les réactifs cités dans le Tableau 07et 08.

Tableau 07 : Liste des appareils utilisés

Appareillage	
Autoclave (nüve)	Micropipette 200µl (DRAGON LAB)
Etuve bactériologique (nüve)	Lyophilisateur (Alpha 1-2 LDPLUS CHRIST)
Balance de précision (Kern)	Incubateur réfrigérée (Lovibond)
Bain marie (nüve)	Centrifugeuse réfrigéré (*Hettich* ROTINA 380 R)
Microscope optique (Motic)	Spectrophotomètre (OPTIZEN)
Plaque chauffante agitante (Stuart)	Etuve (Binder)
Four a moufle (nüve)	Centrifugeuse (nüve)
	Butyromètre (Funk Gerber)
Autres	
Membranes de dialyse (*Spectra-Por®3*,MWCO 3,5 kDa)	

Tableau 08 : Liste des produits

Milieux de culture	
MRS bouillon et gélose (Biokar)	Lait écrémé (Conda)
M17 bouillon et gélose (Biokar)	BCPL (Conda)
Mueller-Hinton gélose (HIMEDIA)	Cœur serval bouillon (Biokar)
produits chimiques	
Ethanol 96% (Karloerba)	Extrait de levure (Biochim)
Eau oxygénée (10v)	Peptone (Biokar)
NaCl (Scharlau)	Galerie API 20^{E} (BioMérieux)
Acide sulfurique H_2SO_4 (Biochim)	Bleu de méthylène (Biochim)
Glycérole (Sigma)	Huile de patafime (Isoffine)
Butanol (Sigma-Adrich)	Eau ultra pure (VWR PROLABO®)
NaOH 0.1M (Biochim)	Sulfate d'ammonium (NH4)2SO4 (Sigma-Aldrich)
Violet de gentien (Pasteur)	Fishine (IDEAL)
Phénolphtaléine	TDA
VP1(Pasteur)	VP2(Pasteur)
Covacs (Pasteur)	Lugol (Pasteur)

Les milieux de culture gélosé MRS, M17 et Muller-Hinton ; Bouillon MRS, M17 et Cœur serval sont préparés par le laboratoire Bio Analyse et SOS LAB.

I-2 Méthodes

Les différentes étapes de la méthodologie suivie lors de la présente étude sont schématisées sur la figure ci-dessous.

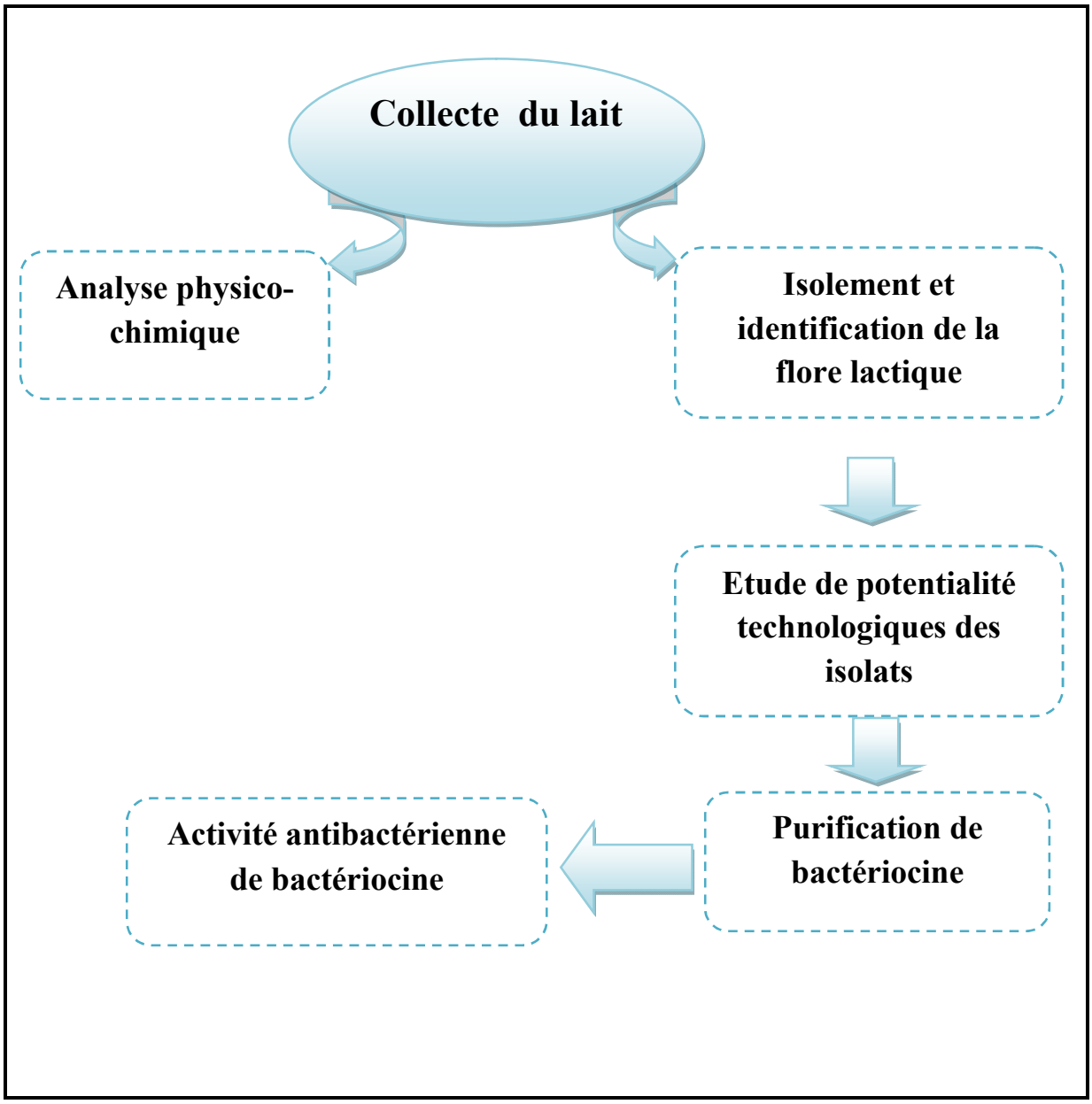


Figure 10 : Procédure expérimentale

I-2.1 Analyses physicochimiques du lait

I-2.1.1 Préparation des échantillons

Cette opération consiste à rendre l'échantillon homogène et à l'amener à température convenable, c'est-à-dire à une température qui doit être de 20 ± 5°C **(NF V 04-203).**

a- Détermination de l'acidité titrable

On entend par « acidité titrable du lait », l'acidité déterminée dans les conditions décrite par la méthode présente **(JOA N°10.96.01)**. Elle est exprimée conventionnellement en grammes d'acide lactique par litre de lait. Titrage de l'acidité par l'hydroxyde de sodium 0.1N en présence de phénolphtaléine comme indicateur.

b- Détermination de la matière sèche

Le résultat obtenu après évaporation au bain d'eau et dessiccation à étuve à 103 ± 2°C . Elle est exprimée en gramme par litre ou en pourcentage en masse **(JOA N° 54/2013).**

Dans la capsule séchée, introduire 5ml de l'échantillon pour essai à l'aide de la pipette. Placer la capsule pendant trente minutes dans le bain d'eau bouillante, puis dans l'étuve pendant trois heures. Après refroidissement dans le dessiccateur, peser à après.

En gramme par litre : $(m_2 - m_0 /5) \times 100$

En pourcentage % : $(m_2 - m_0 / m_1 - m_0) \times 100$

Où :

$\mathbf{m_0}$: est la masse en gramme de la capsule vide sèche ou calcinée.

$\mathbf{m_1}$: est la masse en gramme de la capsule avec son contenu.

$\mathbf{m_2}$: est la masse en gramme de la capsule avec son contenu après séchage.

c- Détermination des cendres

On entend par « cendre du lait » le produit résultant de l'incinération du résidu sec du lait à 525 ± 25°C dans un lent courent d'air. Elle est exprimée en gramme par litre ou en pourcentage en masse **(NF V 04-208)**.

Les cendres du lait exprimé en gramme par litre, obtenues à partir de l'échantillon, sont égales à : $(M_0 - M_1) \times 1000/V$

Les cendres du lait exprimé en pour cent en masse, obtenues à partir de l'échantillon, sont égales à : $(M_0 - M_1) \times 1000/E$

Où :

M_0 : est la masse en gramme de la capsule vide.

M_1 : est la masse en gramme de la capsule et des cendres.

V : est le volume en millilitre de la prise d'essai de lait.

E : est la masse en gramme de la prise d'essai de lait.

d- Détermination de la teneur en matière grasse

La méthode dite de Gerber est une technique conventionnelle permettant d'évaluer la teneur en matière grasse des laits; Elle est exprimée en gramme par litre ou en pourcentage en masse.

Après dissolution des protéines du lait par addition d'acide sulfurique, séparation de la matière grasse par centrifugation dans un butyromètre, la séparation étant favorisée par l'addition d'une petite quantité d'alcool isomylique.

Obtention de la teneur en matière grasse (en grammes pour 100 g ou 100 ml de lait) par lecture directe sur l'échelle du butyromètre **(NF V 04-210)**.

e- Détermination de la densité

C'est la masse volumique à 20°C, elle est exprimée en gramme par millilitre. La densité déterminée dans les conditions décrite par la présente méthode **(N°10.95.02).**

I-2.1.2 Analyse statistique

Les essais obtenus pour l'analyse physico-chimique de lait ont été reproduits en duplicata. L'analyse statistique des données (analyse de la moyenne et l'écart type de moyenne) a été réalisée par le logiciel du système de l'analyse statistique (**MINITAB**).

I-2.2 Isolement et identification des bactéries lactiques

I-2.2.1 Isolement et purification des bactéries lactiques

L'isolement sélectif des bactéries lactiques (BL) par culture sur plusieurs milieux a été réalisé selon les méthodes décrites par la Fédération Internationale du Lait.

Les ensemencements sont réalisés sur milieu M17 et MRS gélosé en masse, en utilisant les dilutions décimales dans une solution stérile (0.85% NaCl ,0. 1% Peptone) (Annexe I), nous avons procédé à l'isolement des différents microorganismes mentionnés au Tableau 6. Les analyses microbiologiques sont faites directement à partir des prélèvements **(BADIS *et al*, 2005)**.

Après isolement des colonies d'aspects morphologiques différents (taille, couleur, surface, profondeur…) sont repiquées sur milieu MRS et M17, incubées à 30 ou 45°C afin de s'assurer de la pureté des cultures. La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode de stries suivi d'une observation microscopique (Fig.11, Tab.09) **(LAIRINI *et al.*, 2011)**.

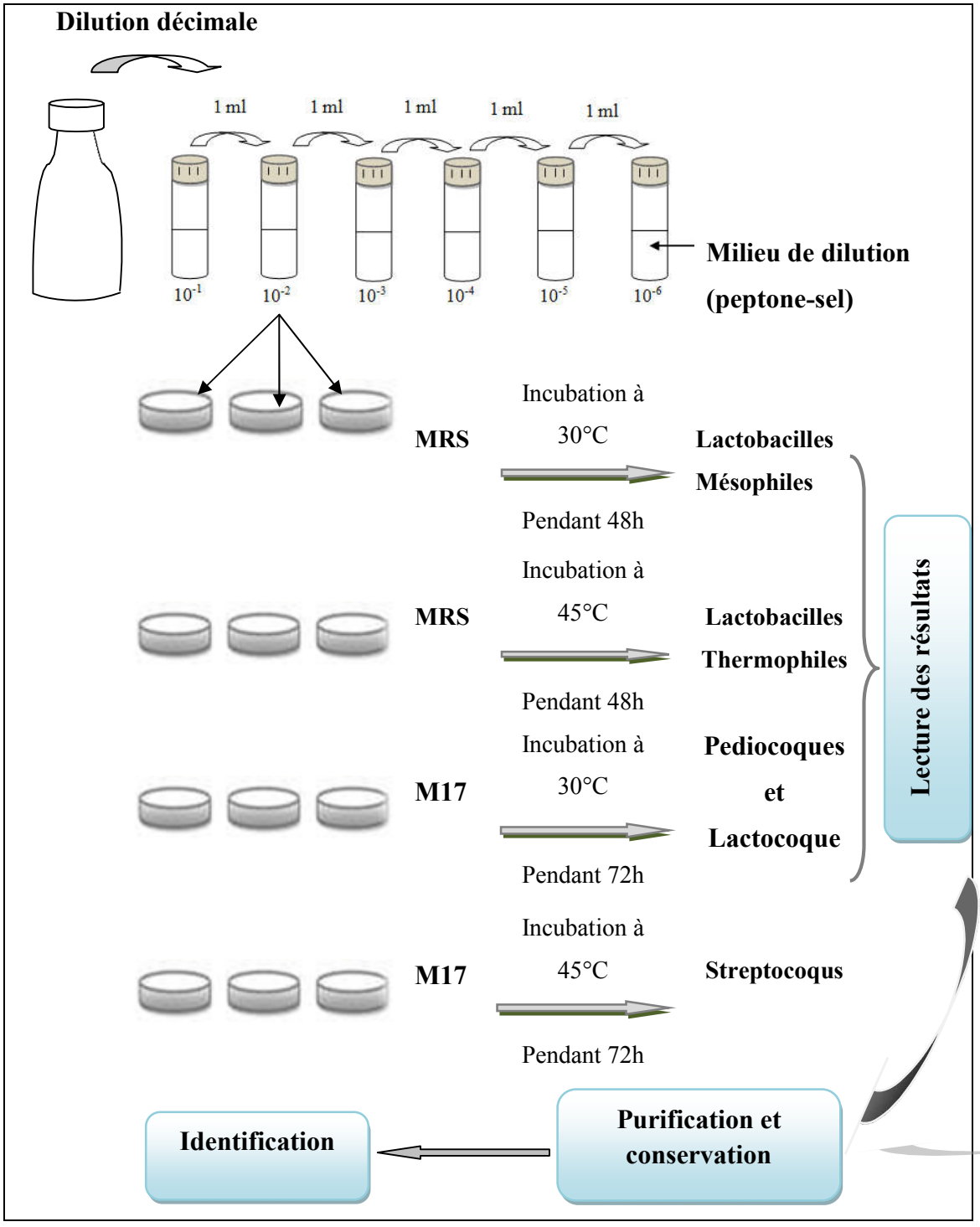


Figure 11 : Protocole d'isolement des souches lactiques

Tableau 09: Milieux utilisés et conditions d'incubation pour l'isolement des bactéries lactiques (BADIS *et al*., 2005)

Microorganismes	Milieux d'isolement	T°C	Durée (h)	Incubation
Streptocoques Lactiques	M17	42-48	72	Aérobiose
Pediocoques et Lactocoque	M17	30	72	Aérobiose
Lactobacilles Mésophiles	MRS	30	24-36	Anaérobiose
Lactobacilles Thermophiles	MRS	45	24-36	Anaérobiose

I- 2.2.2 Conservation des isolats

a- Conservation à court terme

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu MRS solide incliné. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines **(BADIS *et al*, 2005 ; BRAHIMI, 2015)**.

b- Conservation à long terme

A partir des cultures jeunes de 18h incubées dans un milieu liquide, les cellules ont été récupérées par centrifugation à 4000 tours par minute pendant 10 min. Une fois le surnageant était éliminé, on a ajouté le milieu de conservation sur le culot.

Ce milieu contient du lait écrémé et 30% de glycérol. Les cultures ont été conservées en suspension dense dans des eppendorfs à -20°C. En cas de besoin, les souches sont repiquées dans du lait écrémé enrichie 0.05 % d'extrait de levure, deux fois avant l'utilisation **(BELARBI, 2011 ; BADIS *et al*, 2005 ; CHENTOUF, 2015)**.

I-2.2.3 Identification des bactéries lactiques

L'identification des souches purifiées est établie pour les bactéries lactiques en se basant sur des caractères morphologiques et biochimiques (forme, coloration de Gram, catalase, croissance à différentes température, sensibilité au NaCl, fermentation des sucres, production de CO_2 **(LAIRINI *et al*., 2011)**.

a- Critère morphologique

- **Examen macroscopique :** Consiste à étudier la forme, l'aspect, le contour, la surface, la couleur des colonies sur les milieux M17 et MRS.
- **Etude microscopique :** L'étude microscopique des souches lactiques a été réalisée après une coloration de Gram (Annexe II), afin de déterminer leur morphologie et leur type de gram + ou –.

b- Critères physiologique et biochimique

- **Test de catalase** : Pour mettre en évidence cette enzyme, une partie de la colonie suspecte est diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase **(BRAHIMI, 2015)**.

- **Fermentation du lactose :** Nous avons préparé le milieu MRS et le milieu M17 par l'addition d'un indicateur de coloration : Bromo-crésol-pourpre lactose (BCPL) en solution stérile au bouillon MRS et le bouillon M17. Ces milieux sont utilisés comme milieux de culture de base pour la réalisation du test de fermentation du lactose. En parallèle, nous avons des pré- cultures de 18 h des souches lactiques dans des tubes de bouillon MRS ou M17 approprié. Ces tubes sont centrifugés à 8 000 tours / min pendant 15 min. Après, nous avons récupéré le culot en ajoutant 2ml de MRS BCPL ou M17 BCPL et en le recouvrant par l'huile de paraffine, puis l'incubation à 37°C pendant 24 heures. Résultat positif se traduit par la formation d'acide qui se manifeste par le virage de couleur de violet vers le jaune **(TABAK & BENSOLTANE, 2011)**.

- **Type fermentaire :** l'ensemencement des souches s'effectue dans un milieu liquide (M17 ou MRS) contenant au préalable une cloche de Durham **(DJADOUNI, 2013)**. La production du gaz dans la cloche indique la souche est hétérofermentaire, dans le cas contraire elle est homofermentaire.

➢ **Effet de NaCI , pH et du température :** L'habilité à croître sur milieu M17 et MRS en présence de NaCl à différentes concentrations et à différentes valeurs de pH a été observé pendant 2 à 3 jours d'incubation.

Les isolats des genres ont été testés comme suit : *Streptococcus*, et *Lactobacillus* à 2% et 4% de NaCl et pH 4.5 et 6.5, *Pediococcus* à 2%, 3%, 4% et 6.5% de NaCl et pH 4.2, 4.8, 7.0 et 8.0.

La croissance, sur milieu M17 et MRS, a été suivie pour les températures de 5°C et 10°C après incubation de 5-7 jours et 37°C ,40°C et 45°C après incubation de 24 à 48 heures. En fonction des températures, les isolats des genres ont été testées comme suit: *Streptococcus* à 10°C, *Pediococcus, Streptococcus* à 40°C, *Streptococcus*, , *Lactobacillus*, *Pediococcus* à 45°C **(BADIS *et al.*, 2005 ; SENBAGAM *et al*., 2013)**.

➢ **Thermorésistance :** Des tubes contenant 10 ml de MRS liquide sont inoculés par les souches isolées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à 63,5°C pendant 30 minutes, après refroidissement brusque, elles sont incubées à 30°C±1°C pendant 48 à 72h. Un résultat positif se traduit par un trouble **(RAHLI, 2015)**.

➢ **Recherche de l'arginine déhydrolase (ADH)** : La production de l'arginine déhydrolase sur le substrat d'arginine, elles sont incubées à 30°C±1°C pendant 24h.

- Une teinte rouge cerise indique une réaction ADH positive.
- Une teinte reste jaune indique une réaction ADH négative **(BIOMERIEUX).**

➢ **VP :** La production d'acetoïne (3-hudroxybutanone) sur le substrat en pyruvate de sodium, elles sont incubées à 30°C±1°C pendant 24, on ajoute une goutte de réactif VP 1 et VP2 attendre 10 minutes.

- Une teinte rose cerise indique une réaction positive.
- Une teinte reste blanc indique une réaction négative **(BIOMERIEUX).**

➢ **Utilisation de citrate :** Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone: le citrate.

Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu, incubé à 30°C±1°C pendant 24h.

- Citrate-positive : culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu).
- Citrate-négative : pas de culture (coloration verte de milieu inchangée) **(BIOMERIEUX).**

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

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

➢ **La fermentation des carbohydrates**

Les carbohydrates testés sont : glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, mélibiose, amygdalin, arabinose. L'incubation se fait à 30°C±1°C pendant 24h. Après lecture directe

- Une coloration jaune indique une réaction positive.
- Une coloration bleue indique une réaction négative **(BIOMERIEUX)**.

➢ **Production de H_2S :** Ce test permet la production de H_2S a partir de la substrat de thiosulfate de sodium, l'incubation se fait à 30°C±1°C pendant 24h. Après lecture directe

- Une coloration noire indique une réaction positive.
- Une coloration blanche indique une réaction négative **(BIOMERIEUX)**.

NB

Pour quelques testes biochimiques en utilise la galerie API 20 **(BIOMERIEUX).**

La galerie API 20 est constituée de 20 microtubes (Annexe III) permettant l'étude de la fermentation de substrat. Les tests de fermentation sont inoculés avec API 20 Medium qui réhydrate les substrats.

I-2.3 Etude de l'aptitude technologique des bactéries lactiques isolées

I-2.3.1 Pouvoir acidifiant

Afin de démontrer l'acidité provoquée par les bactéries lactiques, on a suivi la variation du pH dans les deux milieux MRS et M17 liquide. Les pH initial et final ont été mesurés à l'aide d'un pH mètre.

- Le pH initial correspond au pH du bouillon M17 ou du bouillon MRS sans inoculum (sans bactérie).

- Le pH final est le pH mesuré après l'incubation de chacune des souches lactiques cultivée dans le bouillon M17 ou le bouillon MRS spécifique à sa croissance pendant 24 heures à 30 et 45ºC **(TABAK & BENSOLTANE, 2011)**.

I-2.3.2 Pouvoir antimicrobiennes

Dans cette partie on réalise des interactions entre les souches isolées de lait et sept bactéries pathogènes de références. Les microorganismes utilisés dans notre étude sont mentionnés dans le tableau 06.

a- Préparation des pré-cultures des bactéries

Pour réaliser le test d'antagonisme, il faut avoir des pré-cultures des souches lactiques et la pré-culture de la souche indicatrice (pathogène).

Á partir des tubes inclinés de gélose MRS et M17, nous avons ensemencé chacune des souches lactiques isolées dans un tube à essais contenant 5 ml du bouillon approprié (bouillon MRS ou bouillon M17). Le tube est incubé à 30 et 45ºC pendant 18 heures en anaérobiose.

Alors que la souche indicatrice a été ensemencées dans un tube de cœur serval et incubée à 37ºC pendant 18 heures.

b- Interactions bactéries lactiques vs bactéries pathogènes

Selon la méthode de diffusion en puits de **BAREFOOT ET KAENHAMMER, 1983 ;** un volume du milieu Mueller-Hinton agar est coulé dans des boites de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les boites sont ensemencées en surface par la suspension de la souche pathogène (100 µl, DO= 0.1 à 0.08), puis des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce (cloche de Durham) sur la gélose et seront remplis par 60 à 80µl de surnageant filtré et neutralisé, obtenu après centrifugation à 4000 tours / min pendant 15 min d'une culture de la souche lactique (dans le bouillon M17 et le bouillon MRS).

Les boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C/2h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne. Les boites sont incubées à 37°C pendant 24 heures et l'activité antimicrobienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits **(TABAK & BENSOLTANE, 2011)**. La figure 12 illustre les étapes de ce protocole.

Les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits seront mesurés, le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 2mm. La mesure du diamètre d'inhibition Zi est effectuée selon la formule suivante :

Zi en (mm) = diamètre de la zone d'inhibition obtenue (mm) – diamètre de puits (6 mm)

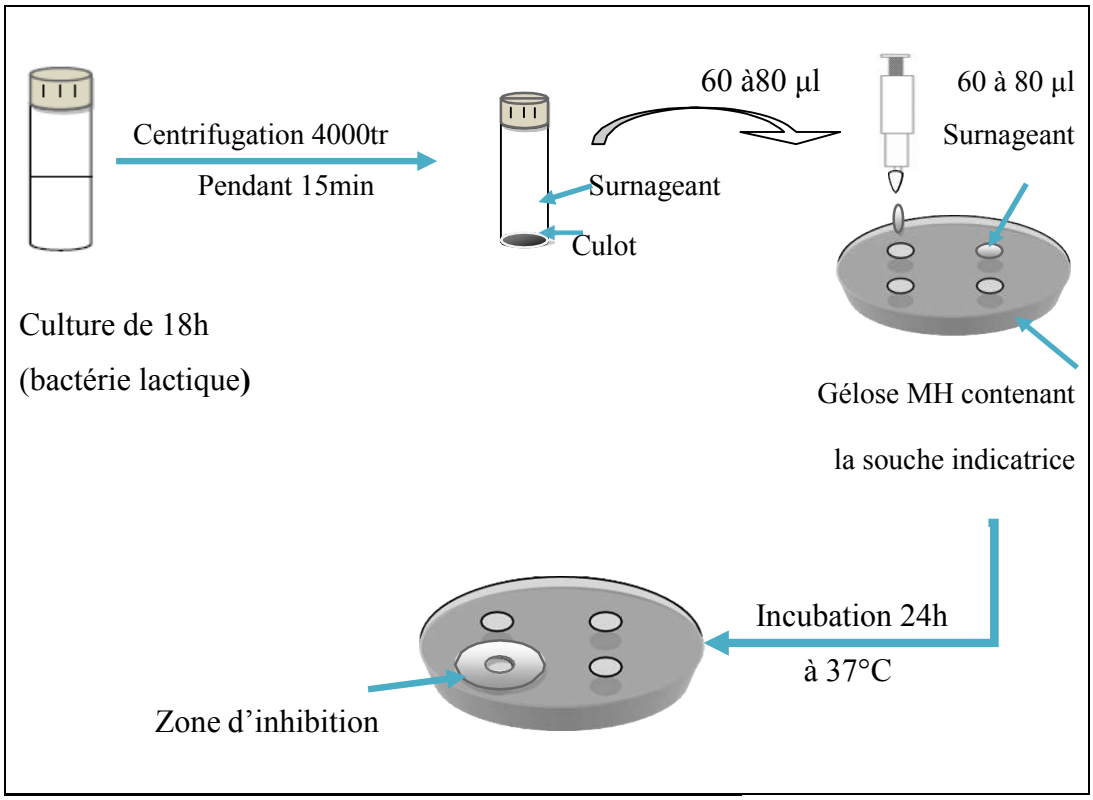


Figure 12 : Méthode utilisée pour la recherche de substances antimicrobienne.

I-2.4 Production et purification de la bactériocine

I-2.4.1 Culture de la souche

Une quantité de 100 ml de bouillon MRS ou M17 fortifié par de l'extrait de levure comme précédemment a été inoculée par 1% d'une pré-culture de la souche test (DO = 1 à λ = 620nm). Après incubation à 30 et 45°C sans agitation jusqu'à la phase stationnaire de croissance pendant une nuit **(ABABSA, 2012)**.

I-2.4.2 Purification de la bactériocine

a- Préparation et traitement du surnageant de culture

Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 5000 ^{x}g pendant 15 min à 4°C, le surnageant chauffé à 80°C pendant 10 min pour dégrader les protéines/ peptides sensibles à la chaleur et le pH ajusté à 6,5 afin de neutraliser l'acide lactique produit par les bactéries lactiques **(SVETOSLAV DIMITROV *et al*, 2010 ; MAKHLOUFI, 2011)**. L'acide lactique possède des propriétés antibactériennes qui pourraient interférer avec celles de la bactériocine produite par la souche (lactique).

b- Précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse

Le surnageant a été précipité à 60% de saturation en sulfate d'ammonium (37,32 g de sulfate d'ammonium pour 100 ml de solution) à 4 °C puis centrifugé à 9000 ^{x}g pendant 30 min à 4°C. Le culot a été repris dans 100 ml d'eau (VWR PROLABO®) et dialysé pendant environ 20 h à l'aide de membranes de dialyse (*Spectra-Por®3*, MWCO 3,5 kDa) contre de l'eau ultra pure (VWR PROLABO®). Une fois l'excès de sels éliminé, l'ensemble a été lyophilisé pendant la nuit et conservé à - 20 **°C (MAMECHE, 2008; MAKHLOUFI, 2011)**. La figure 13 illustre les étapes de ce protocole.

I-2.4.3 Dosage de protéine

On mesure l'absorption à 280 nm pour faire un dosage quantitatif ou semi-quantitatif d'une solution protéique. La concentration de la bactériocine a été calculée suivant la loi de **WARBURG et CHRISTIAN (1941)** requiert la mesure de l'absorption à deux longueurs d'onde: à 280 nm, pour les protéines, et à 260 nm, pour les acides nucléiques. Ces valeurs peuvent alors s'intégrer dans l'équation :

$$\textbf{[Protéines] (mg/mL)} = 1.55\ A_{280} - 0.76\ A_{260}$$

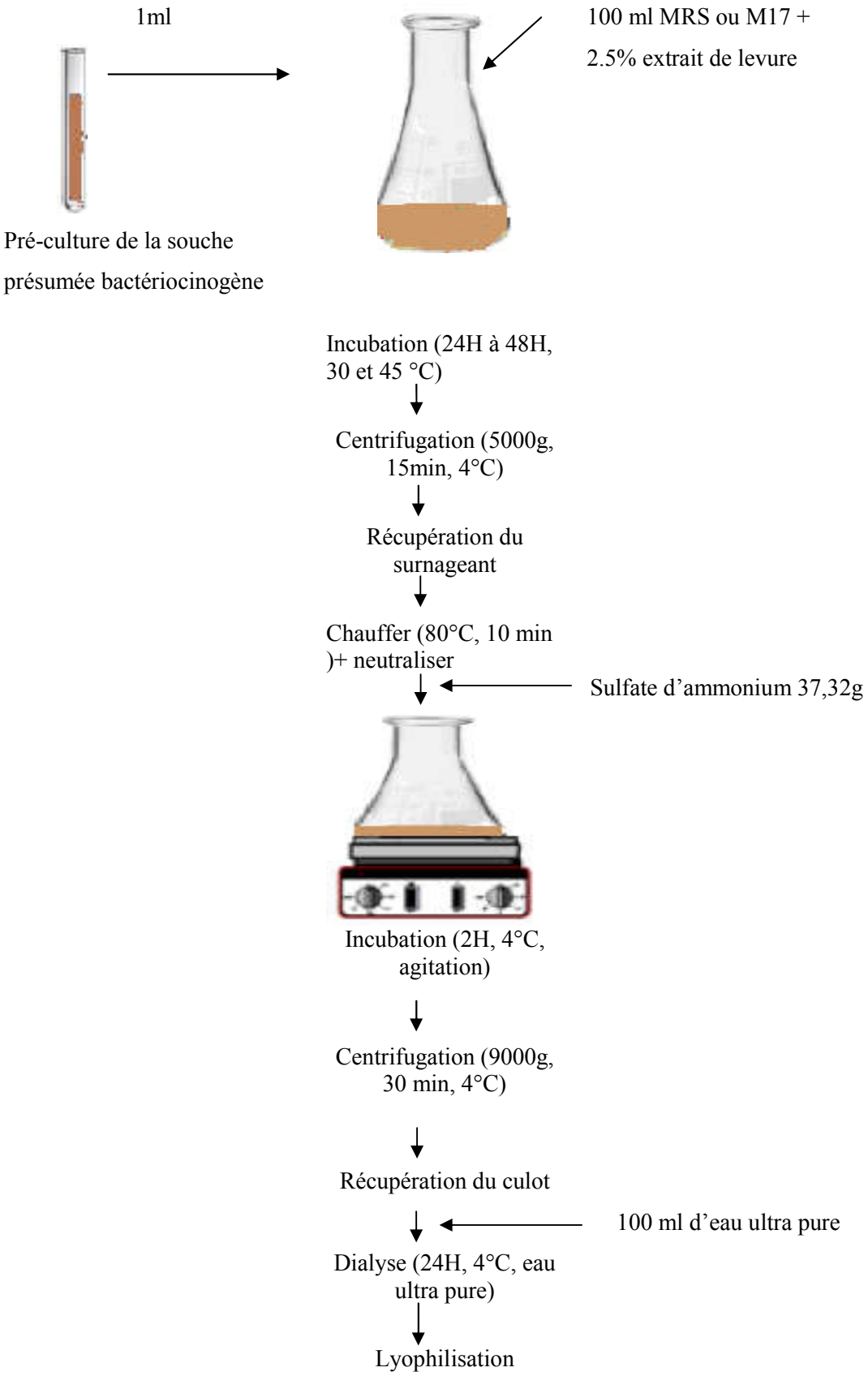


Figure 13 : Protocole de précipitation au sulfate d'ammonium

III-2.5 Activité antibactérienne des bactériocines pures

Pour la détermination de l'activité antagoniste de la bactériocine brute de LAB a été testé par la méthode de diffusion de puits, la concentration inhibitrice minimale et la concentration minimale de bactéricide a été déterminée et suivie par **(TAGG & MCGIVEN, 1971).**

III-2.5.1 Activité antibactérienne des bactériocines précipitées

Les activités antibactériennes ont été dosées contre des souches bactériennes indicatrices, *Listeria innocua clip* ATCC 74915, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**,** *Klebseilla pneumoniae* ATCC 700603 et *Salmonella sp*, en utilisant la méthode de diffusion en puits décrite par ARICI *et al* **(LAIRINI *et al*., 2014)**.

La concentration des bactéries testées a été fixée à (DO= 0.1 à 0.08 à λ= 660 nm), Environ 100µl des bactéries indicatrices à tester pour la sensibilité ont été inoculées dans 20 ml milieu de culture d'agar (0,9% d'agar) et versées dans les boîtes de Pétri. Après solidification, les boîtes de Pétri ont été séchées pendant 30 minutes sous une hotte à flux laminaire.

Des puits de 6 mm de diamètre ont été forés au liège dans l'agar. Des aliquotes (100 µl) de solutions de bactériocine ont été distribuées dans les puits et les boîtes ont été pré-incubées à 4 ° C pendant 2 h puis incubées pendant 18 h à 37°C. L'activité antagoniste a été exprimée en tant que zone d'inhibition entourant bien chaque gélose. Les activités antagonistes des échantillons ont été déterminées pour chaque isolat par la persistance de la zone d'inhibition mesurée en diamètre (mm).

III-2.5.2 Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Le composé de bactériocine purifié provenant de LAB a été soumis pour son activité bactéricide contre les agents pathogènes Alimentaires pour le lait cru *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

L'estimation de la CMI pour la culture d'organisme ci-dessus, 100µl de cultures en phase logarithmique ont été transférés dans séries des tubes à essai contenant 8ml de bouillon cœur cervel et différentes concentrations de bactériocine brute ont été ajoutés à les tubes ; 30, 60, 90, 120, 150, 180 et 210 µl et tube sans inoculation servi de contrôle. Les tubes à essai ont été incubés pendant 24h à 37 ° C et La concentration minimale inhibitrice a été estimée en

mesurant la densité optique des tubes de culture à 660 nm en utilisant un spectrophotomètre **(JAYA CHITRA & SIVA KUMAR, 2018)**. La figure 14 illustre les étapes de ce protocole.

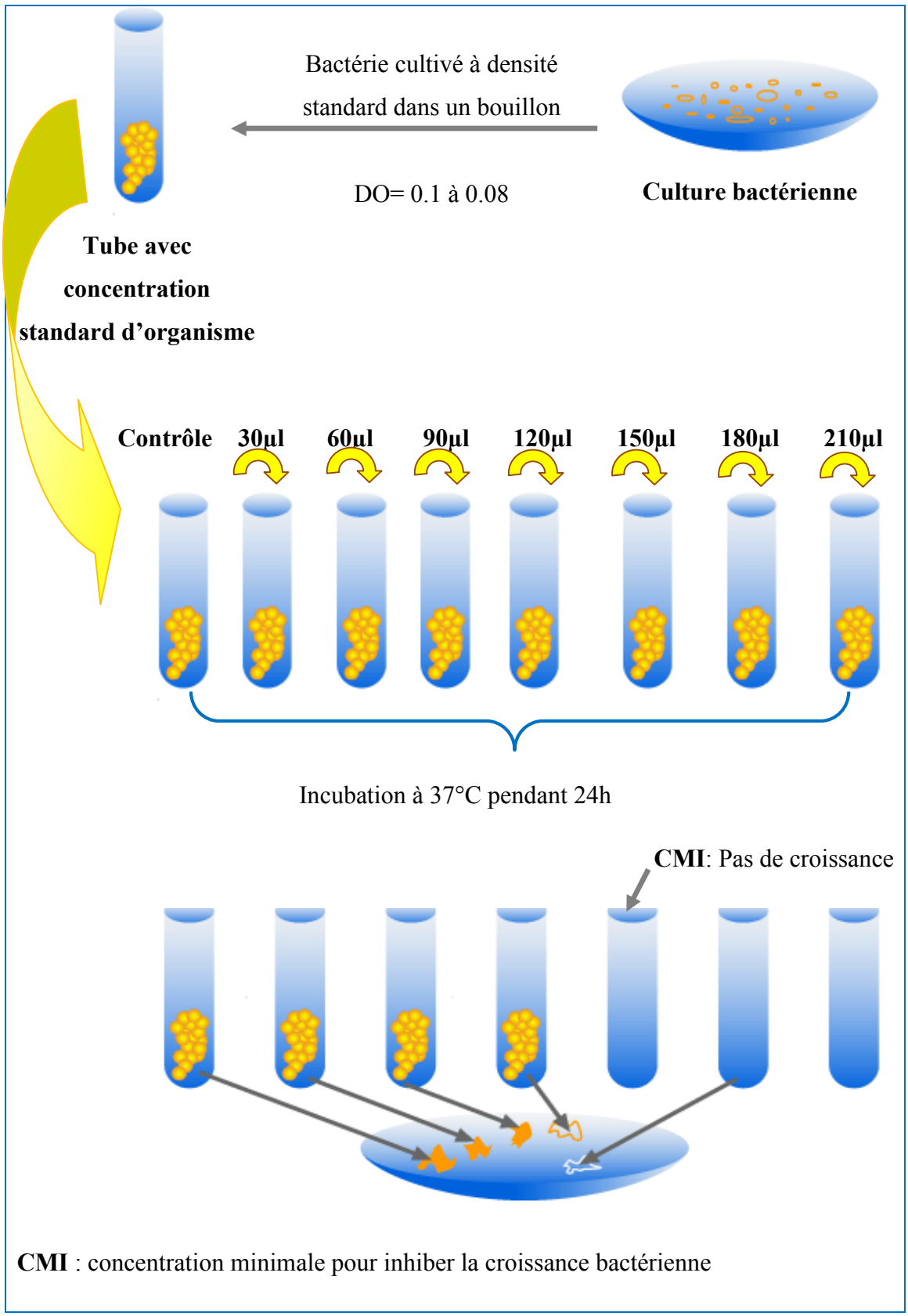


Figure 14 : Protocole de recherche de concentration minimale inhibitrice (CMI)

Chapitre II

Résultats & discussion

II - Résultats et discussion

II- 1 Analyses physico-chimiques

Les résultats des analyses physico-chimiques de lait sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau10 : Résultats des analyses physico-chimiques de lait cru

	Caprin	Bovin	Camelin	Norme
Acidité (g/l)	1.008 ± 0.172	1.206 ± 0.046	1.746 ± 0.116	≤ 1.8
Densité	1.0058 ± 0.0053	1.0136 ± 0.0037	1.0469 ± 0.0035	1.034 - 1.030
Matière grasse (g /l)	88 ± 13.2	70 ± 22.6	50 ± 5.48	≥ 34
Matière sèche (%)	12.724 ± 0.860	10.75 ± 1.03	11.708 ± 0.154	/
Cendre (%)	4.732 ± 0.097	7.196 ± 0.697	7.344 ± 0.337	/

- **Acidité titrable :**

L'acidité titrable de lait est la mesure en grammes d'acide lactique par litre de lait. . L'acidité des échantillons varie entre 1.008 ± 0.172, 1.206 ± 0.046 et 1.746 ± 0.116 (g/l), ces valeurs se situent dans la fourchette (≤1.8) à celle reportée par la norme algérienne (décrit, 1993).

- **Densité**

La teneur de la densité est 1.0058 ± 0.0053 et 1.0136 ± 0.0037 chez le lait de caprin et bovin respectivement est faible à [1.034 - 1.030], la plus grande valeur a été observée dans lait de chamelle qui respecte la valeur (1.034) à celle reportée par la norme algérienne (décrit, 1993).

La densité du lait varie en fonction de la concentration des éléments dissous et en suspension (la matière sèche dégraissée) **(RAHLI, 2015).** C'est le contraire dans le cas de lait caprin qui enregistre le taux de matière sèche le plus élevé corrélé à une densité la plus faible.

- **Matière grasse**

Le tableau 10 montre que la matière grasse du lait varie de 88 ± 13.2, 70 ± 22.6, 50 ± 5.48 (g/l) chez le lait de caprin, bovin, camelin respectivement, dont la valeur la plus élevée a été enregistrée dans lait de caprin 88 ± 13.2 g/L. Les valeurs des échantillons apparaissent une conformité à celle rapporté par la norme algérienne (décrit 1993),

RAHLI (2015) a montré qu'il est établi qu'en dehors de la race, le rang de la traite influe sur le taux de matière grasse. En effet, la traite du matin donne un lait relativement pauvre en matière grasse en comparaison avec celui des autres traites, bien que quantitativement plus important

- **Matière sèche**

Les valeurs enregistrées pour les échantillons concernant la teneur en matière sèche dans le lait caprin, bovin et camelin varie entre 10 et 12%. Ces valeurs se situent dans la fourchettes des travaux de **(RAHLI, 2015)**, avec des valeurs se situent entre 98,4 et 119,05 g/L et **(HADDADIN et *al.*, 2008) :** 123 g/L. D'autre part elle diffère de celle rapportée par **(LABIOUI *et al*., 2009)** entre 113 et 121g/l.

Plusieurs auteurs ont montré que la variation de la teneur en extrait sec total était dû à divers facteurs tels que la qualité de l'eau et sa quantité disponible pour les animaux (KHASKHELI *et al*., 2005). En été, la teneur en eau du lait augmente et donc sa matière sèche diminue davantage sous l'effet du stress hydrique. **(HADDADIN *et al*., 2008)** ont trouvé que le taux de matière sèche totale atteignait son maximum en mi- hiver et son minimum en été.

- **Cendre**

La quantité totale de minéraux est généralement exprimée en cendres totales ; le Tab. 10 montre que cette valeur se situe autour de 4 et 7 %. La valeur la plus faible a été enregistrée dans lait de caprin. **AULDIST et al., (1998)** ont reporté que la composition physico-chimique du lait cru dépend essentiellement du stade de lactation, la période de l'année et le régime alimentaire des animaux.

II-2 Isolement et identification des bactéries lactiques

II-2.1 Isolement des bactéries lactiques

A partir des 03 types de lait, nous avons obtenu 9 isolats, distribués par ordre de dominance comme suit : Sur M17 à 30°C (6 isolats, 66.67%) signifié par (S1 à S6) deux souches de chaque type de lait, sur M17 à 45°C (2 isolats, 22.22%) signifié (S7 et S8) a partir de lait de bovin et sur MRS à 30°C (1 isolats, 11.11%) signifié (S9) à lait de bovin.

II-2.2 Identification des isolats

La morphologie des bactéries lactiques est un critère important pour leur identification.

II-2.2.1 Critères morphologique

- ✓ **Observation macroscopique**

Un total de neuf isolats ont été isolées et purifiées sur milieu M17 et MRS sur gélose, les isolats sont apparus de petite taille, de forme circulaire ou lenticulaire, à pourtour régulier et de couleur blanchâtre. Sur bouillant, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques **(Fig.15)**.

- ✓ **Observation microscopique**

Après la coloration de Gram, nous avons passé à l'observation microscopique aux grossissements (G : 10x 100) avec l'huile à immersion, où nous avons pu observer que les bactéries étaient Gram positif apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'associations. L'observation microscopique a montré que la plupart des souches étudiées sont des coccis isolés ou en chainettes. Les 09 souches à Gram positif sont conservées pour l'identification et les tests d'antagonisme **(Fig. 16)**.

Les résultats des tests morphologiques ont montré que toutes les souches possèdent un Gram positif et catalase négative. Le tableau 11 autorise plusieurs remarques.

Tableau 11 : Caractères morphologiques des bactéries lactiques isolées

Groupes	Macro morphologie	Micro Morphologie	T°C
Streptocoques S7 et S8	Colonies rondes de couleur blanche crème	Coccis, diplocoques et en chaînette	42-48
Pediocoques S1, S3, et S5	Colonies Lisses arrondies, grisâtres ou blanchâtres	Coccis en Tétrades	30
Lactocoque S2, S4 et S6	Colonies blanches, rondes ou lenticulaires	Coccis, diplocoques et en chaînette	30
Lactobacilles S9	Petites colonies blanches, rondes	Petits bâtonnets en chaînettes	30

II-2.2.2 Critères biochimique et physiologique

L'analyse de ces résultats a montré que tous les isolats se sont avérés à Gram positif et catalase négative ce qui est caractéristique des bactéries lactiques.

En plus de ces tests basés sur la morphologie des bactéries nous avons utilisé des tests physiologiques et biochimiques pour déterminer le genre et espèce de notre collection. Les résultats de ces tests sont résumés dans le Tableau 12**.**

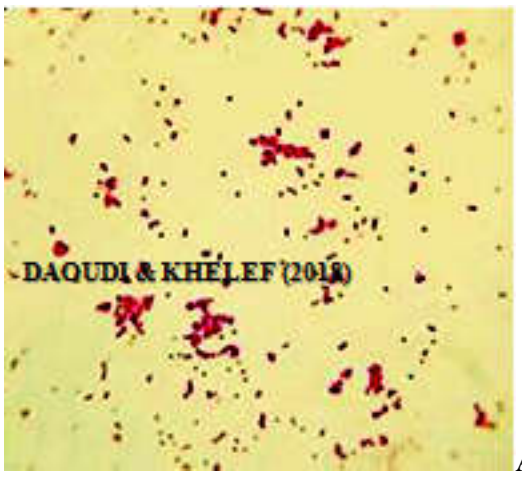
A : Culture de Pediocoques sur le milieu M17 agar

B : Culture de Streptocoque sur le milieu M17 agar

C : Culture de Lactobacilles sur le milieu MRS agar

D : Culture de Lactocoque sur le milieu M17 agar

Figure 15 : Aspect macroscopique des souches lactiques



A

B

Figure 16 : Aspect microscopique des colonies (Gx100); A : Cocci ; B : Bacille

Tableau 12 : Critères biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru

		S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	S_8	S_9
ADH		-	+	-	-	+	-	-	-	-
VP		+	-	+	V	+	-	-	-	-
CIT		+	+	-	-	-	+	+	+	+
H_2S		-	-	-	+	+	-	-	-	-
IND		-	-	-	-	-	-	+	+	+
GAZ		-	-	-	-	-	-	V	+	_
RES		v	-	-	-	+	v	V	V	-
T°	40°C	-	-	V	-	-	-	+	+	
	45°C	-	-	-	-	-	v	+	+	-
PH	4.2	-	-	-	-	-	-			
	4.5							-	-	-
	4.8	-	-	-	-	+	-			
	6.5		+		+		+	-	+	+
	7	+	+	+	+	+	+			
	8	+	+	+	+	+	+			
NaCl	2%	+	+	+	+	+	+	+	V	+
	3%	v	V	+	-	+	+			
	4%	V	-	+	-	+	v	+	-	+
	6.5%	-	-	+	-	+	+			
CARBOHYDRATES	GLU	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	MAN	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	RHA	+	-	+	+	+	-	+	+	+
	SAC	+	-	+	+	+	-	-	-	+
	MEL	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	Amy	+	-	+	+	+	-	-	-	+
	ARA	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	LAC	+	+	+	+	-	-	-	+	-
	INO	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	SOR	-	-	+	+	+	-	+	+	+

+: plus de 90 % de réactions positives. - : moins de 10% de réactions positives .V : plus de 10% et moins de 90% de réactions positives. ADH : production de l'arginine dihydrolase. VP : production d'acétone. CTR :

dégradation de citrate. RES : thermorésistante à 63,5 °C pendant 30 min. GAZ : production de gaz à partir du glucose.

Les résultats d'identification des 09 isolats au stade espèce sont représentés dans le tableau 6. La répartition des 06 espèces présumées identifiées est présentée en fonction du genre.

✓ **Genre *Lactococcus***

03 isolats homofermentaire présentent des Colonies blanches, rondes ou lenticulaires, ne développent pas à 45°C. La distinction des espèces est basée sur l'hydrolyse de l'arginine, la production d'actéoïne, la présence du citratase, la croissance à 4 et 6.5% de NaCl et à pH 8. D'après les résultats obtenus, les espèces suivantes ont été déterminées :

S2 : hydrolyse l'arginine, ne produise de l'actéoïne, pas résistent à 4% de NaCl et peuvent croitre à pH 8. Fermente différemment certains sucres (mannose, glucose, mélibiose, arabinose et lactose), elle est pré-identifiée à ***Lactococcus lactis subsp. lactis***

S4 : produise de l'actéoïne et pas hydrolyse l'arginine, pas résiste à 4% de NaCl et peuvent croitre à Ph 6.5 rapidement et 7,8. Fermente différemment certains sucres (glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, mélibiose, lactose, amygdalin, arabinose), elle est pré-identifiée à ***Lactococcus lactis subsp. Cremoris.***

S6 : peut étre ***Lactococcus sp,*** capable de croitre à ph 8, résiste à 4% de NaCl, ne produise de l'actéoïne et pas hydrolyse l'arginine, fermente très peu de carbohydrates.

✓ **Genre *Pediococcus***

03 isolats homofermentaire présentent des Colonies Lisses arrondies, grisâtres ou blanchâtres, ne développent pas à 45°C. La distinction des espèces est basée sur l'hydrolyse de l'arginine, la production d'actéoïne, la présence du citratase, la croissance à 4 et 6.5% de NaCl et à pH 4.2, 4.8, 7.0 et 8. D'après les résultats obtenus, les espèces suivantes ont été déterminées :

S5 : hydrolyse de l'arginine, produise de l'actéoïne, résistent à 6.5 % de NaCl et peuvent croitre à Ph4.2 et 8. Fermente différemment certains sucres (glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, mélibiose, amygdalin, arabinose), elle est pré-identifiée à ***Pediococcus acidilactici.***

✓ **Genre *Streptococcus***

Sur les 02 isolats, identifiés au genre *Streptococcus ,* Colonies rondes de couleur blanche crème hétérofermentaire facultatif, une a été rattaché au ***Streptococcus thermophilus* (S8)**, capables de croître à pH 6.5 rapidement et lentement à pH 4.5 et 4.8, thermorésistants, ne produise pas d'acetoîne et ne hydrolyse pas l'arginine, fermente différemment certains sucres (glucose, mannitol, rhamnose, saccharose, mélibiose, arabinose).

✓ **Genre *Lactobacillus***

Une seule espèce isolée a été rattaché au ***Lactobacillus amylophilus* (S9)**, petites colonies blanches et rondes, ne produise pas d'acetoîne et ne hydrolyse pas de l'arginine, résiste à 4% de NaCl et fermente différemmenr certains sucres (glucose, mannitol, sorbitol, rhamnose, saccharose, mélibiose, , amygdalin, arabinose).

D'une part, les analyses ont montré que toutes les bactéries lactiques sont des bactéries homofermentaires à l'exception d'une seule souche hétérofermentaire identifiée comme *Streptococcus thermophilus.* D'autre part, ces souches sont également, toutes capables de croître à à pH 6,5 et en présence de 2% de NaCl. La majorité des souches fermentent le glucose tandis que la fermentation des autres sucres est variable d'une espèce à l'autre. L'identification phénotypique des bactéries lactiques retenues permet d'avancer qu'il existe une biodiversité intéressante.

Nos résultat d'identification est accort avec **(BADIS & KIHAL., 2005)** selon les critères biochimique et physiologique et **(ENNADIR *et al*., 2014)** selon la fermentation du sucre pour *Lactococcus lactis subsp lactis*

II-3 Etude de l'aptitude technologique des bactéries lactiques isolées

II-3.1 La diminution du pH par les bactéries lactiques

La mesure des pH initial et final montre une diminution du pH dans le milieu contenant les souches lactiques isolées. Cette diminution est indiquée dans le tableau 13

Tableau 13 : Diminution de PH de milieu par les bactéries lactiques

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
pH i	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	7
pH f	5.42	5.68	5.35	4.94	5.08	4.98	4.87	5.41	4.35

L'abaissement du pH dans les milieux MRS et M17 liquides signifie que chacune des souches lactique possède un effet acidifiant, en produisant des acides organiques, les principaux facteurs d'inhibition. La production d'acides organiques à pour effet l'inhibition de la croissance des souches pathogènes qui ne peuvent pas survivre à pH bas.

II-3.2 Activité antagoniste des bactéries lactiques

Les souches isolées du lait cru ont été testées pour leur capacité à inhiber les bactéries pathogènes. Les résultats de l'interaction obtenue, révèlent la présence d'une zone claire au tour des souches des bactéries lactiques de nos collections ensemencées en puits.

Les résultats de l'interaction entre les souches lactiques et les bactéries pathogènes : *Listeria innocua clip* ATCC 74915, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**,** *Klebseilla pneumoniae* ATCC 700603 et *Salmonella sp* sont mentionnés dans la Fig.17 et Tab. 14.

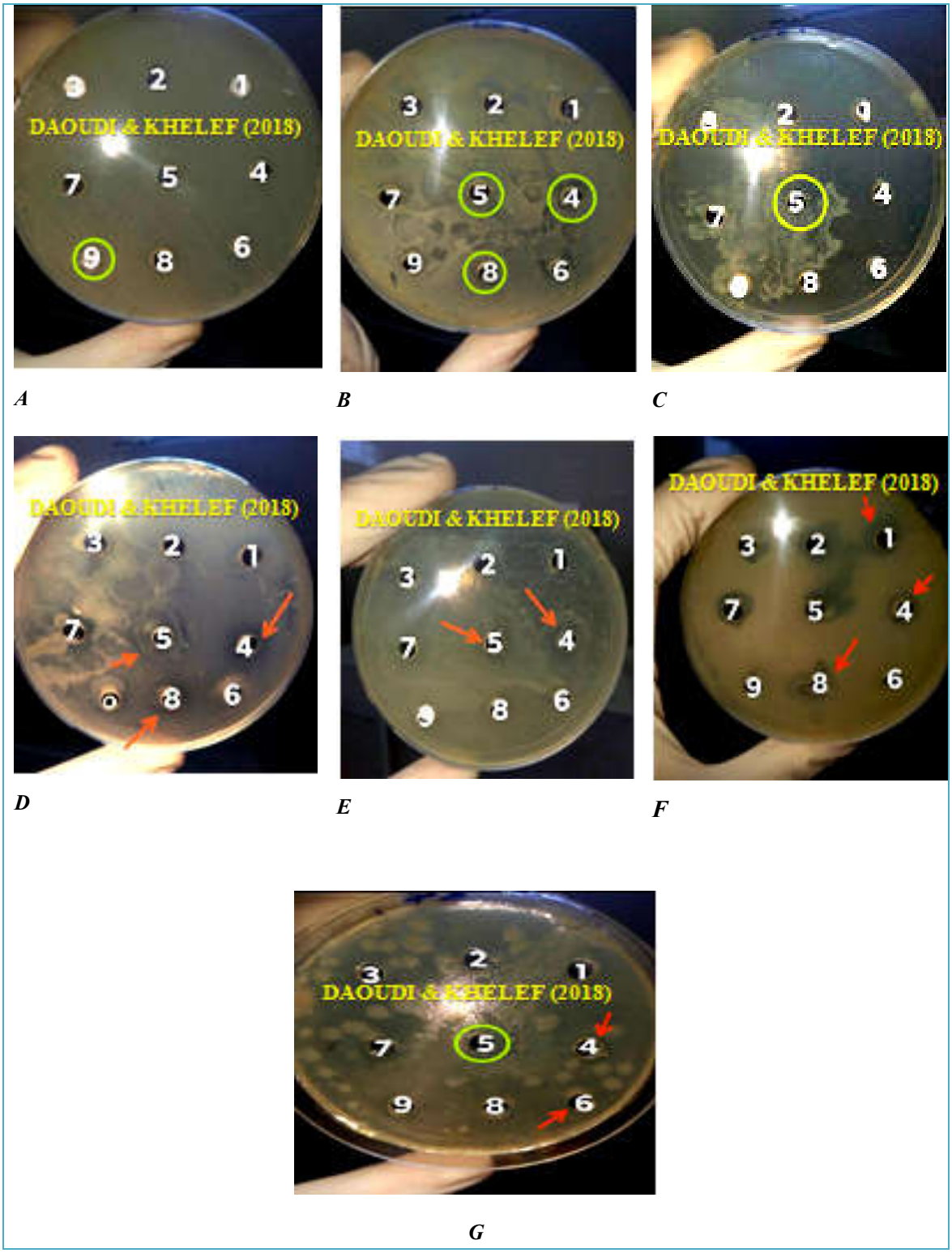


Figure 17 : Inhibitions obtenues contre ***A*****:** *Listeria innocua clip*, ***B*** **:** *Pseudomonas aeruginosa* , ***C*****:** *Klebseilla pneumoniae*, ***D*****:** *Escherichia coli* , ***E*** : *Salmonella sp*,

F**:** *Bacillus cereus*, ***G:*** *Staphylococcus aureus*

Tableau 14 : Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques

Souches		Spectre d'activité							% D'inhibition
Indicatrices / Inhibitrices		*E.C*	*St.*	*Lis*	*Ps.*	*Sa.*	*Kl.*	*Ba.*	
Lait de caprin	***S1***	+	+	+	-	+	-	+++	71.42
	***Lac. lactis subsp.lactis* (S2)**	-	++	+	+	++	++	++	85.71
Lait de bovin	***S3***	-	+	-	-	+	-	+	42.85
	***Lac. lactis subsp. Cremoris* (S4)**	++	++	+	++	++	++	++	100
	***Str. Sp* (S7)**	+	++	-	+	-	-	+	57.14
	***Str. Thermophilus* (S8)**	++	+	+	++	+	+	+++	100
	***Lb. Amylophilus* (S9)**	+	+++	+++	+	-	+	++	85.71
Lait de chamelle	***Pediococcus acidilactici* (S5)**	++	+++	++	+	++	+++	+++	100
	***Lactococcus sp* (S6)**	++	++	++	+	-	+	+	85.71

- : Absence, **+ :** faible, **++ :** modéré, ***Lac* :** *Lactococcus*, ***Str:*** *Streptococcus*, ***Lb :*** *Lactobacillus*, ***EC:*** *Escherichia coli*, ***ST:*** *Staphylococcus Aureus*, ***Lis*** *:Listeria innocua clip*, ***Pse:*** *Pseudomonas aeruginosa*, ***Sal :*** *Salmonella*, ***Kl:*** *Klebseilla pneumoniae*, ***Ba :*** *Bacillus cereus*

D'après ces résultats, la majorité des souches présentent une activité inhibitrice, plus ou moins prononcée, sur toutes les bactéries pathogènes.

Ces résultats indiquent que nos bactéries lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne. L'ensemble des souches ne présente pas le même spectre d'action vis-à-vis des bactéries pathogènes. La majorité des souches sont actives sur les bactéries à gram positif mais pas tous sur les bactéries à gram négatif.

Sur la base des résultats obtenus, il s'avère que tous les isolats possèdent une activité antibactérienne contre ***Staphylococcus*** et ***Bacillus*** avec spectre d'action variant. Cependant une absence d'inhibition est remarquée avec quelques souches lactiques vis-à-vis les bactéries gram négative. Il faut signaler également que la plus forte activité antibactérienne est observée chez ***Pediococcus acidilactici*** **(S5)** contre les bactéries pathogènes.

Nos résultats se rapprochent de ceux cités par plusieurs études menées dans le même contexte que le notre et réalisées sur des produits laitiers tels que les laits crus, les fromages et les yaourts (**BADIS *et al*., 2005 ; BEKHOUCHE & BOULAHROUF, 2005)**.

Les souches productrices S4, S5 et S8 ont un large spectre d'activité contre toutes les souches indicatrices utilisées.

L'activité antibactérienne des souches lactiques peut être due à la production de plusieurs agents antibactériens. L'acide lactique et l'acidification du milieu inhibent plusieurs types de bactéries. Aussi, ces souches produisent le diacétyle, qui possède aussi un pouvoir d'inhibition. L'H_2O_2, libéré par les souches lactiques inhibe les bactéries qui ne possèdent pas des défenses contre le stress oxydatif (la catalase, par exemple) **(MENAD, 2017)**.

II-4 Effet antagoniste de bactériocine

II-4.1 Activité antibactérienne

La bactériocine purifiée a été utilisée pour démontrer leur activité antimicrobienne contre les souches indicatrice et le résultat a montré qu'il a augmenté l'activité contre les bactéries y compris Gram positif utilisés (Fig.18).

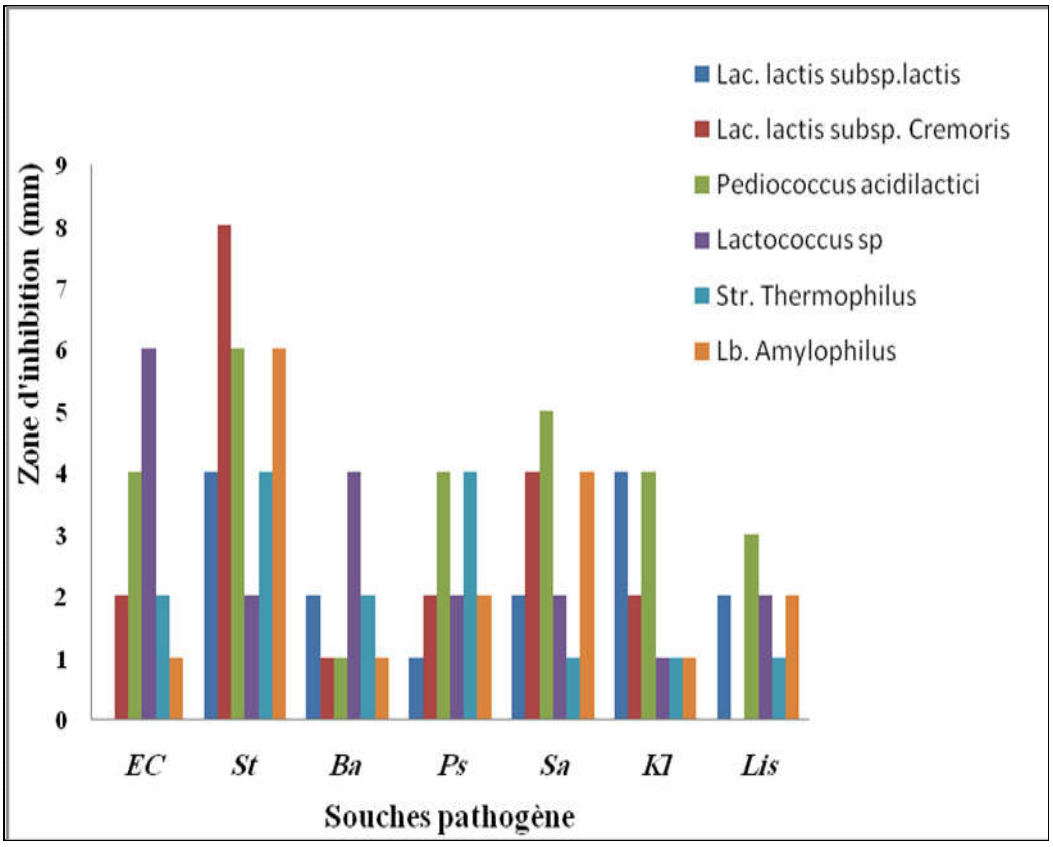


Figure 18: Effet de bactériocine produit par les bactéries lactiques contre les souches pathogènes

Sept souches bactériennes sont utilisées comme souches indicatrices afin d'établir un spectre d'activité préliminaire des différents extraits actifs et permettre le choix de la souche indicatrice sensible qui servira pour les tests ultérieures.

- ***Escherichia coli***

La meilleure zone d'inhibition (6 mm de diamètre) a été observée pour la bactériocine de la bactérie productrice *lactococcus sp* (S6) contre *Escherichia coli*, tandis que la plus petite avec un diamètre de (1 mm) étant observée pour la bactériocine de la souche *Lb amylophilus* (S9).

On peut dire que la bactérie indicatrice *Escherichia coli* est plus sensible à la bactériocine de la bactérie productrice *lactococcus sp*, et aucune sensibilité à la bactériocine de *Lactococcus lactis subsp. Lactis.*

La bactériocine produite par l'espère *Lactococcus lactis subsp. Lactis.*est pré-identifiée comme la nisin (La nisine a présenté une activité antibactérienne vis-à-vis de toutes les pathogènes à gram positif. Aucune inhibition n'a été observée avec *E. coli* (gram négatif). Ces résultats corroborent parfaitement avec les résultats obtenus par **BOULLOUF (2016).**

- ***Staphylococcus aureus***

La plus grande inhibition (8mm) à été remarqué pour la bactériocine de la souche *Lac. lactis subsp. Cremoris* (S4) contre *Staphylococcus aureus*, tandis que la plus petite avec un diamètre de (2 mm) étant observée pour la bactériocine de la souche *lactococcus sp.*

On peut dire que la bactérie indicatrice *Staphylococcus aureus* est plus sensible à la bactériocine de la bactérie productrice *Lac. lactis subsp. Cremoris* et *Lb amylophilus*.

Ces résultats corroborent t avec les résultats obtenus par **(MAMI *et al*., 2010)**.

- ***Bacillus cereus***

La meilleure zone d'inhibition (4 mm de diamètre) a été observée pour la bactériocine de la bactérie productrice *lactococcus sp* (S6) contre *Bacillus cereus*, tandis que la plus petite avec un diamètre de (1 mm) étant observée pour les bactériocines de les souches *Lac. lactis subsp. Cremoris*, *Pediococcus acidilactici et Lb amylophilus*.

On peut dire que la bactérie indicatrice *Bacillus cereus* est plus sensible à la bactériocine de la bactérie productrice *lactococcus sp*.

- ***Pseudomonas aeruginosa***

La plus grande inhibition (4mm) à été remarqué pour la bactériocine de la souche *Str. Thermophilus et Pediococcus acidilactici* contre *Pseudomonas aeruginosa*, tandis que la plus petite avec un diamètre de (1mm) étant observée pour la bactériocine de la bactérie productrice *Lactococcus lactis subsp. Lactis.*

On peut dire que la bactérie indicatrice *Pseudomonas aeruginosa* est sensible à la bactériocine de la bactérie productrice *St. thermophilus et Pediococcus acidilactici*.

- ***Salmonella sp***

La meilleure zone d'inhibition (5 mm de diamètre) a été observée pour la bactériocine de la bactérie productrice *Pediococcus acidilactici* contre *Salmonella sp*, tandis que la plus petite avec un diamètre de (1 mm) étant observée pour la bactériocine la souche *Str. thermophilus*.

On peut dire que la bactérie indicatrice *Salmonella sp* est sensible à la bactériocine de la bactérie productrice *Pediococcus acidilactici*.

Nos résultats se rapprochent de ceux cités par **(MENAD, 2017)**.

- ***Klebseilla pneumoniae***

La plus forte inhibition (4mm) à été remarqué pour la bactériocine de la souche *Lactococcus lactis subsp. et Pediococcus acidilactici* contre *Klebseilla pneumoniae*, tandis que la plus petite avec un diamètre de (1 mm) étant observée pour les bactériocines de les souches *lactococcus sp* , *Str. Thermophilus* et *Lb amylophilus.*

On peut dire que la bactérie indicatrice *Klebseilla pneumoniae* est sensible à la bactériocine de la bactérie productrice *Lactococcus lactis subsp. et Pediococcus acidilactici*.

- ***Listeria innocua clip***

La meilleure zone d'inhibition (3 mm de diamètre) a été observée pour la bactériocine de la bactérie productrice *Pediococcus acidilactici* contre *Listeria innocua clip*, tandis que la plus petite avec un diamètre de (1 mm) étant observée pour la bactériocine de la souche *Str. Thermophilus* .

On peut dire que la bactérie indicatrice *Listeria innocua clip* est plus sensible à la bactériocine de la bactérie productrice *Pediococcus acidilactici*, et aucune sensibilité à la bactériocine de *Lac. lactis subsp. Cremoris*.

Cependant, plusieurs auteurs, ont pu caractériser, dans la même niche, et en utilisant la même méthode d'activité antibactérienne, des bactériocines produites par les deux genres, *Lactococcus* et *Lactobacillus*, et actives contre les bactéries du genre *Listéria* **(CHERGUI , 2014)**.

Ceci suggère que les propriétés de LAB permettent de réduire le nombre d'autres micro-organismes indésirables dans les produits laitiers ainsi d'effectuer un rôle essentiel dans la préservation de produits destinés à la consommation humaine **(MAGHNIA, 2011).**

II-4.2 Dosage protéique (bactériocine).

D'après la loi de Warburg et Christian la concentration de bactériocine est comme suit :

Tableau 15 : Présentation de la concentration de bactériocine

Bactériocine / Concentration	B2	B4	B6	B8	B9
[ ] mg/ml	1.44	0.66	1.09	1.56	1.75

B2 :par *Lac. lactis subsp. Cremoris ;* **B4 :** par *Lac. lactis subsp. Cremoris;* **B6:** par *Lactococcus sp ;* **B8 :** par *Str. Thermophilus* ; B9 : par *Lb. Amylophilus*

II-4.3 Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration qui inhibe toute croissance visible d'un microorganisme après 24 heures d'incubation dans un milieu de croissance spécifique, ils sont variables selon les espèces bactériennes et les souches **(MENAD, 2017)**.

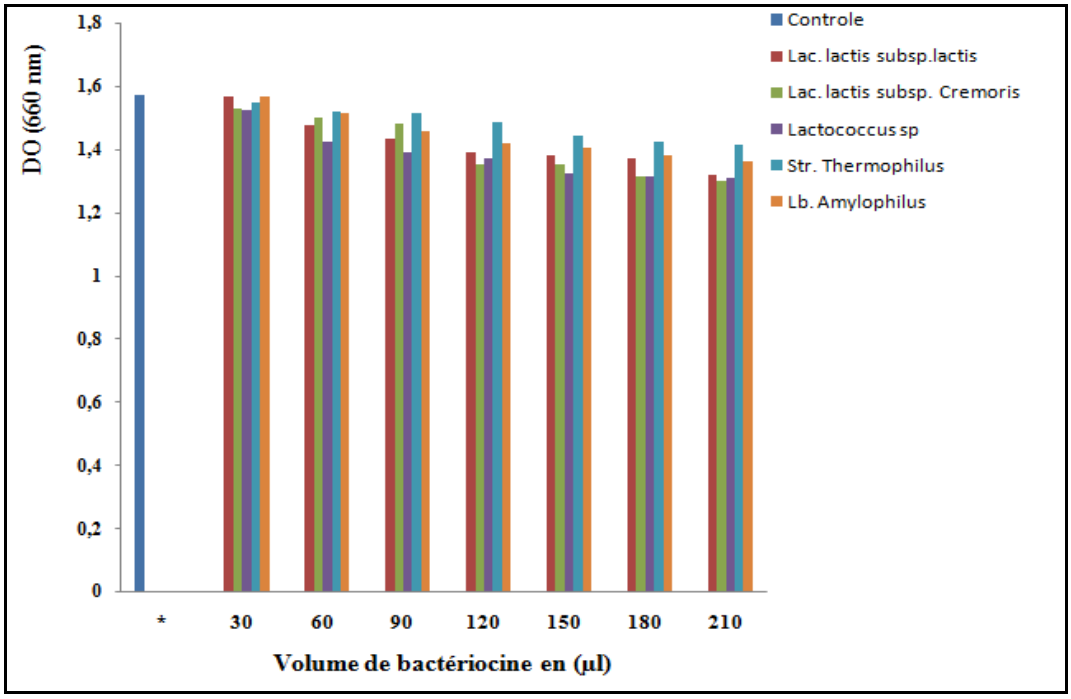


Figure 19: Densité optique de *Staphylococcus aureus* après traitement par les bactériocines produites par les bactéries lactiques

Ceci suggère que les propriétés de LAB fonctionnement permettent de réduire le nombre d'autres micro- organismes indésirables dans les produits laitiers ainsi d'effectuer un rôle essentiel dans la préservation de produits destinés à la consommation humaine **(MAGHNIA, 2011).**

Les résultats obtenus sont très différents et présentent une inhibition contre la souche pathogène *Staphylococcus aureus*. On remarque que cette inhibition est très faible à cause de la faible concentration de bactériocine par rapport au concentration de bactéries pathogènes.

Par contre **MENAD(2017)** montre que les souches *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ont une inhibition totale de la souche pathogène (*Staphylococcus aureus*) mais pour les autres dilutions (*Lactococcus lactis* subsp *cremoris*) on a noté que l'effet inhibiteur est nul alors que les dilutions (*Lactobacillus plantarum*) ont un effet d'inhibition faible.

Conclusion

&

Perspectives

Conclusion

L'exploitation du potentiel biologique des espèces bactériennes revêt un intérêt important, ainsi les nouvelles démarches consistent à s'intéresser à la recherche des peptides bioactifs dans la partie extracellulaire d'origines bactériennes.

Notre travail a porté sur des bactéries lactiques de différents genres, neuf bactéries ont été isolées à partir du lait cru.

La première étape de cette étude consiste en l'obtention d'un groupe de souches de bactéries lactiques représentant une activités antibactériennes qui peuvent jouer le rôle de flore de barrière à l'encontre des bactéries pathogènes et qui peuvent participer à la conservation du lait ou produits laitières en produisant des substances susceptibles d'inhiber les bactéries responsables de son altération, suivi par purification de la bactériocine des souches isolées et détermination du leur spectre d'activité.

Après l'isolement, purification et l'identification biochimique des 6 espèces étudiées (*Lactococcus lactis* subsp *lactis, Lactococcus lactis* subsp *cremoris,Str. Thermophilus,Lb. Amylophilus, Pediococcus acidilactici, Lactococcus sp*), Il est à noter que l'identification phénotypique basée sur les caractères morphologiques et biochimiques est très limitée.

Le test de l'antagonisme à montré l'effet inhibiteur de nos souches vis à vis des souches cibles. Nous avons montré que la plupart des souches lactiques étaient productrices d'agents inhibiteurs contre les germes pathogènes.

Les résultats obtenus ont montré que la souche de ***Pediococcus acidilactici*** présentait des effets antibactériens plus prononcés que les autres souches.

L'activité des bactériocines purifiées testée sur le milieu solide et en liquide montre des spectres d'activité plus au moins larges incluant, pour certains peptides, des bactéries pathogènes à Gram positif telles que *S.aureus*, *B.cereus* et *Linnocua clip* et même à Gram négatif telles que *Salmonelle* et *E.coli*. La bactériocine produit par la souche de ***Pediococcus acidilactici*** a le plus large spectre d'activité contre toutes les bactéries pathogènes utilisées.

Bien que les études CMI de la bactériocine sur les pathogènes humains n'aient pas montré de rapport consolidé, les résultats ont été encourageants.

Les résultats de l'étude actuelle ont révélé que la souche ***Staphylococcus Aureus*** était sensible à la bactériocine et a montré une réponse à sa concentration. Les résultats préliminaires, relativement encourageant ouvre la voie vers l'optimisation des protocoles, l'étude de la reproductibilité et les essais avec d'autres matrices alimentaires.

A la suite de ce travail, nous envisageons les perspectives suivantes :

- ✓ Identification moléculaire est très essentielle pour mieux identifier les isolats ; Caractérisation physico-chimique partielle de l'activité protéolytique

- ✓ Purification des bactériocines par les techniques d'analyses fines : chromatographie d'exclusion moléculaire, chromatographie d'échange d'ions, chromatographie d'interactions hydrophobes, HPLC et d'étude structurale par la spectroscopie de masse et la RMN ;

- ✓ Etude de la stabilité des molécules dans les conditions industrielles : pH, température.....etc. Ainsi que l'optimisation du rendement de productivité des souches sélectionnées.

- ✓ Etude de l'activité antimicrobienne de l'ensemble des bactériocines identifiées contre un panel plus large de microorganismes (bactéries et champignons).

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABABSA, A. (2012). *Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait.* Mémoire magister Génie microbiologique non publiée, Université de Setif, Setif.
- ALEXANDER,Y., PROSEKOV, O., BABICH, S.,& MILENTEVA ,I.(2017). Development of recombinant peptide technology with antimicrobial properties of a broad action spectrum. *Science Evolution*, 2(2), 4-15.
- ALVAREZ-SIEIRO, P., MONTALBAN LOPEZ, M., MU, D., &KUIPERS,O.(2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939–2951.
- BADIS, A., LAOUABDIA, S., 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". *Sciences & Technologie*, 23, 30-37.
- BAINDARA, P.,GAUTAM, A., RAGHAVA, G., & KORPOLE, S. (2017). Anticancer properties of adefensin like class IId bacteriocin Latero sporulin 10. *Scientific Reports*,7,1-9.
- BARBOSA, M., TODOROV, S. , IVANOVA,I., CHOBERT, J., HAERTL,T., & MELO FRANCO, B. (2015). Improving safety of salami by application of bacteriocins produced byan autochthonous Lactobacillus curvatus isolate. *Food Microbiology* ,46, 254-262.
- BARBOSA, M., TODOROV, S., IVANOVA, I., BELGUESMIA,Y., CHOISET,Y., RABESONA, H.,CHOBERT, J., HAERTL, T., FRANCO, B. (2015). Characterization of a two-peptide plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolated from Brazilian salami. *Food Control*,60, 103-112.
- BASTOS, M., COELHO, M., & SANTOS, O. (2015). Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 161, 683–700.
- BATDORJ, B., DALGALARRONDO, M.,CHOISET,Y., PEDROCHE, J., METRO, F., PREVOST, H.,CHOBERT, M., & HAERTLE, T.(2005). Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolianairag. *Journal of AppliedMicrobiology,*101(4),837–848.

- BEHRENS, H., SIX, A., WALKER, D., & KLEANTHOUS, C. (2017). The therapeutic potential of bacteriocins as protein antibiotics. *Emerging Topics in Life Sciences*,1, 65–74.
- BEKHOUCHE, F.(2006). *Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase.* Thèse doctorat Génie alimentairenon publiée,Université de Constantine,Constantine.
- BELARBI, F.(2011). *Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes*. Thèse magister microbiologie non publiée, Université d'Oran , Oran.
- BELLIL,Y.(2013). Evaluation de l'effet des substances antimicrobiennes produite par *Leuconostoc mesenteroides* du lait cru de chamelle sur listeria spp.. Thèse magister microbiologie non publiée, Université d'Oran , Oran.
- BEN LAGHA, A., HAAS, B., GOTTSCHALK, M., & GRENIER, D. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocinsin poultry and swine production. Veterinary research, 48(22),1-12.
- BENMOUNA, Z. (2012). *Bactériocine des bactéries lactiques: étude biochimique et génétique*. Thèse magister en biotechnologie non publiée, Université d'Oran, Oran.
- BHARTI,V., MEHTA, A., SINGH, S., JAIN, N., AHIRWAL, l., & MEHTA, S..(2015). Bacteriocin: Anovel approach for preservation of food. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*,7(9),20-29.
- BOULLOUF, A.(2016). *Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries*
- BOUMEDIENE, K. (2013). *Recherche des bactéries lactiques productrices des bactériocines et l'étude de leur effet sur des bactéries néfastes*.Thèsemagister microbiologienon publiée, Université Tlemcen ,Tlemcen .
- BOUZAID, M., CHATOUI, R., LATRACHE, H., & HASIB, A. (2016). Activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées de viande hachée de dromadaire et du lait cru de vache (Maroc). *Microbiol. Ind. San et Environn,*10(1), 1-12.
- BRAHIMI, S. (2015). *Isolement et caractérisation biotechnologiques des bactéries lactiques isolée à partir des margines d'olives « AMOREDJ » fermentés.* Thèse magister Biodiversité des micro-organismesnon publiée, Université d'Oran, Oran.

- CASTELLANO, P., IBARRECHE, M., MASSANI, M. , FONTANA,C., &VIGNOLO, G. (2017). Strategies for Pathogen Biocontrol Using Lactic Acid Bacteria and Their Metabolites: A Focus on Meat Ecosystems and Industrial Environments. *Microorganisms*, 5(38),1-25.
- CHENTOUF, H.(2015). *Effet des substances antimicrobiennes produites par leuconostoc mesenteroides isolées à partie du lait de chamelle Algérien sur Listeria spp. dans les produits alimentaires*.Thèse doctorat microbiologienon publiée, Université d'Oran, Oran.
- CHERGUI, A. (2014).*Caractérisation de bactériocines anti-listeria produites pardes souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle.*Thèse magisterBiochimie appliquéenon publiée, Université de TiziOuzou, TiziOuzou.
- CHIKINDAS, M., WEEKS, R., DRIDERD.، CHISTYAKOV, V., & DICKS, L. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, 49,23–28.
- CORRIEU,G., LUQUET F., 2008- Bactéries lactiques de la génétique aux ferments.Ed. TEC & Doc Lavoisier. paris.823p.
- DESALEGN, D.(2017). Bacteriocin as an advanced technology in food industry. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4(12), 178-190.
- DJADOUNI, F.(2013). *Evolution de l'activité antimicrobienne des isolats des bactéries lactiques et détermination des spectres d'action de leurs biopeptides vis-à-vis des germes d'altération*. Thèse doctorat microbiologienon publiée, Université d'Oran, Oran.
- DORTI, C., (2008). *Isolement une bactéries lactiques produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires.*Thèse doctorat en Sciences agronomiques non publiée, Université de Gembloux, Belgique.
- DUHAN, J., NEHRA, K., GAHLAWAT, S., SAHARAN, P., & SUREKHA, d. (2013). Bacteriocins from lactic acid bacteria. Biotechnology: *Prospects and Applications*,1, 127-142.
- DÜNDAR, H.(2006).*Characterization and purification of a bacteriocin produced by leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris.* Thèse doctorat en biotechnologie non publiée, Middle east technical university, turque .

- ELAYARAJA, S., ANNAMALAI, N., MAYAVU, P., & BALASUBRAMANIAN, T. (2014). Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(1),305-311.
- ESRA, D., & GAMZE, B.. (2017). Screening of Bacteriocin Production in Lactic AcidBacteria Isolated From Fermented Dairy Products. *Biotechnology Journal International,*18(2), 1-9.
- ESTHER IZQUIRDO, A.(2009). Les proteines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse doctorat chimie analytiques non publiée, université de STRASBOURG, STRASBOURG.
- GHADBANE, M. (2014). *Microflore rhizosphérique de quelques Fabacées (légumineuses) endémiques dans les régions de Boussaâdaet de Biskra (Algérie).*Thèse doctorat en biologie végétale non publiée, Université de Sétif, Sétif.
- GHEQUIRE, M., BUCHANAN, S., DE MOTA, R. (2018).The ColM Family, Polymorphic Toxins Breaching the Bacterial Cell Wall. *American Society for Microbiology*, 9(1),1-11.
- GONZALEZ-PEREZ, C., AISPURO-HERNANDEZ, E., VARGAS-ARISPURO, I., & MARTINEZ-TELLEZ, M. (2018). Induction of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria; A Strategy to Improve the Safety of Fresh Fruits and Vegetables. Agricultural Research & Technology: Open Access Journal, 14(4),1-5.
- Gulf Technical subcommittee for Food additives and contaminants. *NISIN USED IN FOOD PRODUCTS*. Ed. GSO Standar (2016). 8P
- HADDADIN M.S.Y., GAMMOH S.I., & ROBINSON R.K., (2008). Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan. Journal of Dairy Research 75 (1), p. 8-12.
- HAMMI, I.(2016). *Isolement et caractérisation de bactériocines produites par des souches de bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocaines et de différentes variétés de fromage français.* Thèse doctorat chimie analytique non publiée, Université de Strasbourg, Strasbourg.
- HANAFYA, A., AL-MUTAIRIB, A., AL-REEDYC, R., & AL-GARNIBA, S.(2016). Phylogenetic affiliations of *Bacillus amylolique faciens* isolates produced by a

bacteriocin-like substance in goat milk. *Journal of Taibah University for Science*, 10, 631-641.

- HANSAL, N.(2015). *Isolement, purification, identification et étude des caractéristiques biotechnologiques de leuconostoc mesenteroides isolé à partir du lait cru de chèvre et de chamelle*. Thèse magister microbiologienon publiée, Université d'Oran, Oran.
- JAYACHITRA, J., & SIVAKUMAR, K. (2018). Antimicrobial activity of bacteriocin from lactic acid bacteria against food borne bacterial pathogens. *International Journal of Current Research in Life Sciences*,7(4),1528-1532 .
- JOA N° 54/2013 : Journal Officiel Algérien Arrêté du 17 décembre 2013 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en matière sèche dans le lait
- KHASKHELI, M., ARAIN.M.A., CHAUDHRY, S., SOOMRO, A. H., & QURESHI, T. A. (2005). Physico-chemical quality of camel milk. J of Agr and Social Sciences, 2:164-66.
- KHOCHAMIT, N., SIRIPORNADULSIL, S., SUKONB, P., & SIRIPORNADULSIL,W. (2014). Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: Potential as a probiotic strain. *Microbiological Research* ,170,36–50.
- KONDROTIENE, K., KASNAUSKYTE, N., SERNIENE, L., GOLZ, C.، ALTER,T., KASKONIENE,V., MARUSKA, A., & MALAKAUSKAS, M. (2018). Characterization and application of newly isolated nisin producing *Lactococcus lactis* strains for control of *Listeria monocytogenes* growth in fresh cheese. *Food Science and Technology* ,87, 507-514.
- KYRIAKOU, P., EKBLAD, B., KRISTIANSEN, B., & KAZNESSIS,Y. (2016). Interactions of a class IIb bacteriocin with a model lipid bilayer، investigated through molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 824-835.
- LABIOUI, H., ELMOUALDI, L., BENZAKOUR, A., EL YACHIOUI, M., , BERNY, E., & OUHSSINE,M.. (2009). Etude physicochimique et microbiologique de laits crus. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.*7-16.
- BOULLOUF, A.(2016). *Etude du pouvoir technologique de quelques bactéries lactiques du fromage traditionnel « Bouhezza »*. Thèse magister En sciences alimentaires non publiée, Université de CONSTANTINE, CONSTANTINE.

- LAFUENTE-RINCON, D.,VELASQUEZ CHAVEZ, T., & DE LA FUENTE-SALCIDO, N.. (2016). Bacteriocins of Gram-positive bacteria: Features and biotherapeutic approach. *African Journal of Microbiology Research*,1873-1879.
- LAIRINI, S., BEQQALI, N., BOUSLAMTI, R., BELKHOU, R., & ZERROUQ, F.(2014). Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnel Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. *Afrique SCIENCE,* 10(4), 267-277.
- LEFEVRE, M., RACEDO, S., DENAYROLLES, M., RIPERT,G., DESFOUGÈRES,T., LOBACH, A., SIMON, R., PELERIN, F., JÜSTEN, P., & URDACI, M.(2017). Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic inhumans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*,83,54-65.
- LEKSIR, C. (2012).Caractérisation et contrôle de la qualité deferments lactiques utilisés dans l'industrie laitière algérienne. Thèse magister En sciences alimentaires non publiée, Université de CONSTANTINE, CONSTANTINE.
- LEONARD, l. (2013). *Evaluation du potentiel bioprotecteur de bacteries Lactiques confinees dans une matrice polymerique.* Thèse doctorat Sciences de l'Alimentation non publiée, Université de Bourgogne,France.
- LUNDSTRÖM,S.(2012).*Characterization of a Bacillus licheniformis gene cluster required for functional expression of a bacteriocin.* Thèse doctorat Bacterial Gene Technology non publiée, Université COPENHAGEN, COPENHAGEN.
- MAGHNIA, D. (2011). *Etude de potentiel technologique des bactéries lactiques isolées des aliments fermentes traditionnels Algériens*. Thèse magister microbiologie non publiée, Université d'Oran , Oran.
- MAKHLOUFI , K. (2011*).Caractérisation d'une bactériocine produite parune bactérie lactique Leuconostoc pseudomesenteroides isolée du boza.* Thèse doctorat microbiologie, biochimie non publiée, Université pierre et marie curie paris, Paris.
- MAMECHE,A.(2008). *Purification et caractérisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones isolées.* Thèse doctorat science alimentaires non publiée, Université d'Alger, Alger.
- MAMI, A., HAMEDI, AM, HENNI, J., KERFOUF, A., & KIHAL, M. (2010). Activité Anti-Bactérienne de Lactobacillus plantarum isolée du lait cru de chèvre

d'Algérie vis à vis de *Staphylococcus aureus*.*les technologies de laboratoire*, 5(21), 26-33.

- MARTINEZ, B., RODRIGUEZ, A., & SUAREZ, E. (2016). Antimicrobial Peptides Produced by Bacteria: The Bacteriocins. *New Weapons to Control Bacterial Growth*,8,15-38.
- MATAMOROS, S. (2008).*Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid.*Thèse doctorat Microbiologie non publiée, Université de Université de Nantes, Nantes.
- MDUDUZI, P.(2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, 22, 2-13.
- MENAD ,N.(2017). *Effet antagoniste des bactéries lactiques isolées à partir du lait de vache vis-à-vis de Salmonella sp*.Thèse doctorat Microbiologienon publiée, Université de Mostaganem, Mostaganem.
- NARENDRAKUMAR, G., SRI GAJANI,V., & PREETHI THOZHIKATU,V.(2017). Isolation and Characterization of Bacteriocins like Antimicrobial Compound from *Lactobacillus delbrueckii subsplactis*. *Jordan Journal of Biological Sciences*,10 (4), 221-227.
- NF V 04-203., Janvier 1969. Préparation de l'échantillon en vue de l'analyse physique et chimique. Ed. Association Française de normalisation (AFNOR). Paris
- NF V 04-208., Septembre 1969. Détermination des cendres. Ed. Association Française de normalisation (AFNOR). Paris
- NF V 04-210., Décembre 1971. Détermination de la teneur en matière grasse. Ed. Association Française de normalisation (AFNOR). Paris
- NGOZI , I. (2017). Comparative Application of Different Strategies of Bacteriocins Produced by *Carnobacteriummaltaromaticium* MMF-32 for Inhibition of *Listeria monocytogenes*ATCC 19114 in Cold-Smoked Haddock. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, 38(2), 311-340.
- NOWAKOWSKI, M., JAREMKO, L.,WLADYKA, B., DUBIN,G., EJCHART, F., & MAK, C. (2018). Spatial attributes of the four-helix bundle group of bacteriocins –

Thehigh resolution structure of BacSp222 in solution.International Journal of Biological Macromolecules ,107, 2715–2724.

- PACHECO-CANOA, R., FUENTE-SALCIDOC, N.، SALCEDO-HERNÁNDEZA, R., LEÓN-GALVÁNA, M., BIDESHID, D .،HERNÁNDEZ-GUZMÁNA, G., & BARBOZA-CORONA, E. (2014).Characterization, N-terminal sequencing and classification of Tolworthcin 524: A bacteriocin produced by Bacillus *thuringiensis subsp. tolworthi.Microbiological Research*,169, 948–953.
- PARADA, J., RICOY CARON, C., MEDEIROS, A., & SOCCOL, C. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian archives of biology and technology*, 50(3), 521-542.
- PEREZ, R., ZENDO, T., & SONOMOTO, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microbial Cell Factories,* 13(1),1-13.
- QIANWEN, X., JIN,W., RENPENG, D., FANGKUN, Z., YE, H., & ZHIJIANG Z.(2017). Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by a Strain of *Enterococcus faecalis* TG2. *Applied Biochemistry and Biotechnology,*4,1-14.DOI 10.1007/s12010-017-2614-1.
- RAHLI, F. (2015).*Valorisation du lait de chamelle par exploitation des potentialités technologies des bactéries lactiques isolées localement* .Thèse doctorat contrôle microbiologique non publiée, Université d'Oran, Oran.
- RAI M, CHIKINDAS M., 2011- Natural Antimicrobials in Food Safety and Quality. Ed. CABI. USA. 382p
- RILEY, M. A., & Chavan, M. A. (Eds.). (2007). Bacteriocins: Ecology and Evolution. Springer Science & Business Media,148.
- RILEY, R., & WERTZ, J. (2002). Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. Ed. Springer. USA. 132P
- Riley, R., & Wertz, j.(2002).BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application.ed. Springer.USA.132p.
- RODNEY, H., TAKESHI, Z., &KENJI, S.(2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13(1),1-14.

- SAMOT, J.(2012). *Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux.* Thèse doctorat Microbiologie-Immunologie non publiée, Université de Bordeaux 2,Bordeaux .
- Senbagam, D., Gurusamy, R., & Senthilkumar B. (2013). Physical chemical and biological characterization of a new bacteriocin produced by Bacillus cereus NS02.*Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*,6, 934-941.
- SENBAGAM, D., GURUSAMY, R., & SENTHILKUMAR, B.(2013).Physical chemical and biological characterization of a new bacteriocin produced by Bacillus cereus NS02. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*,934-941
- SHARMA, G., DANG, S., GUPTA, S., & GABRANI, R. (2018). Antibacterial Activity, Cytotoxicity and Mechanism of Action of Bacteriocin from *Bacillus subtilis* GAS101. *Medical Principles and Practice*, 27,186–192.
- SHARON EDITH,G., SUMAYYAH ,S., FAKHRI ,S., MUHAMAD ,S., NICHOLA, H., & AMARILA, M. (2017). Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) activity of *Streptococcus macedonicus* MBF10-2 and its synergistic action in combination with antibiotics.*Asian Pacific Journal of Tropical Medicine,*10(12),1140-1145.
- SHEHATA, M., EL SOHAIMY, S., EL-SAHN, M., & YOUSSEF, M. (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bilesalt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Science*, 61(1), 65–75.
- SIDHU, P., & NEHRA, N.(2017). Bacteriocin-nanoconjugates as emerging compounds for enhancing antimicrobial activity of bacteriocins. *Journal of King Saud University – Science*,3,1-10.
- SILVA, C., SILVA, S., & RIBEIRO, S. (2018). Application of bacteriocins and Protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology*,9,1-15.
- SOBRINO-LÓPEZ, A., MARTIN-BELLOSO, O. (2015). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18, 329–343.
- TABAK ,S.,& BENSOLTANE, A.(2011). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium bifidum et Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature & Technologie*,06,71 – 79.

- TAKESHI, Z.(2013). Screening and Characterization of Novel Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*,77(5), 893-899.
- TELKE, A., OVCHINNIKOV, K.,VUORISTO, K., MATHIESEN, G.,THORSTENSEN,T., & DZUNG, B.(2018).Over 2000-fold increased production of the leaderless bacteriocingarvicin KSby genetic engineering and optimization of culture conditions.*bioRxiv*,1-32.doi.org/10.1101/298489.
- TENEA, G., & YÉPEZ, L. (2016). Bioactive Compounds of Lactic Acid Bacteria. Case Study: Evaluation of Antimicrobial Activity of Bacteriocin producing Lactobacilli Isolated from Native EcologicalNiches of Ecuador. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*,149-167.
- TODOROV, S. D., WACHSMAN, M., Elisabetta TOMÉ, E., DOUSSET, X., DESTRO M.T., THEODORE DICKS, L. M., GOMBOSSY DE MELO FRANCO, B. D., VAZ-VELHO, M., DRIDER, D.(2010). Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by Enterococcus faecium. *Food Microbiology*, 27 ,869-879.
- TODOROV, S., DE PAULA, O., CAMARGO, A., LOPES, D., & NERO, L. (2018). Combined effect of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*ST8SH and vancomycin, propolis or EDTA for controlling biofilm development by *Listeria monocytogenes*. *Revista Argentina De Microbiología*,50(1),48-55.
- TOLDRÁ F., 2009- Safety of Meat and Processed Meat. Ed. Springer Science & Business Media. Spain. 699p.
- WAN, X. (2017). *Leuconostoc* bacteriocins and their application in genome editing. *Academic Dissertation in Microbiology*,1-53.
- WHITEA, P. JOSHIA, A, RASSAMA, P. HOUSDENA, N. KAMINSKAA, R. GOULTA، J. REDFIELDA,C. MCCAUGHEYA, L.,WALKERC, D., MOHAMMEDA, S., & KLEANTHOUSA, C.(2017). Exploitation of an iron transporter for bacterial protein antibiotic import. *Proceedings of the national academy of science of the united states of America*,114(45),12051-12056.
- YAN YAN, H., & MIN TZE, L.(2014).Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus. DERMATOLOGICA SINICA*, 32,141-147.

- YANG, S., LIN,C., SUNG, C., & FANG, J. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology | Food Microbiology*, 5,1-11.
- ZACHAROF, M., & LOVITT, R.(2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *Responsibility of Asia-Pacific Chemical, Biological & Environmental Engineering Soci,*2,50-56.
- وزارة الشؤون البلدية و القروية دليل مضادات الميكروبات من مصادر طبيعية ./ وزارة الشؤون البلدية و القروية .- الرياض ، 1434هـ

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de culture et tampons

- **Eau physiologique**

Peptone…… 1g/L

Chlorure de sodium …… 8.5 g/L

Eau distillée …… 1 L

pH 6.8

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min

- **Milieu MRS BCP**

Milieu MRS Bouillon …… 1000 ml

Pourpre de bromocrésol …….0.025 mg/L

pH 7

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min

- **Milieu M17 BCP**

Milieu M17 Bouillon …… 1000 ml

Pourpre de bromocrésol …….0.025 mg/L

pH 7

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min

Annexe II : Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes;
- Laver à l'eau ;
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100). Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

Annexe III : Photos des quelques tests

La teneur en matière grasse

Test de production CO_2

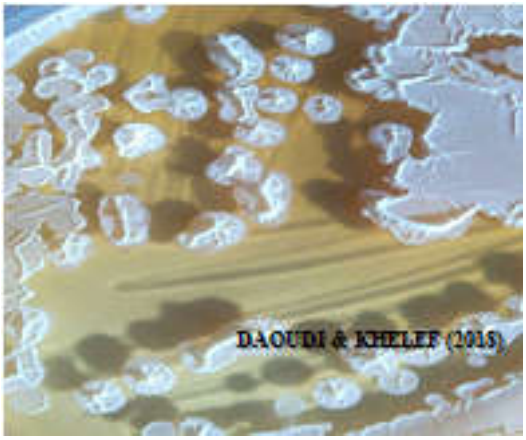
Test de la fermentation de lactose

Galerie API 20^{E}

Activité antibactérien

Bactériocine brut en poudre (Après lyophilisation)

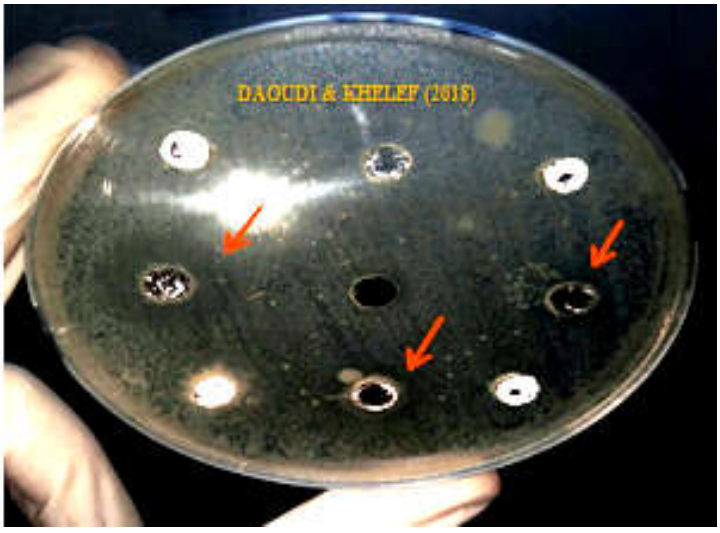
Echantillons du lait cru



Souche lactique sous forme lenticulaire

Etape de dialyse de bactériocine

Etape de traitement de membrane



Interaction des bactériocine vis a vis *Escherichia coli*